雪莲菌中产 S 层蛋白乳酸杆菌的筛选及黏附性能

程天天， 李佳乐， 付梦琪， 李美琦， 桑亚新， 高 洁*
（河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000）

摘要 目的：大量研究表明乳酸杆菌 S 层蛋白(SLP)具有黏附功能，包括助力菌体对肠上皮细胞的黏附或与细胞表面成分的稳定结合。本文旨在探究雪莲菌中乳酸杆菌 SLP 的黏附性能，评估其对雪莲菌中微生物间聚集及生物膜形成的影响。方法：采用传统分离手段及酸性氯化锂提取法从雪莲菌中筛选产 SLP 菌株，通过微生物溶剂黏附(MATS)法对比分析 SLP 对菌体表面疏水性及表面电荷的影响，最后通过测定乳酸杆菌细胞的自聚集率及其与酵母菌的共聚集率和生物膜形成能力分析 SLP 对菌体间聚集的作用。结果：从雪莲菌中分离筛选到 19 株产 SLP 乳酸杆菌，所产 SLP 分子质量均为 70 ku 左右，其中最高产量达 1.16 g/mL。通过对比去除 SLP 前、后的菌体表面特性和聚集能力，发现去除 SLP 造成菌体平均自聚集率与共聚集率分别降低 1.63%~7.56%和 0.96%~10.63%，混合生物膜生长所对平均吸光度值减少范围为 0.52~1.13 nm。结论：雪莲菌中富含高产 SLP 菌株，且多数为其优势菌相。作为影响聚集和黏附能力的重要物质，SLP 在雪莲菌微生物群生物膜形成和稳定繁殖方面发挥着重要作用。

关键词 雪莲菌；S 层蛋白；聚集；黏附；生物膜
文章编号 1009-7848(2024)11-0032-08 **DOI**：10.16429/j.1009-7848.2024.11.004

S 层蛋白(Surface layer protein, SLP)是一类包裹在古生菌和细菌细胞表面，具有自组装特性的蛋白质，呈规则的晶状体结构[1]。与其它菌属不同，乳酸杆菌的 SLP 具有独特性，是一种分子质量介于 25~71 ku 的碱性蛋白(pI=9.4~10.4)[2]。乳酸杆菌作为应用最广，对宿主健康发挥重要作用的益生菌之一，其 SLP 的功能也被大量研究，如对肠道屏障的保护作用[3]，增加乳酸杆菌对肠上皮细胞的黏附[4]，参与乳酸杆菌的免疫调节[5]，抑制肠道内致病菌增殖[6]等。Avall-Jaaskelainen 等[7]研究发现，去除 SLP 后的嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)M92 对小鼠回肠细胞的黏附率显著降低。De Leeuw 等[8]发现短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)ATCC 8277 的 SlpA 与胞外基质蛋白——纤连蛋白和层黏连蛋白具有较高的亲和力。然而，SLP 介导的黏附功能多聚焦在菌株的益生特性及对致病菌的黏附抑制作用，对于菌株表面特性及其对生物膜形成的作用缺乏探究。

雪莲菌是一个天然形成的开放式发酵体系，乳酸菌及酵母菌是其核心微生物。雪莲菌的稳定共存得益于多种微生物间的复杂共生关系，其聚集成膜特性与群落中微生物的胞外蛋白、胞外多糖的聚集积累密切相关[9]。据报道，从雪莲菌中分离到的部分乳酸杆菌携带 SLP[10]，而 SLP 是否在微生物间的聚集中发挥作用尚未知。

本研究首先通过传统微生物分离筛选手段结合酸性氯化锂提取法，从雪莲菌中分离筛选具有产 SLP 性能的乳酸杆菌，并利用分子生物学技术进行菌种鉴定。采用微生物溶剂黏附(Microbial adhesion to solvents, MATS) 法分析 SLP 对菌株表面特性(疏水性及所带电荷)的影响，并通过细胞聚集试验和生物膜形成能力评估雪莲菌分离菌株的黏附能力。探究雪莲菌中 SLP 对菌体间的聚集、黏附作用，为雪莲菌形成及共生机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

MRS 肉汤、MRS 培养基，北京奥博星生物技术有限公司；LiCl、PBS、5×上样缓冲液、SDS-PAGE 标准蛋白(15~100 ku)、透析袋(截留分子质量 34~14 000 u)，其它试剂均为分析纯级。

试验所用雪莲菌样品分别购自陕西西安、内蒙古巴彦淖尔、安徽合肥、山东德州、辽宁大连。

收稿日期：2023-11-23
基金项目：河北省自然科学基金项目(C2021204061)
第一作者：程天天，男，硕士
通信作者：高洁 E-mail:：gaojiehbu@163.com

1.2 仪器与设备

电泳仪 PowerPac，美国 Bio-Rad 公司；凝胶成像 Tanon 4600SF，上海天能科技有限公司；高速冷冻离心机，德国海蒂诗有限公司；恒湿恒温培养箱 SKP-02.300，黄石市恒丰医疗器械有限公司；恒温培养振荡器，上海智城分析仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 雪莲菌中乳酸杆菌的分离纯化　取连续活化培养 3 次的雪莲菌 1 g 及 9 mL 生理盐水于无菌研钵中，充分研磨均匀后取取 1 mL 混合溶液以生理盐水进行梯度稀释，得到 10^{-1}~10^{-7} 浓度梯度的稀释液。分别取各浓度梯度的稀释液 100 μL，使用无菌涂布器均匀涂布于 MRS 琼脂培养基上，倒置 37 ℃厌氧培养 48~72 h。

1.3.2 乳酸杆菌的 16S rRNA 序列测定　将分离纯化的乳酸杆菌培养至对数生长期，并提取其基因组 DNA。以 F27(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 和 R1541 (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA)[11] 为引物进行 PCR 扩增，所得 16S rRNA 的 PCR 产物由华大基因进行测序分析。

1.3.3 系统发育树的构建　将测序所得 16S rDNA 序列与 NCBI 的 Gen Bank 数据库进行 Blast 分析，将所得数据库序列与菌株序列进行比较，利用 MEGA-X 软件构建系统发育树，确定分离菌株的种属关系。

1.3.4 SLP 的提取及含量测定　参考 Zhang 等[12]的方法并作适当修改。乳酸杆菌在 MRS 改良培养基中活化培养 3 次后，将不同乳酸杆菌的活菌数均调节至 10^8 CFU/mL，以 3%的接种量接种，培养 24 h 后离心（4 ℃、4 600 r/min、20 min）取菌体沉淀。将菌体沉淀用无菌 PBS 洗涤 2 次，按 $m_{菌体沉淀}$:$V_{氯化锂}$=1:15 的比例添加 5 mol/L LiCl 溶液（pH=2.0），在 4 ℃、200 r/min 条件下振荡处理 1 h。上述 LiCl 溶液处理样品离心取上清液，于蒸馏水中 4 ℃处理 24 h 后收集透析袋内溶液，于-20 ℃贮存备用。采用 BSA 试剂盒进行蛋白含量测定。

1.3.5 SDS-PAGE　SLP 粗提液(20 μL)与 5×电泳缓冲液(5 μL)混匀，沸水浴 5 min 后进行上样，电泳上样量 20 μL。分离胶质量分数为 10%，电压 120 V，浓缩胶电压为 100 V。电泳后用考马斯亮蓝溶液进行染色。

1.3.6 乳酸杆菌菌体表面性质测定　参考孟珺[13]的方法，并做适当调整。

1.3.6.1 表面疏水性测定　乳酸杆菌 37 ℃过夜培养，离心收集菌体(4 600 r/min、4 ℃、10 min)。0.01 mol/L 无菌 PBS 洗涤 2 次后再次重悬，并于波长 600 nm 处调整菌悬液吸光值至 1.00±0.05，记录准确吸光值为 A_0。取 3 mL 菌悬液加入 1 mL 十六烷，室温下反应 10 min，漩涡振荡 2 min，再次室温反应 20 min。分层后取水相，用分光光度计测定其在波长 600 nm 处的吸光值，记为 A_1，根据式(1)计算乳酸杆菌表面疏水率。

$$吸附率(\%) = (1-A_1/A_0)\times100 \quad (1)$$

1.3.6.2 表面电荷性质测定　采用三氯甲烷和乙酸乙酯作为路易斯酸和路易斯碱，分析菌体表面路易斯酸碱性质和所带电荷[13]。乳酸杆菌 37 ℃过夜培养，离心收集菌体（4 600 r/min、4 ℃、10 min）。无菌 PBS 溶液洗涤 2 次后再次重悬，于波长 600 nm 处调整菌悬液吸光值至 1.00±0.05，记录准确吸光值为 A_0。取 3 mL 菌悬液加入 1 mL 三氯甲烷或乙酸乙酯，室温反应 10 min，漩涡振荡 2 min，再次反应 20 min。分层后取水相，分光光度计测定其在波长 600 nm 处的吸光值，记为 A_2，根据式(2)计算乳酸杆菌对两种溶剂的吸附率。

$$吸附率(\%) = (1-A_2/A_0)\times100 \quad (2)$$

1.3.7 乳酸杆菌聚集性及成膜特性测定

1.3.7.1 菌体自/共聚集率测定　参考孟珺[13]的研究方法，并作出适当调整。乳酸杆菌和酵母菌分别于 37 ℃和 28 ℃条件下过夜培养，离心收集菌体(4 600 r/min、4 ℃、10 min)，无菌 PBS 溶液洗涤 2 次后再次重悬，于波长 600 nm 处调整菌悬液吸光值至 1.00±0.05，并记录吸光值为 A_0，酵母菌记录为 A_5 将上述菌悬液混匀后室温静置 4 h，并移取上清液测定其在波长 600 nm 处的吸光值，记录为 A_3，根据式(3)计算乳酸杆菌的自聚集率。

$$自聚集率(\%) = (1-A_3/A_0)\times100 \quad (3)$$

通过将酵母菌和乳酸杆菌菌悬液以 1∶1 的体积比混匀，室温静置 4 h，并移取上清液测定其在波长 600 nm 处的吸光值，记录为 A_4，根据式(4)计算乳酸杆菌和酵母菌的共聚集率。

$$共聚集率(\%) = [1-2A_4/(A_5+A_0)]\times100 \quad (4)$$

1.3.7.2 菌体生物膜形成能力测定 参考 Wang 等[14]的研究方法，并作出适当调整。乳酸杆菌和酵母菌分别于 37 ℃和 28 ℃条件下活化培养 24 h，离心收集菌体（4 600 r/min、4 ℃、10 min），无菌生理盐水（0.85% NaCl）洗涤 2 次后重悬于乳酸杆菌（MRS）和酵母菌（YPD）中，并调整其在波长 600 nm 处的吸光值为 1.00±0.05。移取 200 μL 菌悬液（自成膜）加入 96 孔板中（共成膜能力测定按酵母菌和乳酸杆菌菌悬液体积比 1∶1 添加），静置孵育 24 h。缓慢移去培养基，并用生理盐水洗涤 2 次。待干燥后，用 200 μL 的 1%结晶紫溶液染色 30 min，缓慢移去并洗涤多余染液，除去之后加入 200 μL 的 95%乙醇溶液，测定其在波长 595 nm 处的吸光度值。

1.3.8 数据处理与统计分析 试验结果均平行测定 3 次，结果用“平均值±标准差”表示，并采用 IBM SPSS 23 软件以及 OriginPro 9.1 软件对数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 雪莲菌中乳酸杆菌的分离纯化及初步鉴定

从雪莲菌颗粒中分离纯化得到 105 株疑似乳酸杆菌，其菌落呈现出不同的形态，白色、米白色、黄色，透明、不透明，表面光滑、表面粗糙，边缘整齐、边缘不整齐以及菌落扁平、菌落突起和圆润。其中部分代表性菌株的菌落形态及革兰氏染色镜检结果如图 1 所示。

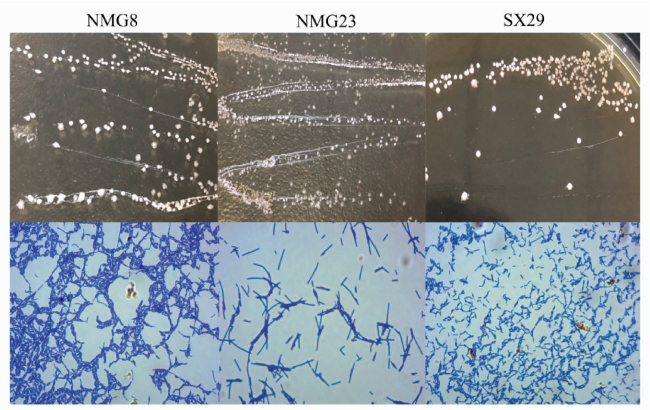


图 1 雪莲菌中分离得到的乳酸杆菌菌落形态及细胞形态

Fig.1 Colony and cell morphology of *Lactobacillus* from Tibet kefir

2.2 雪莲菌分离株 16S rRNA 序列鉴定

将分离纯化得到的部分疑似乳酸杆菌的 *16S rRNA* 基因与 NCBI 数据库序列进行比对，比对结果中序列同源性大于 99%的菌株鉴定为该种，并通过 MEGA-X 软件构建系统发育树。由图 2 可知，从雪莲菌分离到的乳酸杆菌分别被鉴定为开菲尔乳杆菌（*Lactobacillus kefiri*）、副干酪乳杆菌（*Lactobacillus paracasei*）、植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）。其中雪莲菌分离株 NMG2、AH6、NMG23、NMG12、NMG6、NMG3、LN55、SX9、SX8、SD16、NMG7、NMG5、NMG17、NMG14、NMG13、LN6、LN2、AH4、AH2 与开菲尔乳杆菌 YK7、16、KG-17 等的同源性达到 99%，故将其鉴定为开菲尔乳杆菌；分离株 SX13、SX29、LN4 与菌株副干酪乳杆菌 3328、2865 的同源性达 100%，故其被鉴定为副干酪乳杆菌；分离株 NMG8、NMG22、LN10 与菌株植物乳杆菌 AZZ4、4619 等的同源性达 99%，所以其鉴定结果为植物乳杆菌。

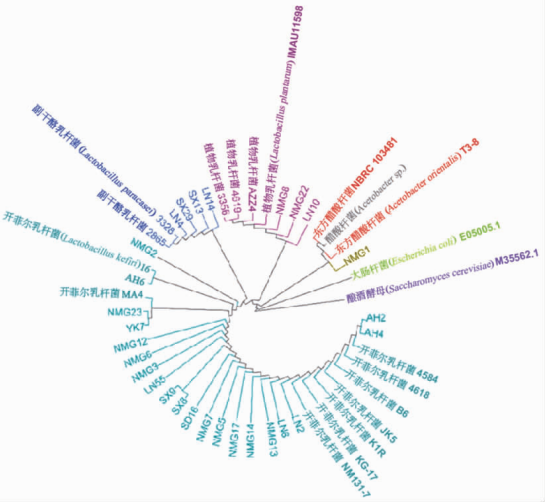


图 2 部分乳酸菌分离株系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of lactic acid bacteria isolates

2.3 雪莲菌发酵乳中产 SLP 乳酸杆菌的筛选

通过 5 mol/L LiCl 溶液（pH=2）分离提取乳杆菌表面 SLP，并通过 SDS-PAGE 电泳进行验证，共筛选到 19 株产 SLP 乳酸杆菌，它们的蛋白分子质量一致，在 70 ku 左右（图 1），其中 17 株为开菲尔乳杆菌，2 株为植物乳杆菌。Malamud 等[15]总结了分离自雪莲菌的不同开菲尔乳杆菌的 SLP 分子质量在 66~71 ku 范围内，这与上述试验结果相一

致。其中产量最高的菌株是开菲尔乳杆菌 AH2,蛋白质量浓度高达 1.16 g/mL(表 1)。不同的乳酸杆菌其 SLP 产量存在显著差异，表明不同菌株在 SLP 的合成与分泌上存在差异。

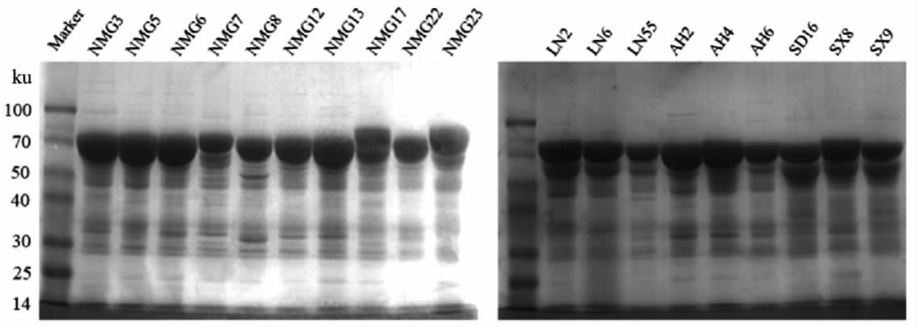


图 3　不同乳酸杆菌 SLP 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3　SDS-PAGE of SLP extracted from different *Lactobacillus*

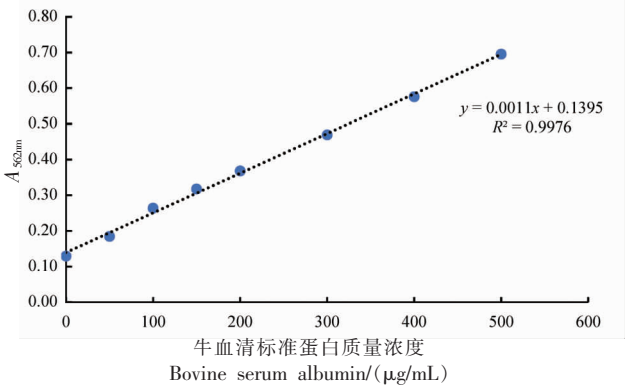


图 4　蛋白质含量标准曲线

Fig.4　Standard curve for protein contents

表 1　雪莲菌分离株 SLP 产量

Table 1　SLP production of the isolated strains from Tibet kefir

菌株编号	菌株名称	蛋白含量/(mg/mL)
NMG3	开菲尔乳杆菌(*Lactobacillus kefiri*)	1 143.10 ± 100.74[a]
NMG5	开菲尔乳杆菌	991.51 ± 92.76[b]
NMG6	开菲尔乳杆菌	1 070.87 ± 79.36[a]
NMG7	开菲尔乳杆菌	454.59 ± 44.55[g]
NMG8	植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)	463.31 ± 77.27[fg]
NMG12	开菲尔乳杆菌	586.69 ± 37.79[def]
NMG13	开菲尔乳杆菌	1 160.11 ± 62.19[a]
NMG17	开菲尔乳杆菌	749.52 ± 39.34[c]
NMG22	植物乳杆菌	527.87 ± 67.57[efg]
NMG23	开菲尔乳杆菌	975.97 ± 20.59[b]
LN2	开菲尔乳杆菌	1 063.47 ± 72.80[ab]
LN6	开菲尔乳杆菌	671.67 ± 31.99[cd]
LN55	开菲尔乳杆菌	561.15 ± 7.94[defg]
AH2	开菲尔乳杆菌	1 163.23 ± 5.62[a]
AH4	开菲尔乳杆菌	1 050.55 ± 61.70[ab]
AH6	开菲尔乳杆菌	557.76 ± 12.90[defg]
SD16	开菲尔乳杆菌	750.17 ± 23.84[c]
SX8	开菲尔乳杆菌	762.94 ± 53.72[c]
SX9	开菲尔乳杆菌	621.53 ± 21.83[de]

注:右上角不同字母表示差异显著(P<0.05)。

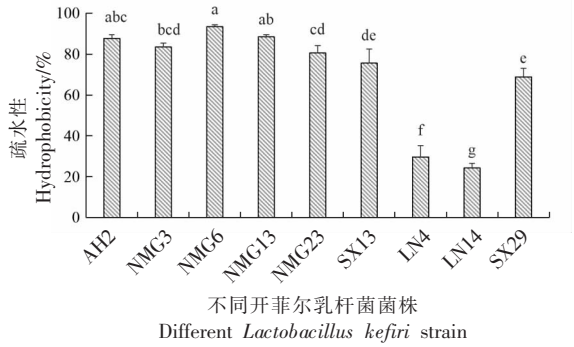
2.4　SLP 对乳酸杆菌黏附性及雪莲菌成粒的影响

乳酸杆菌作为雪莲菌的重要组成部分,对雪莲菌的成粒发挥着重要作用,而雪莲菌成粒的首要基础即菌体细胞的聚集黏附[9]。影响菌体黏附的因素包括特异性黏附和非特异性作用力。研究表明,乳酸杆菌的聚集黏附能力与细胞表面的蛋白质、多糖、糖蛋白、脂肪酸等成分息息相关[16]。作为参与细胞黏附的重要介质,SLP 对菌体表面特性的影响进行深入研究十分必要。

2.4.1　雪莲菌 SLP 对乳酸杆菌细胞表面特性的影响　为了明确 SLP 对乳酸杆菌的细胞表面疏水性和表面电荷性质的影响，本试验采用 MATS 法对比测定了产 SLP 和不产 SLP 的乳酸杆菌表面疏水性和表面电荷。选取十六烷(非极性)作为黏附剂进行疏水性测定,表面电荷的测定分别选

取三氯甲烷(氯仿)和乙酸乙酯,前者为酸性,后者为碱性。如图5结果所示,菌株开菲尔乳杆菌NMG6的表面疏水率最高,达93.49%。这与Kos等[17]的研究结果一致,即产SLP菌株嗜酸乳杆菌M92的表面疏水性显著高于非SLP产生菌株对照菌(70.96%)。除副干酪乳杆菌SX13外,表面含SLP的乳酸杆菌细胞的疏水率显著高于无SLP的菌株。结果表明,SLP的存在会影响细菌细胞表面理化特性,赋予细胞表面高疏水性,这一特性有利于细胞间的聚集[18]。

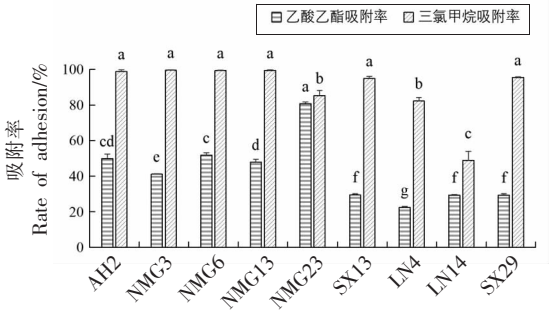
图6结果显示,除菌株开菲尔乳杆菌NMG23外,其余乳酸杆菌对三氯甲烷的吸附率均显著高于对乙酸乙酯的吸附率,说明这些菌株具有更强的给电子能力,细胞表面呈碱性,这与Kos等[17]和孙芝兰[19]的研究结果一致。然而,与产SLP菌株相比,不产SLP菌株只有副干酪乳杆菌LN4及LN14的三氯甲烷吸附率明显下降,表明SLP直接影响着菌株表面电荷性质。此外,副干酪乳杆菌NMG23对三氯甲烷和乙酸乙酯的吸附率均高达80%以上,表明其表面给电子能力和接受电子能力均较高,因此推断副干酪乳杆菌NMG23既能和表面带正电的细胞聚集,亦能与表面带负电的细胞聚集。



注:不同小写字母表示不同组别间的显著性差异(P<0.05);产SLP菌株为AH2、NMG3、NMG6、NMG13、NMG23;不产SLP菌株为SX13、LN4、LN14、SX29。

图5 雪莲菌不同分离株表面疏水性

Fig.5 Surface hydrophobicity of different *Lactobacillus* from Tibet kefir



注:不同小写字母表示不同组别间的显著性差异(P<0.05)。

图6 雪莲菌不同分离株的吸附性

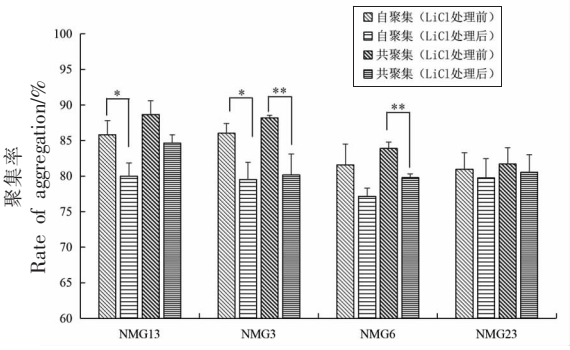
Fig.6 Adhesion of different *Lactobacillus* from Tibet kefir

2.4.2 雪莲菌SLP对乳酸杆菌细胞聚集和成膜特性的影响 同一菌株间的自聚集或不同菌株间的共聚集是生物膜形成的基础,是微生态体系得以稳定和长期共存的重要因素[20]。研究表明,具有益生特性的菌株与致病菌或肠上皮细胞之间通常具有较好的黏附能力[21-22]。雪莲菌作为一个微生态体系,菌体聚集能力是其长期稳定生长和繁殖的基础。通过对比测定LiCl溶液处理去除SLP前、后菌体的自聚集、与单孢酿酒酵母Y7的共聚集指标及生物膜量,研究SLP对菌体聚集的影响。结果显示(图7),与正常菌株相比,LiCl溶液处理去除乳酸杆菌表面SLP后,菌株的自聚集率和共聚集率发生了不同程度的下降。其中开菲尔乳杆菌NMG3的聚集率在处理去除SLP后均显著降低,菌株开菲尔乳杆菌NMG23的自聚集率和共聚集率变化不显著,平均自聚集率与共聚集率分别降低1.63%~7.56%和0.96%~10.63%。

图8结果显示,4株不同的开菲尔乳杆菌其生物膜形成率较高,OD_{595nm}的吸光度范围在3.5~4之间。这与Wang等[14]的结果一致,其研究中发现同样是来自雪莲菌的菌株,开菲尔乳杆菌生物膜形成能力最高。除了开菲尔乳杆菌NMG6,其余菌株在去除SLP后单独菌株的生物膜形成率及其与单孢酿酒酵母Y7混合培养的生物膜形成率均有所降低,菌株开菲尔乳杆菌NMG13经去除SLP后菌体形成的生物膜量没有显著变化。混合生物膜生长所对平均吸光度值减少范围为0.52 nm~1.13 nm。

结果表明,SLP虽然参与乳酸杆菌的聚集及

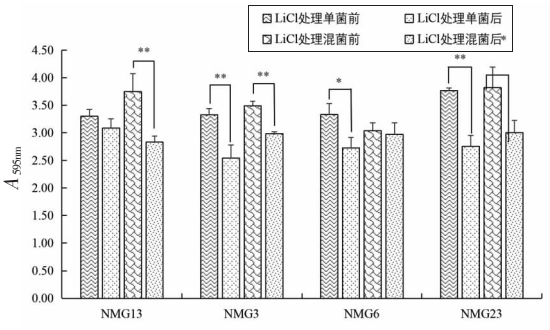
生物膜形成,但不是唯一的影响因素,SLP 影响程度的大小在不同菌株之间存在差异。这一结果也得到了 Golowczyc 等[23]的支持,他们发现开菲尔乳杆菌与脂解酵母(*Saccharomyces lipolytica*)的识别黏附过程有 SLP 的参与。



注:*、** 和 *** 表示不同组别间的显著性差异($P<0.05$、$P<0.01$ 以及 $P<0.001$)。

图 7　雪莲菌 SLP 对乳酸杆菌自聚集率和共聚集率的影响

Fig.7　Effects of SLP to auto-aggregation and co-aggregation of *Lactobacillus* from Tibet kefir



注:*、** 和 *** 表示不同组别间的显著性差异 ($P<0.05$、$P<0.01$ 以及 $P<0.001$)。

图 8　SLP 对雪莲菌分离株生物膜形成的影响

Fig.8　Effects of SLP to biofilm formation of *Lactobacillus* from Tibet kefir

3　结论

本研究从雪莲菌中分离筛选到 19 株产 SLP 的乳酸杆菌,经分子生物学鉴定其中 17 株均为开菲尔乳杆菌。经 SDS-PAGE 分析，雪莲菌中所得 SLP 分子质量约为 70 ku，不存在菌株间的差异。这些菌株所产 SLP 对其表面疏水性，表面电荷的影响有利于菌体间的聚集。通过自聚/共聚试验及生物膜形成能力测定，发现 SLP 对乳酸杆菌的黏附能力发挥促进作用,有利于生物膜的形成。开菲尔乳杆菌作为雪莲菌的优势菌之一，进一步探究其分泌蛋白 SLP 在雪莲菌共生体系中的功能,有助于解析雪莲菌中物种间共生关系及菌粒形成机制。

参　考　文　献

[1] COMERCI C J, HERRMANN J, YOON J, et al. Topologically-guided continuous protein crystallization controls bacterial surface layer self-assembly[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 2731.

[2] 石晓璐，张英春，张兰威，等. 乳酸杆菌 S-层蛋白的特性及功能性研究进展[J]. 微生物学通报，2017，44(5)：1206-1213.
SHI X L, ZHANG Y C, ZHANG L W, et al. Research progress on the features and functions of *Lactobacillus* S-layer protein[J]. Microbiology China, 2017, 44(5): 1206-1213.

[3] 王晓萌，高洁，韩张鹏，等. 高加索乳杆菌功能活性研究进展[J]. 中国酿造，2021，40(8)：20-23.
WANG X M, GAO J, HAN Z P, et al. Research progress on function activity of *Lactobacillus* kefiri[J]. China Brewing, 2021, 40(8): 20-23.

[4] WANG R, LUN J, ZHANG M, et al. The adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a human intestinal epithelial cell line requires S-layer proteins[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 44029.

[5] MAZZEO M F, REALE A, DI RENZO T, et al. Surface layer protein pattern of *Levilactobacillus brevis* strains investigated by proteomics[J]. Nutrients, 2022, 14(18): 3679.

[6] MENG J, WANG Y Y, HAO Y P. Protective function of surface layer protein from *Lactobacillus casei* fb05 against intestinal pathogens *in vitro*[J]. Biochem Bioph Res Co, 2021, 546: 15-20.

[7] AVALL-JAASKELAINEN S, PALVA A. *Lactobacillus* surface layers and their applications[J]. FEMS Mi-

crobiology Reviews, 2005, 29(3): 511-529.

[8] DE LEEUW E, LI X, LU W. Binding characteristics of the *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 surface layer to extracellular matrix proteins[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 260(2): 210-215.

[9] 李佳乐, 毛可敏, 桑亚新, 等. 雪莲菌颗粒形成机制研究进展[J]. 中国食品学报, 2021, 21(9): 386-396.
LI J L, MAO K M, SANG Y X, et al. Research progress on the formation mechanism of Tibet Kefir grains[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(9): 386-396.

[10] MOBILI P, SERRADELL MDE L, TREJO S A, et al. Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains[J]. Antonie Van Leeuwenhoek 2009, 95(4): 363-372.

[11] 李希羽, 高洁, 李云姣, 等. 水果酵素自然发酵过程中优势菌群与有机酸变化规律分析[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 61-68.
LI X Y, GAO J, LI Y J, et al. Analysis of the relationship between bacterial community composition and changes in organic acids during natural fermentation of mixed fruits[J]. Food Science, 2020, 41(24): 61-68.

[12] ZHANG Y C, XIANG X L, LU Q H, et al. Adhesions of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus* M5-L and Q8-L[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(2): 1011-1018.

[13] 孟珺. 乳杆菌表层蛋白的理化性质和生物学功能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
MENG J. Study of the physicochemical properties and biological functions of *Lactobacillus* surface layer proteins[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.

[14] WANG S Y, CHEN K N, LO Y M, et al. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain[J]. Food Microbiology, 2012, 32(2): 274-285.

[15] MALAMUD M, CARASI P, BRONSOMS S, et al. *Lactobacillus kefiri* shows inter-strain variations in the amino acid sequence of the S-layer proteins[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2017, 110(4): 515-530.

[16] ALP D, KULEASAN H, KORKUT ALTINTAS A. The importance of the S-layer on the adhesion and aggregation ability of lactic acid bacteria[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(5): 3449-3457.

[17] 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.

[18] JOE M M, SARAVANAN V S, SA T. Aggregation of selected plant growth promoting methylobacterium strains: Role of cell surface components and hydrophobicity[J]. Archives of Microbiology, 2013, 195(3): 219-225.

[19] 孙芝兰. 卷曲乳杆菌益生特性及黏附机理研究[D]. 青岛: 山东大学, 2012.
SUN Z L. Studies on the probiotic properties and adhesion mechanisms of *Lactobacillus crispatus*[D]. Qingdao: Shandong University, 2012.

[20] WONG L L, LU Y, HO J C S, et al. Surface-layer protein is a public-good matrix exopolymer for microbial community organisation in environmental anammox biofilms[J]. The ISME Journal, 2023, 17(6): 803-812.

[21] WANG G Q, ZHANG M H, ZHAO J X, et al. A surface protein from *Lactobacillus plantarum* increases the adhesion of *Lactobacillus* strains to human epithelial cells[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2858.

[22] AMIRKAMALI S, AZIMIRAD M, NASIRI G, et al. Surface layer protein A from hypervirulent *Clostridioides difficile ribotype* 001 can induce autophagy process in human intestinal epithelial cells[J]. Microbial Pathogenesis, 2022, 169: 105681.

[23] GOLOWCZYC M A, MOBILI P, GARROTE G L, et al. Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* iisolated from kefir grains: Evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins[J]. Journal of Dairy Research, 2009, 76(1): 111-116.

Screening and Adhesion Properties of S-layer Protein Producing *Lactobacillus* from Tibet Kefir

Cheng Tiantian, Li Jiale, Fu Mengqi, Li Meiqi, Sang Yaxin, Gao Jie*
(*College of Food Science and Technology*, *Hebei Agricultural University*, *Baoding 071000*, *Hebei*)

Abstract Objective: The surface layer protein (SLP) of *Lactobacillus*, possesses adhesive functionalities, including facilitating the adherence of bacterial cells to intestinal epithelial cells or stable binding to surface constituents of cells. This study aimed to explore the adhesion properties of the SLP of *Lactobacillus* in Tibet kefir and evaluate its impact on the aggregation among microorganisms and biofilm formation. Methods: SLP-producing strains were selected from Tibet kefir using conventional separation techniques and an acidic lithium chloride extraction method. The impact of SLP on the hydrophobicity and surface charge of bacterial cells was investigated by employing the microbial adhesion to solvents (MATS) assay. Finally, the self-aggregation rate of *Lactobacillus*, their co-aggregation rate with yeasts, and the capacity for biofilm formation were determined to assess the influence of SLP on microbial aggregation and biofilm formation within the Tibet kefir microbiota. Results: 19 strains of SLP-producing *Lactobacillus* from Tibet kefir, with SLPs exhibiting an average molecular weight of approximately 70 ku, and the highest production level reaching 1.16 g/mL. By comparing the surface characteristics and aggregation abilities of bacteria before and after the removal of SLP, it was found that the removal of SLP caused the average auto-aggregation rate and co-aggregation rate of bacteria to decrease by 1.63%-7.56% and 0.96%-10.63%, respectively, and the reduction range of the average absorbance value corresponding to the growth of the mixed biofilm was 0.52-1.13 nm. Conclusion: Tibet kefir was found to harbor an abundant population of high SLP-producing strains, with the majority representing dominant microbial species. As a critical component governing aggregation and adhesion abilities, SLP plays a pivotal role in the biofilm formation and stable propagation of the microbial community within Tibet kefir.

Keywords Tibet kefir; surface layer protein; aggregation; adhesion; biofilm