

刘 昭, 于小番, 张 宇, 等. 丝氨酸蛋白酶编码基因 *prtP* 对副干酪乳杆菌黏附特性的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 683-689.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.029

丝氨酸蛋白酶编码基因 *prtP* 对副干酪乳杆菌黏附特性的影响

刘 昭, 于小番, 张 宇, 陈忠琴, 龚威龙, 许慧卿, 崔桂友
(扬州大学旅游烹饪学院, 江苏 扬州 225127)

摘要: 为探讨丝氨酸蛋白酶编码基因 *prtP* 对副干酪乳杆菌黏附特性的影响, 利用 λ Red 重组系统敲除副干酪乳杆菌的 *prtP* 基因, 构建副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株, 比较突变株与亲本株的表面结构、黏附特性的差异。结果表明, *prtP* 基因缺失突变株的生长速度变慢, 疏水性和自聚合性明显下降, 抑菌效果无显著性差异, 对抗生素的敏感性发生了显著变化, 体外对细胞的黏附性显著降低。可见, *prtP* 基因对副干酪乳杆菌的黏附特性十分重要, 该基因缺失将改变菌株的生物学特性。

关键词: 副干酪乳杆菌; *prtP* 基因; 基因敲除; 生物学特性; 黏附性

中图分类号: TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)03-0683-07

Adhesion characteristics of *Lactobacillus paracasei* influenced by serine protease encoding gene *prtP*

LIU Zhao, YU Xiao-fan, ZHANG Yu, CHEN Zhong-qin, GONG Wei-long, XU Hui-qing, CUI Gui-you
(College of Tourism and Cuisine, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: To investigate the effects of serine protease encoding gene *prtP* on the adhesion of *Lactobacillus paracasei*, an isogenic *prtP* mutant was constructed by knocking out *prtP* gene using λ Red recombination system. The surface structure and adhesion characteristics of the mutant were studied. The *prtP* gene mutant strain showed slower growth rate, decreased hydrophobicity and self condensing ability. The sensitivity to antibiotics of the mutant strain changed in comparison to parental strain, and the adhesion of cells dropped significantly *in vitro*. In conclusion, the *prtP* gene is important for the adhesion of *L. paracasei*, and the deletion could change the biological characteristics of the strain.

Key words: *Lactobacillus paracasei*; *prtP* gene; gene knock-out; biological characteristic; adhesion

副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 是卫生部公布的可用于保健食品的益生菌之一。副干酪乳杆菌具有十分重要的应用及研究价值, 在工业生产、

食品发酵及防腐、医疗保健、环境保护等领域均有巨大应用潜力。副干酪乳杆菌在食品工业中应用非常广泛, 主要集中在乳制品方面, 如干酪和酸奶。在国外, 副干酪乳杆菌产品的开发主要集中在干酪产品上^[1]。除了用于乳制品生产, 副干酪乳杆菌还用于生产乳酸菌制剂。此外, 还有将副干酪乳杆菌作为发酵剂用于改善香肠风味同时抑菌的研究^[2]。

副干酪乳杆菌之所以能广泛地被利用, 源于其良好的益生特性, 而评价益生性的重要指标之一便

收稿日期: 2016-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101305); 扬州大学大学生创新创业训练计划项目(x20160929)

作者简介: 刘 昭(1991-), 女, 山东淄博人, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物学。

通讯作者: 许慧卿, (Tel) 0514-87978133; (E-mail) yzuxhq@126.com

是益生菌的黏附性能。乳酸菌进入肠道后,黏附性差的会随着肠道蠕动被排出体外,只有黏附性高的乳酸菌才能在肠道存活并繁殖,从而更好地发挥益生作用^[3]。黏附性高的乳酸菌进入肠道后首先与肠黏膜表面接触,并通过识别特异性受体与之结合,黏附定植于肠黏膜表面^[4]。乳酸菌的黏附一方面通过竞争性占位定植形成生物屏障,阻止了病原菌与肠黏膜受体结合,另一方面也延长了乳酸菌影响宿主肠道免疫系统和微生态区系的时间。黏附的乳酸菌能产生乳酸、细菌素、过氧化氢和某些有机酸等物质,抑制肠道中一些致病菌的繁殖,维持肠道的内稳态。因此,乳酸菌对肠黏膜上皮细胞的黏附和定植是其发挥生理作用的前提^[5]。

最新研究发现,乳酸乳球菌细胞外膜的丝氨酸蛋白酶(*Lactocepin*)能介导乳酸菌的黏附作用,而且在某些益生乳酸菌中,*Lactocepin* 对肠道炎性具有良好的抑制作用,能够降解部分炎性细胞因子^[6]。因此对这种细胞表面蛋白的深入研究不但可以提高益生菌的益生功能^[7],而且可为开发肠道免疫调节剂提供理论基础。但目前尚无在副干酪乳杆菌中该蛋白质作用的相关报道。

在本研究中,我们利用 λ Red 体内重组系统在副干酪乳杆菌中敲除 *prtP* 基因,并将 *prtP* 突变株与亲本株在形态结构、生物特性包括黏附性进行对比,为进一步研究 *prtP* 基因编码的细胞膜丝氨酸蛋白

酶 *Lactocepin* 的特性、功能及益生菌的益生特性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

脾脏细胞、巨噬细胞和小肠上皮细胞取自 6~8 周龄 BALB/c 小鼠。副干酪乳杆菌菌株、质粒 pKD3、pKD46、大肠杆菌宿主均由本实验室保存。插入氯霉素抗性基因的载体由本室构建和保存。氨苄青霉素、氯霉素、*Taq* 酶、Marker、6×loading buffer、阿拉伯糖购自上海生工生物工程有限公司。沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌由本实验室分离鉴定后保存。药敏试纸为杭州天和微生物试剂有限公司产品,PCR 引物(PPA、PPS、CPC、CPS)、琼脂糖购自南京生兴生物技术有限公司,AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒购自北京市科学器材公司,DMEM、DMEM/F-12 购自美国 Hyclone 公司,牛血清(FBS)购自南京森贝伽生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *prtP* 基因的扩增及克隆载体的构建 根据 GenBank 公布的序列,设计扩增 *prtP* 基因的特异引物 PPA/PPS(表 1),引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 *prtP* 基因的 PCR 引物

Table 1 PCR primers for *prtP* gene

名称	引物序列(5'→3')	长度(bp)
PPS	ATCTTAACTACATCAAGCGTAGGGTTTGATTGTTCTGAAACTTTTGGGAAGTGGAGGGTATTGGATGC	70
PPA	GATACGCTGCTGCCCTAAACGTAACGCATGGACAGGCTATTCTTCACGTTGTTCCGTTTCAATCCTAAT	70

1.2.2 副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株的构建

按照 Gao 等的方法^[8],用 λ -Red 重组系统构建副干酪乳杆菌 *prtP* 基因突变株。将质粒 pKD46 电转入副干酪乳杆菌以表达重组酶,以质粒 pKD3 为模板,用引物 PPS/PPA 扩增相应片段,然后将扩增片段电转副干酪乳杆菌。挑取含氨苄青霉素和氯霉素双重抗性的菌落,在 42 ℃ 下去除 pKD46,得到有氯霉素抗性的副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株,命名为 *L.pΔprtP*。

1.2.3 突变株表面结构的电镜观察 将新鲜的副

干酪乳杆菌培养液离心,去上清,然后用 PBS 重悬。将悬液滴于载网上,静置 5~10 min,用滤纸吸去载网边缘多余液体,滴加染色液,染色 3~5 min,用滤纸吸去载网边缘多余液体,自然干燥,在透射电镜下观察^[9]。

1.2.4 副干酪乳杆菌生长曲线的测定 取平板上的亲本株、突变株单个菌落接种到含 10 ml 新鲜培养基的盐水瓶中培养 12~18 h。吸取 200 μ l 菌液加到 100 ml 新鲜培养基中,将亲本株与突变株的 OD_{600} 调到同一初始值($OD_{600}=0.09$),每隔 1 h 测定

1 次 OD_{600} , 历时 24 h。比较亲本株与突变株的生长速度。

1.2.5 副干酪乳杆菌疏水性测定 乳酸杆菌表面疏水性测定采用微生物粘着碳烃化合物法 (Bacterial adherence to hydrocarbons, BATH), 参考任大勇的方法^[10]测定。乳酸杆菌于 37 °C 下静置培养 18 h, 菌液在 6 000 r/min 下离心 10 min, 弃上清, 收集菌体沉淀。菌体用灭菌的 PBS (pH7.2) 溶液洗涤 2 次, 再重新悬浮于灭菌的 0.1 mol/L KNO_3 溶液中, 使菌体悬液的吸光度 ($OD_{600\text{nm}}$) 达到 0.50 ± 0.02 (A_0)。取 3 ml 菌悬液与 1 ml 二甲苯混合, 在室温静置 10 min, 形成两相体系 (水相和有机相)。将两相体系漩涡振荡 2 min, 再静置 20 min, 重新形成两相体系。小心吸取水相, 在 600 nm 下测定吸光度 (A_1)。计算细胞表面疏水性 (取 3 次重复的平均值), 疏水性 = $[1 - (A_1 / A_0)] \times 100\%$ 。

1.2.6 乳酸杆菌自聚合能力测定 参考任大勇的方法^[10]。将新培养的乳酸杆菌菌液在室温下离心 (6 000 r/min, 10 min), 弃上清, 收集菌体。菌体用灭菌的 PBS (pH7.2) 溶液洗涤 2 次并重悬于 PBS 溶液中, 使其在 600 nm 下的吸光度达到 0.50 ± 0.02 ($A_{0,h}$)。然后将 2 ml 乳酸杆菌悬液涡旋振荡 20 s, 于 37 °C 静置 2 h。小心吸取 1 ml 上清, 测定其在 600 nm 吸光度 ($A_{2,h}$)。计算乳酸杆菌自聚合能力 (取 3 次重复的平均值), 自聚合能力 = $[1 - (A_{1,h} / A_{0,h})] \times 100\%$ 。

1.2.7 乳酸菌抑菌能力的测定 将活化 2 代后的大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 培养 18 h, 4 °C 冷藏备用。于无菌操作台中分别吸取活化的致病菌培养液 200 μl 加到 LB 固体培养基平板上, 用无菌涂抹棒涂布均匀。待菌液固定在平板表面后, 每个平板上均匀掏取 3 个大小一致的孔, 用酒精灯灼烧小孔的底部, 使周围琼脂熔化将孔底封住, 避免漏液。吸取待测样品 200 μl 加入孔中, 于 37 °C 培养箱中静置培养, 用游标卡尺测量抑菌圈大小。抑菌能力判定标准: 抑制圈直径 11~15 mm 为低度抑菌; 抑制圈直径 16~20 mm 为中度抑菌; 抑制圈直径 >20 mm 为高度抑菌; 无明显抑菌圈为不抑菌。

1.2.8 乳酸菌对抗生素的敏感性测定 采用 K-B 法即药敏纸片琼脂扩散法测定乳酸菌抗生素敏感性。将乳酸菌按 2% 的接种量接入 MRS 液体培养

基, 37 °C 培养, 吸取培养液 200 μl 并均匀涂布于 MRS 固体培养基上, 均匀涂布 2 次, 于无菌操作台中放置数分钟, 待干燥后以无菌镊子取抗生素纸片贴于固体培养基表面, 置于 37 °C 培养箱中培养, 用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.2.9 细胞黏附试验 将脾脏细胞、巨噬细胞和小肠上皮细胞悬液 (浓度为 1 ml 1×10^6 个) 加入到 24 孔板中, 每孔 1 ml。于 37 °C、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 48 h。待细胞完全贴壁, 以无菌 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 1 ml 浓度为 1×10^8 CFU/ml 的乳酸菌悬液, 孵育 1~2 h。以镜检法和涂布平板法评价副干酪乳杆菌亲本株及其 *prtP* 基因缺失突变株 *L. p* Δ *prtP* 对 3 种细胞的黏附性。

2 结果与分析

2.1 突变株 *L. p* Δ *prtP* 的鉴定

根据 GenBank 公布的副干酪乳杆菌的基因序列, 分析启动子和开放性阅读框, 结果显示基因 *prtP* 拥有独立的单个开放阅读框, 含有 7 820 个碱基对。插入氯霉素突变后, 以突变副干酪乳杆菌为模板, 用引物 PS/PA 进行 PCR 鉴定, 得到 1 175 bp 的片段 (图 1), 与预期结果一致, 证实得到的菌株为副干酪乳杆菌突变株。

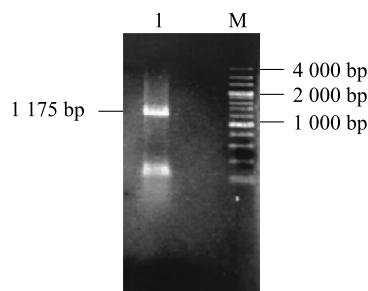
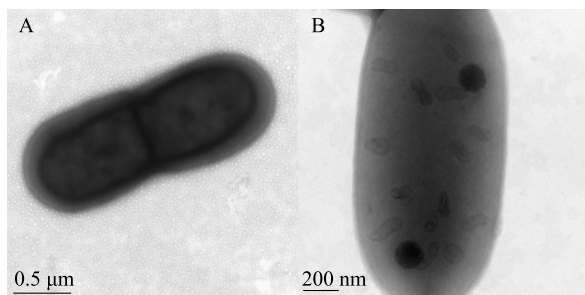


图 1 副干酪乳杆菌突变株 (*L. p* Δ *prtP*) 的 *prtP* 基因片段 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of *prtP* gene fragment in the mutant strain of *Lactobacillus paracasei* (*L. p* Δ *prtP*)

2.2 副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株与亲本株的表面结构差异

在透射电镜下, 副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株 (*L. p* Δ *prtP*) 与其亲本株的表面结构无明显差异, 细胞表面的黑斑状阴影可能是被吸附到表面的杂质 (图 2)。



A:副干酪乳杆菌亲本株;B:副干酪乳杆菌突变株。

图2 副干酪乳杆菌亲本株及其突变株 (*L.pΔprtP*) 电镜图

Fig.2 Electron microscopic images of *L. paracasei* parental strain and *L. paracasei* mutant strain (*L.pΔprtP*)

2.3 副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株的生长曲线

副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株的生长曲线与其亲本株类似,都经历了适应期、对数期和平台期,但突变株的生长速度明显慢于亲本株(图3)。在MRS培养基中,从第4 h开始两菌株的生长速度出现差异,亲本株在第11 h时生长速度接近稳定,而突变株此时仍在对数期,直到第16 h时才开始稳定。

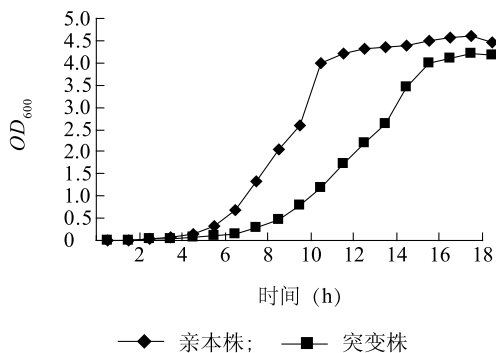


图3 副干酪乳杆菌亲本株和突变株的生长曲线

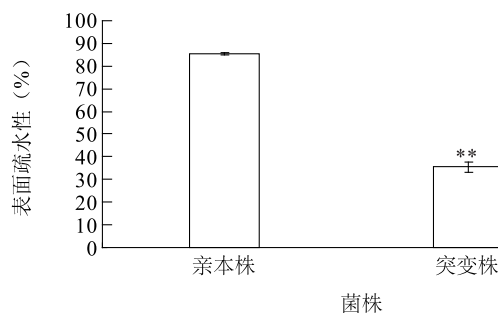
Fig.3 The growth curve for *L. paracasei* parental strain and mutant strain

2.4 副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株的表面疏水性

由图4可以看出,副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株与亲本株的表面疏水性差异很大,亲本株的疏水性达到85.5%,而突变株仅为35.6%,差异显著($P<0.01$)。在试管中副干酪乳杆菌亲本株菌液澄清透明,突变株菌液明显浑浊。

2.5 副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株的自聚合能力

副干酪乳杆菌突变株与亲本株的自聚合能力差

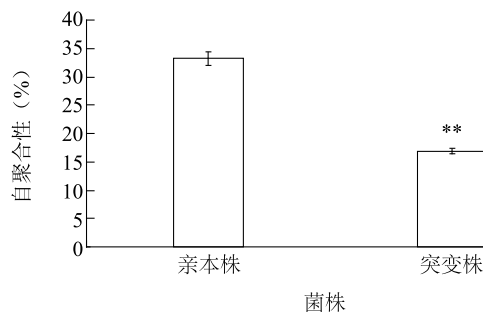


**表示差异极显著($P<0.01$)。

图4 副干酪乳杆菌亲本株和突变株的表面疏水性

Fig.4 The surface hydrophobic property of *L. paracasei* parental strain and mutant strain

异极显著($P<0.01$),分别为16.9%、33.1%(图5)。在MRS培养基中,副干酪乳杆菌亲本株聚集明显,而突变株菌液比较清澈,聚集较少。



**表示差异极显著($P<0.01$)。

图5 副干酪乳杆菌亲本株和突变株的自聚合能力

Fig.5 The autoaggregation of *L. paracasei* parental strain and mutant strain

2.6 副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株的抑菌能力

采用打孔法测定副干酪乳杆菌突变株和亲本株的抑菌能力。结果(表2)表明,两株菌对几种致病菌均有不同程度的抑制能力,亲本株的抑菌效果略好于突变株,但两者并无显著差异。

表2 副干酪乳杆菌亲本株和突变株对致病菌的抑制作用

Table 2 The inhibition effects of *L. paracasei* parental strain and mutant strain on pathogenic bacteria

菌株	抑菌圈直径(mm)			
	大肠杆菌	沙门氏菌	副溶血性弧菌	金黄色葡萄球菌
亲本株	19.00±2.00	18.33±1.15	19.00±1.00	17.33±1.15
突变株	16.00±0	16.67±1.53	15.33±0.58	16.67±1.15

抑菌圈直径包含孔外径(8 mm)。

2.7 副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株对抗生素的耐受能力

使用药敏纸片测定副干酪乳杆菌突变株和亲本株对抗生素的耐受能力。结果(表3)显示,亲本株对诺氟沙星、环丙沙星、多黏菌素 B、链霉素均具有耐药性,对四环素和青霉素 G 中度敏感,对利福平、头孢唑林和头孢拉定均敏感;突变株对诺氟沙星、多黏菌素 B 和链霉素均有耐药性,对环丙沙星、青霉素 G 和头孢拉定中度敏感,对利福平、四环素、头孢唑林均敏感。

2.8 副干酪乳杆菌 *prtP* 基因缺失突变株对 3 种细胞的黏附性

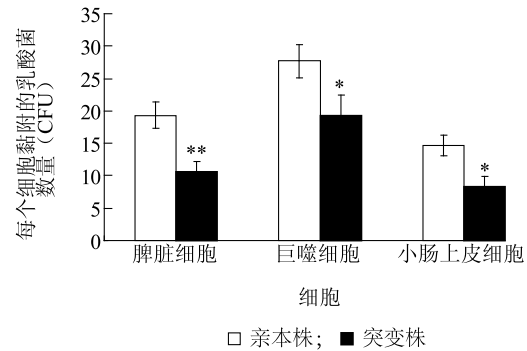
在显微镜 20 个视野内计算与脾脏细胞、巨噬细胞和小肠上皮细胞黏附的乳酸菌数量。由图 6 可知,副干酪乳杆菌亲本株(*L.p*)的黏附数量明显大于 *prtP* 基因缺失突变株(*L.p ΔprtP*)。在脾脏细胞上,*L.p* 黏附数量为 19.3 ± 2.1 个,而 *L.p ΔprtP* 黏附数量为 10.7 ± 1.5 个,两者差异极显著($P < 0.01$)。在巨噬细胞上,*L.p* 黏附数量为 27.7 ± 2.5 个,而 *L.p ΔprtP* 黏附数量为 19.3 ± 3.1 个,两者差异显著($P < 0.05$)。在小肠上皮细胞上,*L.p* 黏附数量为 14.7 ± 1.5 个,而 *L.p ΔprtP* 黏附数量为 8.3 ± 1.5 个,两者差异显著($P < 0.05$)。从显微镜图片中可以直观地看出,副干酪乳杆菌亲本株更加密集地围绕(黏附)在 3 种细胞的周围,而突变株明显较少(图 7)。

表 3 副干酪乳杆菌突变株和亲本株的药敏性

Table 3 Drug sensitivities of *L. paracasei* parental strain and mutant strain

抗菌药	纸片含药量 (μg , 1 片)	敏感性	
		亲本株	突变株
诺氟沙星	10	R	R
环丙沙星	30	R	I
利福平	30	S	S
四环素	30	I	S
多黏菌素 B	30	R	R
链霉素	10	R	R
青霉素 G	10	I	I
头孢唑林	5	S	S
头孢拉定	5	S	I

R 为耐药, I 为中度敏感, S 为敏感。



*、** 分别表示差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$)。

图 6 副干酪乳杆菌突变株和亲本株的黏附性(镜检法)

Fig.6 Adhesion of *L. paracasei* parental strain and mutant strain (by microscopic examination)

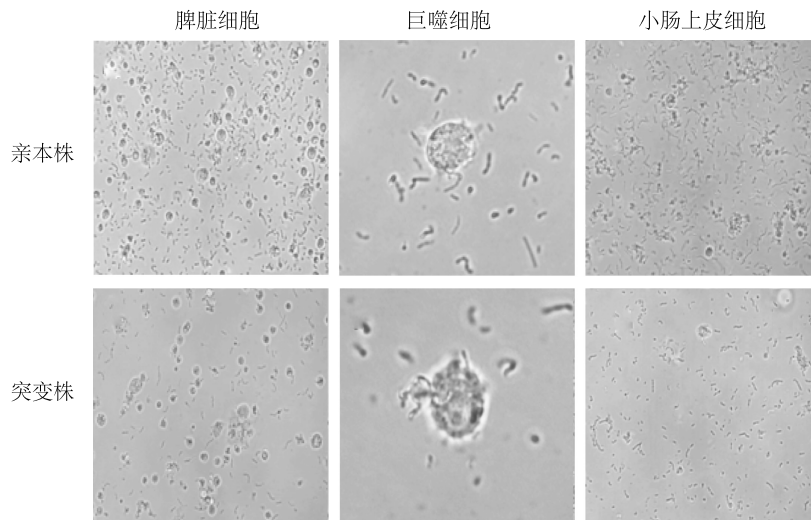
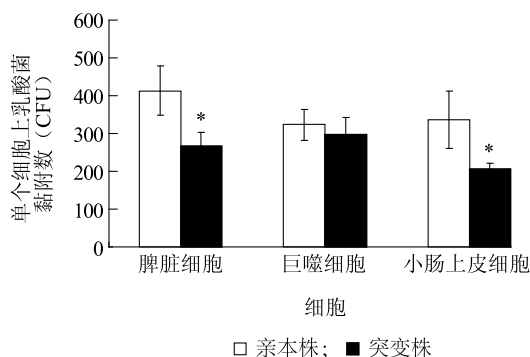


图 7 显微镜下副干酪乳杆菌突变株和亲本株对 3 种细胞的黏附

Fig.7 Adhesion of *L. paracasei* parental strain and mutant strain to three kinds of cells under microscope

副干酪乳杆菌亲本株和突变株分别与小鼠脾脏细胞、巨噬细胞和小肠上皮细胞共同培养后,用无菌 PBS 洗去未黏附的乳酸菌,轻轻刮下培养孔板底部的细胞,制成细胞悬浊液,梯度稀释后涂 MRS 板,培养并计数,结果(图 8)显示亲本株的黏附性高于突变株。脾脏细胞上,亲本株黏附数为每个细胞 4.13 ± 0.65 CFU,突变株黏附数为每个细胞 2.67 ± 0.38 CFU,差异显著($P < 0.05$)。巨噬细胞上,亲本株黏附数为每个细胞 3.23 ± 0.42 CFU,突变株黏附数为每个细胞 2.97 ± 0.47 CFU,差异不显著。小肠上皮细胞上,亲本株黏附数为每个细胞 3.37 ± 0.75 CFU,突变株黏附数为每个细胞 2.07 ± 0.15 CFU,差异显著($P < 0.05$)。



* 表示差异显著($P < 0.05$)。

图 8 副干酪乳杆菌突变株和亲本株的黏附性(涂板法)

Fig.8 Adhesion of *L. paracasei* parental strain and mutant strain (by plating examination)

3 讨论

本研究结果显示 *prtP* 基因编码的丝氨酸蛋白酶(*Lactocepin*)影响副干酪乳杆菌的生物学特性及黏附性,*prtP* 基因缺失突变株的某些生物学特性与亲本株相比,差异显著。在对有害菌的抑制作用上,亲本株和突变株并无显著性差异;在对抗生素的敏感性上,亲本株和突变株差别也不大,但在对环丙沙星、四环素和头孢拉定的敏感性上有差异,原因有待进一步研究。而在黏附性上,副干酪乳杆菌亲本株对小鼠脾脏细胞、巨噬细胞和小肠上皮细胞的黏附性均好于突变株,差异显著。

在中国副干酪乳杆菌的研究和应用尚处于起步阶段,主要集中在乳制品的发酵和肉制品的防腐保

鲜,缺乏深入的研究,因此,副干酪乳杆菌亲本株以及由突变得到的新资源菌株的功能、作用机理以及应用研究领域具有非常广泛的发展空间^[11]。深入研究副干酪乳杆菌的益生特性,从分子层面进一步阐述副干酪乳杆菌益生机制,对其实际应用非常重要。

有研究结果证明,*prtP* 基因编码的细胞外膜丝氨酸蛋白酶(*Lactocepin*)能介导乳酸菌的黏附作用,而乳酸菌的黏附性是决定其免疫调节活性的重要因素之一^[10]。本研究通过敲除 *prtP* 基因,比较了 *prtP* 基因的缺失对副干酪乳杆菌生物学特性的影响,并测定了菌株黏附性的变化。

乳酸菌的黏附性对于其在肠道定植、增加与机体的交互作用、竞争性排斥病原菌在肠道的定植、提高机体免疫力等方面有重要作用^[10]。细菌对黏液和细胞的黏附过程基本相似。首先是可逆的非特异性黏附阶段,这是由复杂的物理化学作用介导的,主要与菌体的疏水性和细菌所带的电荷有关;其次是与特异性受体结合的特异性黏附阶段,即通常所说的黏附,主要是细菌表面黏附素与细胞表面或者黏液中的黏附受体进行特异性结合^[3]。目前已发现的黏附素有脂磷壁酸、S-层蛋白、脂多糖及肽聚糖等。除了黏附素以外,宿主受体也是细菌特异性黏附过程中的必要因子。

乳酸菌黏附研究有体内、体外 2 方面。针对特定宿主的体内试验能比较真实地反映乳酸菌在宿主体内的黏附定植情况,但体内黏附试验成本较高,影响因素较多,所以体外试验应用更广泛。常用肠黏液和细胞建立体外模型^[3]。

细菌表面疏水性常用于研究细菌的黏附作用^[12]。乳酸菌的疏水性与菌体黏附性具有相关性。菌体表面疏水性主要由疏水性蛋白质、糖类和其他化合物决定^[13]。由于菌体表层蛋白质具有多样性^[14],因此菌株的表面疏水能力存在差异。乳酸菌表面疏水性与其黏附性成正比,因而可以通过测定疏水性来间接判断细菌的黏附性大小^[15]。有研究结果^[9]表明细菌疏水性和自聚合性之间具有密切的相关性,而本研究结果也验证了这一关系。所以自聚合性也是间接判断细菌黏附性的一个指标。

参考文献:

- [1] 庄海霁,雷虹,张铁丹,等. 副干酪乳杆菌的应用研究进展

- [J]. 生物技术通讯, 2006(6): 989-991.
- [2] 张 硕, 张莉力, 王玉田. 副干酪乳杆菌对发酵香肠风味的作用研究[J]. 食品工业科技, 2014(3): 305-307, 368.
- [3] 靳彩娟. 高黏附性乳酸菌的筛选、鉴定及其表面疏水特性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- [4] GRANATO D, BERGONZELLI G E, PRIDMERE R D, et al. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins[J]. Infect Immun, 2004, 72 (4) : 2160-2169.
- [5] 王 斌, 李秋荣, 刘放南, 等. 1 株肠道高黏附性乳杆菌的分离鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2008(6): 463-466, 474.
- [6] MARIE-ANNE VON S, GABRIELE H, MONIKA W, et al. Lactococin secreted by lactobacillus exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines[J]. Cell Host & Microbe, 2012, 19(4): 387-396.
- [7] 赵 迪, 曾娟娟, 王 蕾, 等. 干酪乳杆菌功能及应用的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(3): 56-58.
- [8] GAO Q Q, XU H Q, WANG X B, et al. RfaH promotes the ability of the avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058 to cause avian colibacillosis [J]. J Bacteriol, 2013, 195(11): 2474-2480.
- [9] 许慧卿. 禽致病性大肠杆菌 E058 株 *lpxL*、*lpxM* 和 *lpxP* 基因突变株构建及致病性、免疫特性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- [10] 任大勇. 益生乳酸杆菌的黏附及免疫调节作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [11] 巨晓英. 副干酪乳杆菌的分离鉴定及免疫功能研究[D]. 天津: 天津大学, 2009.
- [12] SHAKIROVA L, GRUBE M, GAVARE M, et al. *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cell surface hydrophobicity and survival of cells under adverse environmental conditions[J]. J Ind Microbiol Biot, 2013, 40(1): 85-93.
- [13] HIROMI K, KOKO M, TAKASHI O, et al. New *Lactococcus* strain with immunomodulatory activity: enhancement of Th1-type immune response[J]. Microbiology & Immunology, 2004, 48(2): 75-82.
- [14] PERDIGON G, NADER DE MACIAS M E, ALVAREZ S, et al. Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *L. acidophilus*[J]. Journal of Dairy Research, 1990, 57(2): 255-264.
- [15] TONG Z, DONG L, ZHOU L, et al. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism *in vitro* [J]. Peptides, 2010, 31(11): 2003-2008.

(责任编辑: 张震林)