

LiaX 超表达增强副干酪乳酪杆菌 L9 的胁迫耐受性

刘 婷 马夏吟 严宁宁 陈诗豪 白景富

(长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410114)

摘要: [目的] 探究表面蛋白 LiaX 在副干酪乳酪杆菌 L9 抵抗外界胁迫 (如胆盐、抗生素和消化道环境) 中的保护作用。[方法] 通过构建 LiaX 超表达菌株并纯化其蛋白, 综合运用 Spent media、体外模拟消化及外源蛋白添加试验, 评估 LiaX 对菌株在消化、胆盐及抗生素胁迫下存活率的影响。[结果] 成功构建 LiaX 蛋白超表达菌株 LPL9psip0968his, 并分离纯化出 LiaX 蛋白。Spent media 试验和外源加入纯化的 LiaX 蛋白表明超表达 LiaX 菌株的破碎液在多种胁迫因素下对菌株具有显著的保护作用。体外模拟消化试验表明, LiaX 蛋白对菌株在模拟胃液和肠液消化过程中的存活率具有显著提升作用。[结论] LiaX 蛋白能显著增强菌株的胁迫抗性。
关键词: LiaX 蛋白; 超表达菌株; 抗生素胁迫; 胆盐胁迫

Overexpression of LiaX enhances stress tolerance in *Lacticaseibacillus paracasei* L9

Liu Ting Ma Xiayin Yan Ningning Chen Shihao Bai Jingfu

(School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology,
Changsha, Hunan 410114, China)

Abstract: [Objective] To investigate the protective role of the surface protein LiaX in *Lacticaseibacillus paracasei* L9 against external stresses, such as bile salts, antibiotics, and the gastrointestinal environment. [Methods] A LiaX-overexpressing strain was constructed and the protein was purified. Spent media assays, *in vitro* simulated digestion, and exogenous protein supplementation experiments were comprehensively employed to evaluate the effect of LiaX on the survival rate of the strain under digestive, bile salt, and antibiotic stresses. [Results] The LiaX-overexpressing strain LPL9psip0968his was successfully constructed, and the LiaX protein was isolated and purified. Spent media assays and exogenous addition of purified LiaX protein showed that the lysate of the LiaX-overexpressing strain exerted a significant protective effect on the bacteria under various stress conditions. *In vitro* simulated digestion experiments showed that LiaX significantly improved the survival rate of the strain during simulated gastric and intestinal digestion. [Conclusion] LiaX protein significantly enhances the stress resistance of the strain.

Keywords: LiaX protein; overexpression strain; antibiotic stress; bile salt stress

副干酪乳酪杆菌 (*Lacticaseibacillus paracasei*) L9 是一株源自长寿老人肠道的益生菌, 具备增强免疫、调节肠道菌群、改善肠道蠕动和缓解便秘等多种生理功能^[1-3]。此外, 副干酪乳酪杆菌 L9 在改善肠道代谢紊乱方面具有显著效果, 能够改善高脂饮食诱导的小鼠肝脏高脂血症和脂质积累^[4], 并增加干酪产品中游离氨基酸的数量^[5]。

然而, 益生乳酸菌在进入人体消化道后会遇到各种各样的环境胁迫, 如胃酸及肠道中的胆盐等^[6]。在长期肠道胁迫环境中, 益生菌形成了一系列胆盐耐受机制, 其中菌体表面蛋白在维持细胞膜完整性和抵抗胆盐入侵方面发挥关键作用。

胡斌等^[7]通过对嗜酸乳杆菌 NCFM 进行研究, 发现

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (编号: 32101914); 长沙理工大学研究生“实践创新与创业能力提升计划”项目 (编号: 0002008)

通信作者: 马夏吟 (1991—), 女, 长沙理工大学副教授, 博士。E-mail: 1137977621@qq.com

收稿日期: 2025-11-24 **改回日期:** 2026-03-09

引用格式: 刘婷, 马夏吟, 严宁宁, 等. LiaX 超表达增强副干酪乳酪杆菌 L9 的胁迫耐受性[J]. 食品与机械, 2026, 42(8): 132-139.

Citation: Liu Ting, Ma Xiayin, Yan Ningning, et al. Overexpression of LiaX enhances stress tolerance in *Lacticaseibacillus paracasei* L9 [J]. Food & Machinery, 2026, 42(8): 132-139.

随着其表层蛋白的再生,菌体胆盐存活率从 0 h 的 43.4% 提升至 8 h 的 81.8%,凸显出表层蛋白完整性对该菌在胆盐胁迫环境下生存的关键作用。一种被鉴定为 LiaX 的表面蛋白已被证明参与了胆汁应激抵抗,因为该基因的插入失活降低了副干酪乳酪杆菌 L9 的胆汁耐受性。突变株对甘氨酸脱氧胆酸盐(GDCA)比对其他胆盐成分更敏感^[8]。LiaX 蛋白可作为识别达托霉素(DAP)的传感器,并参与粪肠球菌和屎肠球菌的 DAP 耐药机制,在对 DAP 耐药的粪肠球菌株中 LiaX 的表达增加,并且 LiaX 的 N-末端结构域可以直接与 DAP 结合,从而避免抗生素的进入^[9-10]。此外,*liaX* 基因的功能缺失突变能够增强对 DAP 的耐药性^[11]。Panesso Botero 等^[12]研究发现,添加外源 LiaX 可以增加粪肠球菌在 DAP 胁迫下的存活率,这依赖于 LiaX 和 LiaF 之间的相互作用。Yan 等^[13]研究发现,在胆盐胁迫下,LiaX 通过调控细胞膜蛋白、氧化还原相关基因及脂肪酸代谢基因的表达,参与细胞膜重塑和胞内氧化还原状态调节,进而对副干酪乳酪杆菌 L9 的生理功能发挥关键作用。

研究拟通过构建 LiaX 超表达菌株实现 LiaX 的超表达,并通过测定消化过程中、抗生素胁迫和胆盐胁迫等各种胁迫环境下菌株的存活率变化,验证 LiaX 对菌株在胁迫环境下的保护作用,以期为开发更具竞争力的益生菌制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

副干酪乳酪杆菌 L9 野生菌株(L9GN):分离自广西巴马长寿老人肠道;

LPL9_0968⁻菌株:L9GN 野生菌株 *liaX* 基因(*LPL9_0968*)插入失活突变株,通过同源重组单交换法^[8]构建;

MRS(man-rogosa-sharpe)培养基:广东环凯生物科技股份有限公司;

红霉素:纯度≥95%,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;

猪胆盐、考马斯亮蓝 R250:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;

猪胃蛋白酶、猪胰蛋白酶、猪胰脂肪酶、GDCA:纯度≥95%,美国 Sigma 公司;

DAP:上海士峰生物科技有限公司;

氯霉素(CAP):分析纯,北京索莱宝科技有限公司;

氨苄西林(AMP):分析纯,北京酷来搏科技有限公司;

Ni Smart Beads 6FF 填料:常州天地人和生物技术有限公司;

SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液:北京兰杰柯科技有限

公司;

诱导肽:纯度≥95%,南京肽谷生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器与设备

分光光度计:NanoDrop™ ND-2000 型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

超声波破碎仪:JY92-IIN 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

超微量核酸蛋白测定仪:Nano-300 型,上海嘉鹏科技有限公司;

电泳仪:DYY-12 型,北京市六一仪器厂;

台式低速离心机:LD5-10 型,北京京立离心机有限公司;

台式高速冷冻离心机:CenLee 16R 型,湖南湘立科学仪器有限公司;

电子分析天平:AUY120 型,日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 带有 His 标签 LiaX 蛋白超表达菌株构建 采用 Primer-BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/Primer-Blast/>)设计引物于表 1,以 FastPure® bacterium DNA 试剂盒提取的副干酪乳酪杆菌 L9 基因组为模板,通过 PCR 扩增 *LPL9_0968* 基因,在蛋白 LiaX 的 C 端引入 6 个组氨酸序列。

表 1 试验设计引物

Table 1 Primers designed for this experiment

引物名称	PCR 引物 (5'-3')	长度/bp
LPL9_0968-F-NcoI	CATGCCATGGGGAATGA ACGCGAAAGAA	28
LPL9_0968-R-KpnI	CCGGAATTCGCAATCCC CTCAGTCATTGTA	30
LPL9_0968His-R-KpnI	CCGGAATTCCTAGAAAT CGCTCCAGTCAT	29

将纯化的 PCR 产物和载体 pSIP411 进行双酶切并连接,并将重组质粒电转化入副干酪乳酪杆菌 L9 中,获得 LiaX 超表达菌株 L9psip0968his,同时将不含目的基因的空质粒 pSIP400 通过电转化转入副干酪乳酪杆菌 L9 中,获得对照菌株 L9psip400。提取重组质粒进行凝胶电泳检测,并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。

1.2.2 LiaX 蛋白纯化 将活化好的菌株 LPL9psip0968his 和 LPL9psip400 培养至 OD₆₀₀ 值为 0.3,加入诱导肽(5 ng/mL)进行诱导,待培养至 OD₆₀₀ 值为 1.8 时收集菌体(6 000×g, 5 min),加入 2 mL PBS 重悬后,利用超声破碎 10 min。离心收集上清,-20℃保存待用。

采用 Ni Smart Beads 6FF 填料和亲和层析柱,通过重力法对重组蛋白进行亲和纯化。将填料混匀后取 2 mL 离

心(500×g, 5 min), 弃上清。先后加入 5 mL 超纯水和 5 mL 结合液, 分别轻摇 3 min 后离心弃上清。用 2 mL 结合液重悬填料, 加入约 3×柱床体积的样品的蛋白样品, 置于往复式摇床轻摇 1 h。将混合物转移至组装好的 PD-10 纯化柱中, 收集流出液。用 4 mL 结合液洗涤填料两次, 收集洗涤液, 随后分别使用 1 mL 含有不同浓度咪唑(50, 100, 150, 200, 250, 300, 500 mmol/L)的洗脱液进行分级洗脱, 收集洗脱液。利用 SDS-PAGE 检测蛋白纯度, 取目的蛋白纯度最高的浓度作为洗脱浓度, 使用合适截留分子量的超滤管进行超滤浓缩与脱盐。首先在 4 ℃、8 000×g 条件下多次离心, 每次 20 min, 并重复加入 PBS 进行稀释—浓缩操作, 直至将体系中的咪唑浓度降至 0.1 mmol/L 以下。最后将蛋白浓缩至约 200 μL, 取样测定蛋白浓度后于 -20 ℃保存。用 NanoDrop™ ND-2000 分光光度计测定蛋白量。

1.2.3 LiaX 蛋白的超表达及纯化验证 对纯化后的 LPL9psip0968his、LPL9psip400、LPL9psip0968his(诱导)和 LPL9psip400(诱导)按照 4:1 向样品蛋白溶液中加入 5×的蛋白上样缓冲液, 室温放置 30 min 后放入沸水浴煮沸 5 min, 14 000 r/min 离心 5 min 进行电泳检测。

1.2.4 Spent media 试验验证 LiaX 蛋白在胆盐和抗生素胁迫下的保护作用 将菌株 LPL9psip0968his 和 LPL9psip400 培养到 OD₆₀₀ 值为 0.3, 加入诱导肽(50 ng/mL)培养至 OD₆₀₀ 值为 1.8, 分别取 20 mL 菌液进行超声破碎, 离心弃菌体取上清再次破碎浓缩至 10 mL, 0.22 μm 滤膜过滤除菌后分装, 4 ℃保存。将过夜活化后的 LPL9_0968⁻培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6 时将菌液分装至 2 mL 离心管, 离心后弃上清, 将 LPL9psip0968his 和 LPL9psip400 的 spent media 按照不同比例(体积分数 0.0%, 25.0%, 37.5%, 50.0%)加入新鲜的 MRS 培养基中后每管分装 2 mL, 接着将不同浓度 GDCA、DAP、AMP 和 CAP 分别加入到以上含有菌体的离心管中, 37 ℃培养 2 h 进行胁迫处理, 后对菌液进行梯度稀释, MRS 固体平板 37 ℃培养 48 h 后进行平板计数记录各样品的菌落数(CFU), 通过式(1)计算不同浓度不同样品中副干酪乳酪杆菌 L9 的存活率。

$$S_R = \frac{N}{N_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

S_R ——存活率, %;

N ——胁迫处理后(特定时间点)的菌落数, CFU;

N_0 ——初始状态的菌落数, CFU。

1.2.5 体外模拟消化过程中菌株存活率测定 体外消化模拟依照 Brodtkorb 等^[14]的方法进行测定。活化菌株 LPL9GN、LPL9_0968⁻、LPL9psip0968his 和 LPL9psip400, 各取 1 mL 菌液分别加入 29 mL 超纯水制备“食物消化液”, 使体系中活菌数达到 1×10^9 CFU。胃消化阶段

(SGF): 取 30 mL 食物或消化液, 加入 24 mL 1.25×消化液原液、0.015 mL 二水氯化钙和胃蛋白酶(使总消化液中酶活性达到 2 000 U/mL), 用 5 mol/L HCl 调 pH 至 3.0, 再加入 pH 3.0 的去离子水定容至 60 mL, 于 37 ℃、100 r/min 下孵育 2 h; 共制备 60 mL×2: 一管混匀后按照 5 个时间点(0, 30, 60, 90, 120 min)分成 5 管, 每管 10 mL 混合液; 另一管置于同一环境中连续孵育 2 h, 用于肠消化阶段(SIF)消化液的制备; 肠消化阶段(SIF): 用胃消化阶段 60 mL 混合液制备出 120 mL, 加入 48 mL 1.25×消化液原液、0.12 mL 二水氯化钙以及胰蛋白酶、胰脂肪酶(使总消化液中酶活性分别达到 100, 2 000 U/mL)和胆盐(使终浓度为 10 mmol/L), 用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 再加入 pH 7.0 的去离子水定容至 120 mL, 同样于 37 ℃、100 r/min 下孵育 2 h, 混匀后取出 60 mL 混合液, 按照 5 个时间点(0, 30, 60, 90, 120 min)分成 5 管, 每管 10 mL 混合液, 取样, 稀释 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 至 MRS(含红霉素)固体培养基平板; 样品设置: 每个时间点一管, 间隔收集, 取样稀释, 滴板, MRS 平板 37 ℃培养 48 h, 孵育后计数。剩下的样品于 -20 ℃保存。按式(1)计算存活率。

1.2.6 胆盐和抗生素胁迫试验 将经过诱导后的 LPL9psip0968his 和 LPL9psip400 菌株在 MRS 培养基中培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6, 离心后弃上清, 将诱导提取及纯化浓缩后的蛋白分别按照不同浓度(0, 50, 100 nmol/L)加入新鲜的 MRS 培养基中后每管分装 2 mL, 接着将 GDCA(0.025%)、DAP(300 μg/mL)、AMP(15 μg/mL)分别加入到以上含有菌体的离心管中。37 ℃培养 2 h 进行胁迫处理, 之后对菌液进行梯度稀释, MRS 固体平板 37 ℃培养 48 h 后进行平板计数, 记录各样品的 CFU, 通过式(1)计算不同浓度不同样品中 LPL9_0968⁻的存活率。

2 结果与讨论

2.1 LiaX 蛋白超表达菌株的构建

利用 pSIP 系列质粒作为载体, 插入 *liaX* 基因 *LPLP_0968*, 在副干酪乳酪杆菌 L9 中实现 LiaX 的同源超表达。先根据 *LPL9_0968* 序列设计引物, 并在 LiaX 蛋白 C 段引入 6 个组氨酸标签, 然后以副干酪乳酪杆菌 L9 基因组为模板对目的基因进行扩增。将纯化后的 PCR 产物和 pSIP 载体同时进行双酶切并通过连接酶实现连接。将连接产物通过电转化转入副干酪乳酪杆菌 L9, 在红霉素筛选压力下获得携带重组质粒的菌株 LPL9psip0968his。提取重组质粒进行测序, 结果如图 1 所示, 重组质粒携带完整 *liaX* 基因序列。此外, 将不携带外源基因的质粒 pSIP400 电转化入 L9 中, 获得菌株 LPL9psip400 作为空白对照。

利用蛋白电泳检测 LPL9psip0968his 菌株中 LiaX 蛋白超表达情况。如图 2 所示, 空白对照菌株 LPL9psip400 在未诱导及诱导的情况下均未观察到目的蛋白超表达

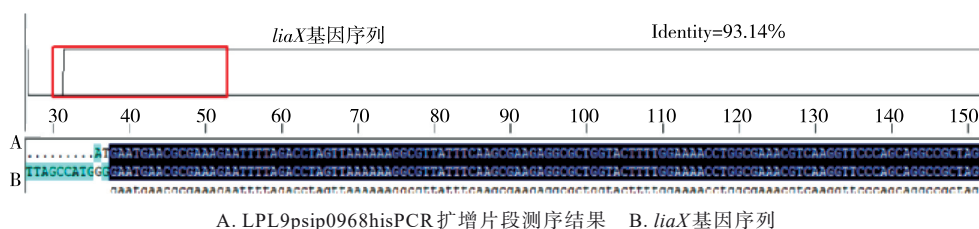
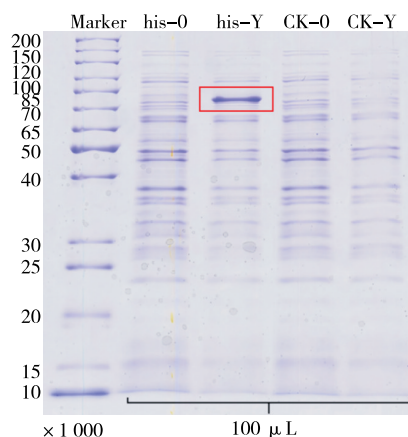


图1 LPL9psip0968his PCR 扩增序列比对

Figure 1 Sequence alignment of PCR amplification of LPL9psip0968his

现象(CK-0 和 CK-Y 比较),超表达菌株 LPL9psip0968his 在未诱导情况下也无 LiaX 蛋白超表达,只有超表达菌株经诱导后发现了目的蛋白的超表达(his-0 和 his-Y 比较,红框内为 LiaX 蛋白)。以上结果表明,LPL9psip0968his 菌株经诱导可实现 LiaX 蛋白的超表达,可用于后续试验。



his. LiaX 超表达菌株 CK. 空白对照菌株 0. 未加诱导剂 Y. 加入诱导剂

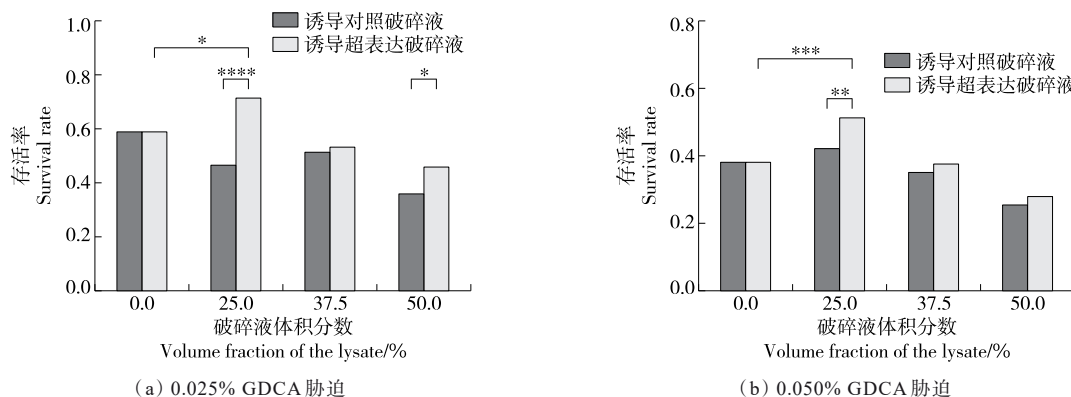
图2 LiaX 超表达菌株及对对照株诱导表达后蛋白条带差异
Figure 2 Differences in protein bands after induction of LiaX overexpression strains and control strains

2.2 Spent media 试验

为了研究 LiaX 蛋白对菌株在胁迫环境下的保护作用,通过 Spent media 考察 LPL9psip0968his 菌株诱导发酵后细胞破碎液在胁迫试验中的效果。如图3所示,破碎液体积分数为25%时,体积分数0.025%和0.050% GDCA 胁迫下细胞破碎液对菌株具有显著的保护作用。随着破碎液比例增加,其对菌株的保护作用逐渐减弱甚至消失,可能是由于破碎液浓度升高导致新鲜 MRS 培养基比例下降,营养物质不足进而抑制菌体生长。破碎液体积分数为25%时,体积分数0.050% GDCA 胁迫下保护作用比体积分数0.025% GDCA 胁迫下更为显著。这可能是由于高浓度 GDCA 胁迫导致菌体更低的存活率或者引起 LiaX 更大程度地响应及参与胆盐胁迫抗性机制。

前期研究^[13]发现,LiaX 插入失活突变株导致菌株 LPL9_0968⁻在胆盐胁迫下存活率显著降低,同时出现细胞膜受损程度严重以及细胞表面稳定性变差等现象,证实环境中存在 LiaX 是发挥保护作用的必要条件。试验进一步构建了 LiaX 同源超表达菌株,并通过胁迫试验证实了超表达 LiaX 使得菌株胆盐耐受能力提升,从而再次证实了 LiaX 蛋白在菌株胆盐胁迫抗性机制中起重要作用。

为了进一步探究 LiaX 蛋白超表达菌株对于其他环境胁迫(抗生素)是否具有更强的抵抗能力,测定 DAP、AMP 和 CAP 3 种抗生素胁迫下菌株的存活率。如图4所示,在



*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$; ****表示 $P < 0.0001$

图3 GDCA 胁迫下加入 spent media 后的菌株存活率

Figure 3 Survival rate of strains after the addition of spent media under GDCA stress

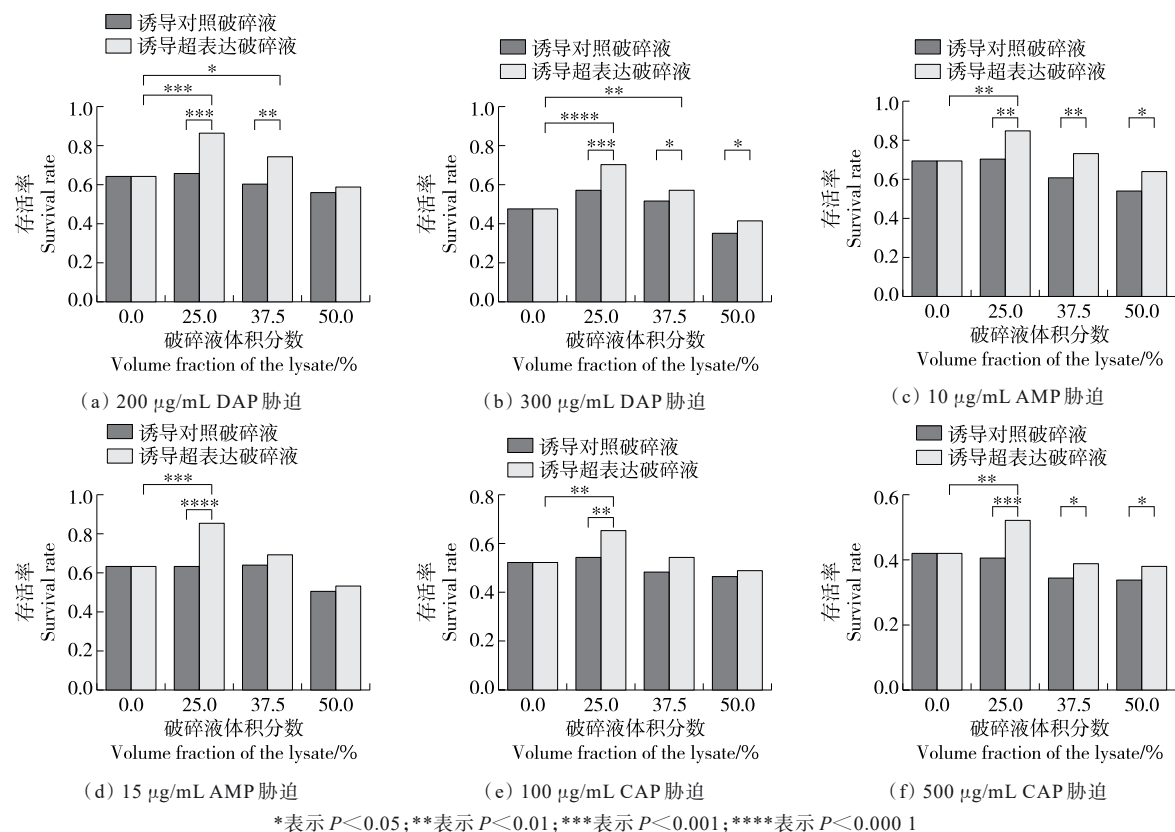


图4 菌株在抗生素胁迫下的存活率

Figure 4 Survival rate of strains under antibiotic stress

3种抗生素胁迫下,随着抗生素浓度增大,菌株存活率均降低;LiaX超表达菌株破碎液对于3种抗生素胁迫下菌株的存活率都有一定程度的提升,其中DAP胁迫下,保护效果最好,而在CAP胁迫下效果微弱。破碎液体积分数为25%时,LiaX蛋白对菌株的保护作用最为显著。这可能是由于破碎液体积分数过低(0%)时,体系缺乏足够的LiaX蛋白以提供有效的保护作用。而当破碎液体积分数过高(50%)时,其中积累的代谢副产物(如有机酸、细菌素或其他蛋白酶类)可能对菌株产生额外的生长抑制或毒性效应,从而抵消LiaX介导的保护作用。此外,尽管破碎液中含有一定营养成分,但过高比例可能导致pH或渗透压等环境参数偏离适宜范围,进而在胁迫条件下不利于菌体的存活与生长。

Khan等^[10]研究发现,DAP耐受菌株的上清液(含过量LiaX)能增强敏感菌株的DAP耐药性,且其效果随细胞外LiaX积累量的增加而增强。结合先前研究^[13],表明LiaX缺失导致突变菌株细胞完整性受到影响,同时使菌株在抗生素胁迫下存活率下降,由于抗生素作用机制不同,LiaX蛋白对菌株保护效果不同,GDCA、DAP保护效果好可能是因为其作用于细胞膜,而CAP只与核糖体亚单位相互作用。因此LiaX蛋白可能通过增强细胞膜的合

成或修复机制,提高菌株对抗生素的耐受性,尤其在GDCA、DAP和AMP胁迫下表现显著,表明LiaX在响应胁迫信号、激活LiaFSR系统以调控细胞膜重塑等方面具有重要作用。

2.3 体外模拟消化试验

为了研究超表达LiaX蛋白对菌株存活率的影响,评估副干酪乳酪杆菌L9野生菌株(LPL9GN)及其3株衍生菌株(LPL9_0968⁻、LPL9psip0968his、LPL9psip400)SGF和SIF消化过程中的存活能力。如图5所示,随着消化过程的进行,4组菌株的存活率均出现下降。LPL9_0968⁻的存活率下降程度高于野生株L9GN,这是因为突变株缺失LiaX蛋白导致细胞膜稳定性降低,抗氧化活性下降,加重了消化环境中低pH值及胆盐等对菌体细胞表面的损伤。L9psip0968his存活率在消化全过程中均高于L9psip400对照菌株,在SIF阶段差异更为显著。益生菌在胃肠道中的存活情况分别受到胃酸和胆盐的影响^[15-16]。胃液中低pH环境和肠液中胆盐的积累均会导致蛋白质聚集和细胞内失衡,最终致使细胞死亡^[17]。以上结果表明,LiaX超表达能够提升菌株在消化环境中的存活率,尤其对肠道中的胆盐胁迫具有较好的抗性。

耐酸和耐胆盐能力是益生菌在宿主肠道中成功定植

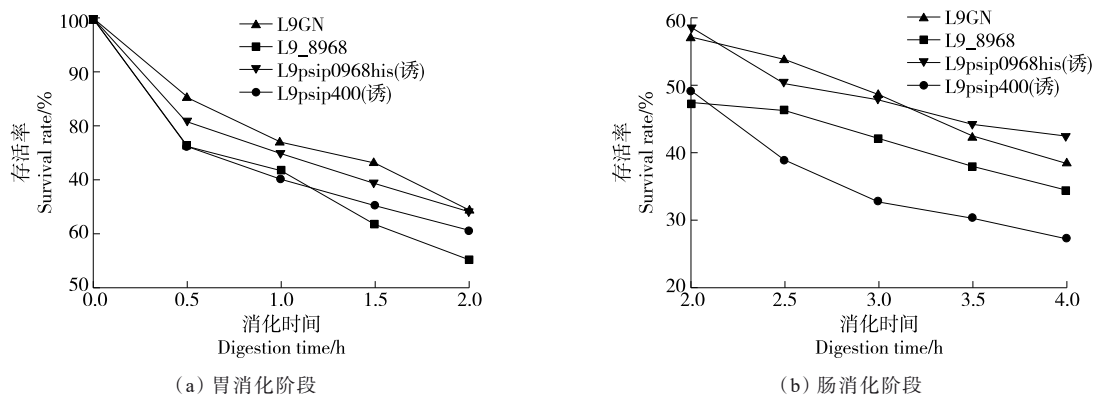


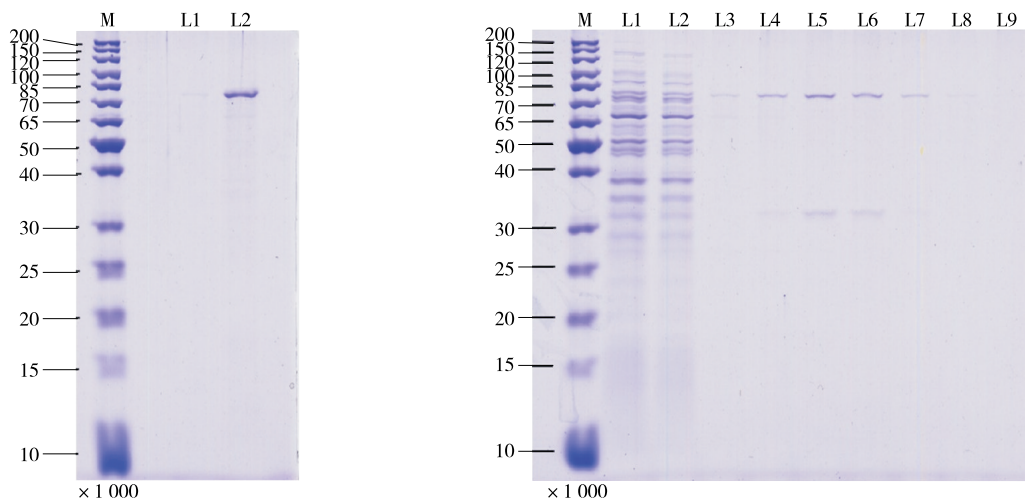
图5 菌株在体外模拟消化过程中的存活率

Figure 5 Survival rate of strains during an *in vitro* simulated digestion process

并发挥益生功能的关键^[18]。研究进一步证实了LiaX蛋白的超表达可以显著提高菌株在体外模拟消化过程中的存活率,可能是SIF阶段由于胆盐的进入,L9psip0968his菌株超表达过量的LiaX可以成功响应胆盐胁迫激活胞内LiaFSR系统调控胞内细胞膜重塑,氧化还原调控因子等以应对胆盐胁迫^[19-20]。LiaX蛋白可能通过增强细胞壁的合成或修复机制,提高菌株对消化液中酶和酸性环境的耐受性,这种保护作用对于益生菌在消化道中的存活和功能发挥至关重要^[21]。

2.4 LiaX蛋白的纯化

为了验证以上试验中破碎液对菌株环境胁迫抗性的提升是其中LiaX蛋白造成的,对L9psip0968his表达的LiaX蛋白进行纯化。通过镍柱洗脱纯化和超滤富集后,结果如图6(a)所示,对照株L9psip400洗脱液CK-400中未检出目的蛋白,超滤管浓缩后也未见蛋白;超表达菌株L9psip0968his蛋白纯化如图6(b)所示,咪唑梯度洗脱后在相对分子质量80 000左右出现条带,超滤浓缩后目的条带单一,表明获得的LiaX蛋白纯度可用于后续试验。



L1. 浓缩的纯化对照株L9psip400蛋白样品 L2. 浓缩的纯化超表达菌株L9psip0968his蛋白样品

(a) 浓缩的L9psip400和L9psip0968his蛋白

M. Marker L1. 样品流穿 L2. 缓冲液洗脱 L3~L9. 50, 100, 150, 200, 250, 300, 500 mmol/L 咪唑洗脱液

(b) L9psip0968his蛋白

图6 诱导后L9psip400和L9psip0968his蛋白纯化样品SDS-PAGE电泳

Figure 6 SDS-PAGE electrophoresis of the purified samples of L9psip400 and L9psip0968his proteins after induction

使用NanoDrop分光光度计测定纯化蛋白样品浓度及质量,以便于计算后续外源加入LiaX蛋白的量。如表2所示,浓缩前蛋白样品质量浓度为0.091 mg/mL,浓缩后质量浓度为1.886 mg/mL。根据测定浓度计算外源添加量。

2.5 LiaX蛋白对菌株胆盐及抗生素胁迫下的保护作用

通过外源添加LiaX蛋白验证对菌株胆盐及抗生素胁迫下的保护作用,由于破碎液研究中CAP效果不明显,因此不考虑CAP。如图7所示,与空白组相比,不同添加量下,所有外源添加LiaX蛋白组菌株存活率均出现显著提

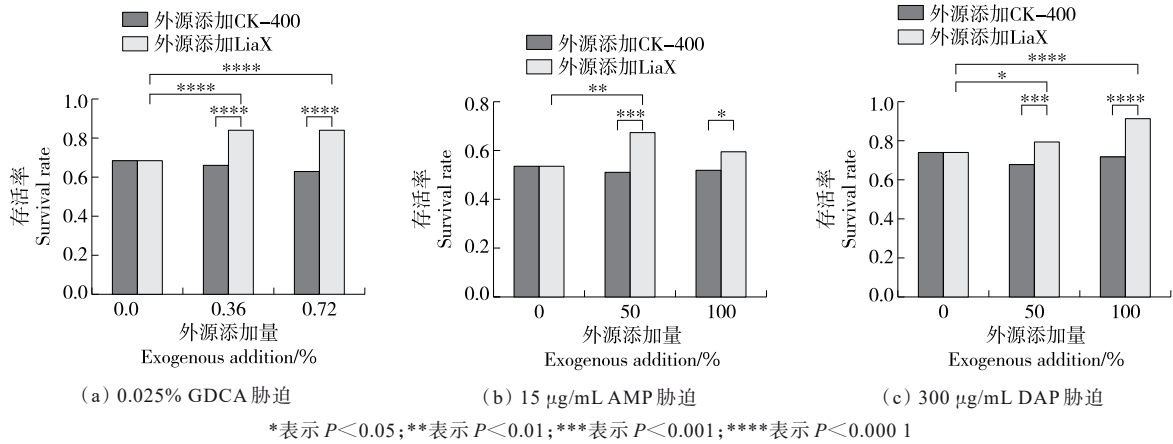


图7 外源添加 LiaX 蛋白后 L9_0968⁻在 GDCA 和抗生素下的存活率

Figure 7 Survival rate of L9_0968⁻ after the exogenous addition of LiaX protein under GDCA and antibiotic stresses

表2 纯化蛋白液质量浓度

Table 2 Concentrations of purified protein samples

蛋白样品	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
L9psip0968his(浓缩前)	0.091	1.58
L9psip0968his(浓缩后)	1.886	1.65

高。在 GDCA 胁迫下,添加量 0.72%(100 nmol/L)条件下菌株存活率显著提升 1.4 倍;在 DAP 胁迫下,添加量 0.72%(100 nmol/L)条件下菌株存活率显著提升 1.3 倍;在 AMP 胁迫下,添加量 0.36%(50 nmol/L)条件下菌株存活率显著提升 1.2 倍。以上结果表明,外源添加 LiaX 蛋白对菌株在多种胁迫环境中的存活均具有显著的保护作用。

与 Yan 等^[13]的研究相似,L9psip0968his 菌株在胆盐胁迫及抗生素胁迫下也存在该现象,其中 LiaX 作为一个哨兵,能感知外界胆盐及抗生素胁迫,可能通过 LiaFSR 系统的其他跨膜成分发出信号,激活包膜应激反应,从而调控细胞膜的重塑及胞内氧化还原平衡等^[9]。综上所述,LiaX 蛋白在益生菌的感应外界胁迫及胆盐抗性机制中扮演着重要角色。

3 结论

研究综合考察了 LiaX 蛋白在副干酪乳杆菌胁迫抗性中的作用,通过蛋白电泳验证实现目的蛋白在超表达菌株中的表达,成功构建超表达菌株 LPL9psip0968his 和对照株 LPL9psip400 并对其进行诱导提取纯化得到 LiaX 蛋白。利用超表达菌株 LPL9psip0968his 和对照株 LPL9psip400 的破碎液首先通过 Spent media 试验,在多种胁迫条件(甘氨酸脱氧胆酸盐、氨苄西林、达托霉素及氯霉素)下对菌株存活率进行测定,评估破碎液中的 LiaX 蛋白对菌株的保护能力;其次通过外源加入 LiaX 蛋白再次进一步证实 LiaX 蛋白在多种胁迫条件(甘氨酸脱氧胆酸盐、氨苄西林、达托霉素)下对菌株的保护能力;此外,利

用体外模拟消化试验评估了不同菌株在模拟胃液和肠液消化过程中的存活率,超表达 LiaX 的菌株在整个消化过程中存活率下降程度小于对照株,尤其是在肠液消化阶段,LiaX 的超表达对菌株的保护作用更为明显。结果表明,LiaX 蛋白能显著增强菌株在多种胁迫环境中的存活能力,liaX 基因对菌株具有保护作用,在提高乳酸菌消化道耐受性方面具有重要意义。

参考文献

[1] 宋静颐,张明,刘松玲,等.副干酪乳杆菌 L9 安全性评价[J].中国奶牛,2015(21): 27-31.
Song J Y, Zhang M, Liu S L, et al. Safety evaluation of *Lactobacillus paracasei* L9[J]. China Dairy Cattle, 2015(21): 27-31.

[2] 余萍,曹蓝,矫艳平,等.副干酪乳杆菌 HCS17-040 的筛选鉴定及其益生特性[J].食品与机械,2021,37(11): 28-33, 129.
Yu P, Cao L, Jiao Y P, et al. Screening of *Lactobacillus paracasei* HCS17-040 with triglyceride tunction and study on its probiotic characteristics[J]. Food & Machinery, 2021, 37(11): 28-33, 129.

[3] 王然,李桂花,王鹏杰,等.灭活型副干酪乳杆菌 L9 常温酸奶调节肠道菌群缓解便秘作用研究[J].食品科学技术学报,2020,38(3): 95-101.
Wang R, Li G H, Wang P J, et al. Effect of non-viable *Lactobacillus paracasei* L9 in normal temperature yogurt on modulating gut microbiota and relieving constipation[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(3): 95-101.

[4] Sun N Y, Chen S B, Li Y X. *Lactobacillus paracasei* L9 ameliorated obesity-associated metabolic parameters and relevant gut microbiota in mice fed a high-fat diet[J]. Nutrition Research, 2023, 115: 26-37.

[5] 唐素婷,区锡敏,黄桂东,等.酱油渣中副干酪乳杆菌的分离鉴定及抗氧化特性研究[J].食品与机械,2019,35(10): 11-

- 17, 23.
- Tang S T, Ou X M, Huang G D, et al. Isolation, identification and antioxidant properties of *Lactobacillus paracasei* from soy sauce residue[J]. Food & Machinery, 2019, 35(10): 11-17, 23.
- [6] 胡敏, 黄涛, 彭珍, 等. 胆盐对植物乳杆菌NCU116应激基因和关键生理指标的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(9): 1-8.
- Hu M, Huang T, Peng Z, et al. Influences of bile salts on stress genes and key physiological indexes of *Lactobacillus plantarum* NCU116[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(9): 1-8.
- [7] 胡斌, 田丰伟, 赵建新, 等. 嗜酸乳杆菌NCFM表层蛋白的提取及其与菌体酸和胆盐耐受及粘附性能的关系[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 118-121.
- Hu B, Tian F W, Zhao J X, et al. Extraction of surface layer protein from *Lactobacillus acidophilus* NCFM and the relationship among SLP and strain acid, bile resistance and cell adhesion[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(5): 118-121.
- [8] 王艳美, 刘永乐, 邓凯, 等. LiaX家族表面蛋白LPL9_0968在副干酪乳杆菌L9胆盐胁迫应激中的作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(12): 104-115.
- Wang Y M, Liu Y L, Deng K, et al. Role of LiaX family surface protein LPL9_0968 in bile salt stress resistance in *Lactocaseibacillus paracasei* L9[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(12): 104-115.
- [9] Axell-House D B, Simar S R, Panesso D, et al. LiaX is a surrogate marker for cell envelope stress and daptomycin non-susceptibility in *Enterococcus faecium*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2024, 68(3): e0106923.
- [10] Khan A, Davlieva M, Panesso D, et al. Antimicrobial sensing coupled with cell membrane remodeling mediates antibiotic resistance and virulence in *Enterococcus faecalis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(52): 26 925-26 932.
- [11] Ota Y, Furuhashi K, Hayashi W, et al. Daptomycin resistant *Enterococcus faecalis* has a mutation in LiaX, which encodes a surface protein that inhibits the LiaFSR systems and cell membrane remodeling[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2021, 27(1): 90-93.
- [12] Panesso Botero D, Singh K, Gomez-Villegas S I, et al. LiaF is required for LiaX mediated protection against Daptomycin and LL-37 in *Enterococcus faecalis* OG1RF[J]. Open Forum Infectious Diseases, 2022, 9(Suppl 2): ofac492.157.
- [13] Yan N N, Luo T, Wang Y M, et al. Transcriptomic and biochemical analyses reveal the cell membrane defense regulated by LiaFSR-LiaX system in *Lactocaseibacillus paracasei* L9 under bile salt stress[J]. Food Bioscience, 2024, 62: 105145.
- [14] Brodkorb A, Egger L, Alminger M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion[J]. Nature Protocols, 2019, 14(4): 991-1 014.
- [15] Liu H, Cui S W, Chen M S, et al. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(17): 2 863-2 878.
- [16] Zhang Y, Xie Y F, Liu H, et al. Probiotic encapsulation in water-in-oil high internal phase emulsions: enhancement of viability under food and gastrointestinal conditions[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 163: 113499.
- [17] Kaur Sidhu M, Lyu F, Sharkie T P, et al. Probiotic yogurt fortified with chickpea flour: physico-chemical properties and probiotic survival during storage and simulated gastrointestinal transit[J]. Foods, 2020, 9(9): 1 144.
- [18] 王露霏, 王彩云, 李嘉文, 等. 双歧杆菌四联活菌体外模拟消化液耐受性的考察[J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(11): 1 280-1 285, 1 291.
- Wang L F, Wang C Y, Li J W, et al. The tolerance of *Bifidobacterium-quaduple* probiotics to the simulated digestive fluid *in vitro*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2023, 35(11): 1 280-1 285, 1 291.
- [19] Vega L A, Sanson-Iglesias M, Mukherjee P, et al. LiaR-dependent gene expression contributes to antimicrobial responses in group A *Streptococcus*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2024, 68(12): e0049624.
- [20] Tymoszevska A, Szylińska M, Aleksandrak-Piekarczyk T. The LiaFSR-LiaX system mediates resistance of *Enterococcus faecium* to peptide antibiotics and to aureocin A53- and enterocin L50- like bacteriocins[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(3): e00343-23.
- [21] Wu H, Xue E S, Zhi N, et al. d-Methionine and d-phenylalanine improve *Lactococcus lactis* F44 acid resistance and nisin yield by governing cell wall remodeling[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(9): e02981-19.