

人源长双歧杆菌长亚种 i772 的分离、鉴定及特性研究

张 栋, 冯丽莉, 荀一萍, 薛玉玲, 宁一冰, 王世杰*

(君乐宝乳业集团股份有限公司 石家庄 050221)

摘要 分离人源双歧杆菌,对其进行鉴定及特性研究。从健康婴儿粪便中分离得到 1 株疑似双歧杆菌,对其进行鉴定,分析其益生菌特性和发酵特性。结果显示:1 株分离自婴儿粪便样品的菌株被鉴定为长双歧杆菌,命名为长双歧杆菌长亚种 i772,研究发现其对 25 种抗生素敏感;在人工模拟消化液试验中存活率为 3.22%;在体外干预 THP-1 细胞试验中其使促炎免疫因子 IL-8、TNF- α 和 TLR4 分别比对照组提高了 12.71, 5.71, 12.56 倍。在发酵乳制备试验中,在不影响整体喜好度的前提下,添加长双歧杆菌 i772 显著($P<0.05$)提高了发酵乳的黏度和黏聚性。结论:人源长双歧杆菌 i772 具有耐受人工胃肠液,调节免疫的特点,适于作为益生菌添加于发酵乳中。

关键词 双歧杆菌; 益生菌; 发酵乳

文章编号 1009-7848(2024)01-0102-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.01.011

双歧杆菌由法国巴斯德研究所的 Tissier 于 1900 年从母乳喂养的婴儿粪便中首次分离得到^[1]。随着研究的深入,双歧杆菌已成为众所周知的一类益生菌,具有调节肠道菌群^[2-4]、抗肿瘤^[5-7]、降胆固醇^[8-9]以及延缓衰老^[10-11]等功能性。另外,双歧杆菌已成为评价肠道菌群健康的重要参考指标。尤其在生命早期的婴儿肠道菌群中,双歧杆菌的种类和相对丰度对婴儿健康和后期成长都有重要作用^[12-13]。在益生菌开发中,一般认为健康人体,特别是健康婴儿肠道样本是理想的益生菌来源。日本科学家就根据其不同寄宿环境将双歧杆菌分为人类亲和型双歧杆菌(Human-residential bifidobacteria, HRB)和非人类亲和型双歧杆菌(Non-human-residential bifidobacteria, NHRB)^[14]。常见的 HRB 包括长双歧杆菌长亚种(*Bifidobacterium longum subsp. longum*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)、长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum subsp. infantis*)、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)。研究表明 HRB 由于能

够更好地利用母乳低聚糖并耐受溶菌酶,因此 HRB 具有更好的肠道定植能力,是更适合人体尤其是婴幼儿的益生菌^[15-18]。

我国对于双歧杆菌的研究和开发较晚。市售益生菌酸奶中的双歧杆菌以欧美和日本厂商开发的少数几种菌株为主,限制了益生菌酸奶产品开发的多样性,也无法满足消费者对于益生菌酸奶的需求。

本试验从健康婴儿粪便样品中分离得到 1 株疑似双歧杆菌,对其进行分子生物学鉴定,研究其消化液耐受能力、免疫调节作用以及发酵特性,以期为我国益生菌发酵乳提供优良的双歧杆菌,为我国自有双歧杆菌的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

婴幼儿粪便:君乐宝乳业集团收集的健康顺产婴儿新鲜粪便样品,于-80℃冰箱备用。

1.2 试剂与仪器

API50 试剂盒,法国梅里埃;莫匹罗星锂盐配套试剂、天根细菌 DNA 提取试剂盒、蛋白胨、牛肉膏、琼脂粉等均为生物纯级,北京陆桥技术股份有限公司;葡萄糖、 KH_2PO_4 等均为分析纯级,石家庄现代仪器仪表化工有限公司;脱脂乳粉,雀巢(中国)有限公司;THP-1 细胞、细胞总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、PCR 及电泳所用试剂,河北本

收稿日期:2023-01-26

基金项目:河北省重点研发计划项目(21327123D);国家乳业技术创新中心创建重点项目(2021-国家乳创新中心-6);河北省全职引进高端人才项目(2020HBQZY021);石家庄市高层次科技创新创业人才项目(07202202)

第一作者:张栋,男,硕士,工程师

通信作者:王世杰 E-mail: wangshijie@jlbry.com

源生物科技有限公司;生牛乳,君乐宝乳业集团。酸奶发酵剂 JLB-1510,河北一然生物科技有限公司。

人工胃液:NaCl 0.2 g/100 mL、胃蛋白酶(Pepsin)0.35 g/100 mL,用浓度为 1 mol/L 的 HCl 调整 pH 值为 3.0 后,过滤除菌,备用。人工肠液:将下述 a 液和 b 液以体积比 2:1 混合即为人工肠液。a.胰液:重碳酸钠 1.1 g/100 mL,NaCl 0.2 g/100 mL,胰蛋白酶(Trypsin)0.1 g/100 mL,调整 pH 值为 8.0,过滤除菌,备用。b.胆汁液:Bile Salts (Difco)0.9 g/100 mL,调整 pH 值为 8.0,过滤除菌,备用。

生化培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;CML51 生物显微镜,日本奥林巴斯公司;净化工作台、高速离心机、荧光定量 PCR 仪,赛默飞世尔科技有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,日本雅玛拓公司。

1.3 培养基

改良固体 MRS 培养基:蛋白胨 10.0 g/L,牛肉粉 10.0 g/L,酵母粉 5.0 g/L,柠檬酸氢二铵 2.0 g/L,葡萄糖 20.0 g/L,吐温 80 mL/L,乙酸钠 5.0 g/L,磷酸氢二钾 2.0 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,硫酸锰 0.25 g/L,L-半胱氨酸 0.5 g/L,琼脂 15.0 g/L,蒸馏水 1 L,pH 6.2~6.5。倒平板前每 100 mL 培养基加入 1 支莫匹罗星锂。

改良液体 MRS 培养基:蛋白胨 10.0 g/L,牛肉粉 10.0 g/L,酵母粉 5.0 g/L,柠檬酸氢二铵 2.0 g/L,葡萄糖 20.0 g/L,吐温 80 mL/L,乙酸钠 5.0 g/L,磷酸氢二钾 2.0 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,硫酸锰 0.25 g/L,L-半胱氨酸 0.5 g/L,蒸馏水 1 L,pH 6.2~6.5。

1.4 试验方法

1.4.1 双歧杆菌的分离、纯化和保存 取备用粪便样品 1 g 至 9 mL 无菌生理盐水中,振荡混匀后,继续使用无菌生理盐水进行 10 倍梯度稀释。取不同稀释梯度稀释液 100 mL 至提前准备好的改良 MRS 固体培养基平板,涂布。将涂布好的平板置于厌氧罐,37 °C 静置培养 48 h。观察平板长出的菌落,挑选不同形态特征的单菌落,进行连续的平板划线传代直至平板上得到形态单一菌落。拍照记录菌落形态,并进行简单染色观察其显微形态。

纯化后的菌株接种于改良 MRS 液体培养基,过夜培养后以培养液与 50% 的灭菌甘油以体积比 1:1 混合后,置于 -80 °C 冰箱保存。

1.4.2 分离菌株的鉴定 使用菌落及显微形态观察、API50 发酵试验和 16S rDNA 序列分析对菌株进行分类地位鉴定。

1.4.3 抗生素抗性试验 采用 K-B 法测定菌株对 30 种抗生素的敏感性。判定结果依据美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准^[14]。

1.4.4 人工消化液耐受试验 将冻存的待测菌株使用改良 MRS 液体培养基活化,连续传代 3 次。取 1 mL 培养液加入 9 mL 人工胃液中,振荡均匀,至于 37 °C 静置培养,0 h 和培养 2 h 分别取样测定其活菌数。取在人工胃液中 2 h 的培养液 1 mL,加入 9 mL 人工肠液中,继续置于 37 °C 下培养,并分别在 0,4 h 取样,测定其活菌数。

$$\text{存活率}(\%) = (N_t/N_0) \times 100 \quad (1)$$

式中, N_t ——经人工消化液处理 6 h 的活菌数,CFU/mL; N_0 ——经人工消化液处理 0 h 的活菌数,CFU/mL。

1.4.5 免疫调节作用 将冻存的待测菌株使用改良 MRS 液体培养基活化,连续传代 3 次,取 1 mL 培养液 4 000 r/min 离心 8 min,PBS 洗涤 1 次后,用细胞培养液重悬,调整菌浓度至 10^6 CFU/mL 左右,得到重悬液,备用。将 THP-1 细胞浓度调整为 10^5 个/mL,去除原培养液加入重悬液,孵育 3 h 后去除重悬液,PBS 洗涤 2 次后使用 PBS 重悬细胞,1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。按照 RNA 提取试剂盒说明书提取各孔细胞的总 RNA。另设仅加入培养液的对照组。

按照反转录试剂盒说明书进行各组 RNA 的反转录,得到 cDNA。

以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR,反应引物见表 1,反应体系见表 2,反应程序见表 3。结果根据相对定量的计算公式: $2^{-\Delta\Delta Ct}$,其中 $-\Delta\Delta Ct = -[Ct(\text{目的基因,试验组}) - Ct(\text{内参基因,试验组})] - [Ct(\text{目的基因,对照组}) - Ct(\text{内参基因,对照组})]$ 。

1.4.6 发酵乳制备及评价 取传代活化后的 i772 菌液 10 mL,12 000 r/min 离心 10 min 后弃上清,使用生理盐水重悬后再次离心,重复 3 次得到 i772 菌泥备用,另取 1 mL 菌液进行活菌计数。称

表1 细胞因子及其引物序列

Table 1 Cytokines and primer sequences

细胞因子	引物序列	参考文献
IL-8	上:5'-TGGCAGCCTTCCTGATTCT-3' 下:5'-TTAGCACTCCTTGGCAAACTG-3'	[19]
TNF- α	上:5'-TCTTCTCGAACCCCGAGTGA-3' 下:5'-CCTCTGATGGCACCACCAG-3'	[19]
TLR4	上:5'-AAGCCGAAAGGTGATGTGTTG-3' 下:5'-CTGAGCAGGCTCTCTCCAC-3'	[20]
GADPH(内参基因)	上:5'-CAAGGAGTAAGACCCCTGGA-3' 下:5'-GGGTCTACATGGCAACTGTG-3'	[21]

表2 荧光定量 PCR 反应体系

Table 2 Quantitative fluorescence PCR reaction system

组成成分	20 μ L 体系/ μ L
2xSuperReal PreMix Plus	10
正向引物(10 μ mol/L)	0.6
反向引物(10 μ mol/L)	0.6
cDNA 模板	2
RNase-Free ddH ₂ O	6.8

表3 三步法反应程序

Table 3 Three-step reaction procedure

阶段	循环	温度/ $^{\circ}$ C	时间	荧光信号采集
预变性	1x	95	15 min	否
PCR 反应	40x	95	10 s	否
		60	20 s	否
		72	30 s	是

取 JLB-1510 发酵剂 1~1.2 g, 溶解至 200 g 生灭菌牛乳中, 混匀得种子液。取生牛乳 2 kg, 按 7% 比例加入蔗糖, 升温至 65 $^{\circ}$ C 均质后, 95 $^{\circ}$ C 沸水浴灭菌 10 min, 降温至 50 $^{\circ}$ C。以 10 mL/kg 接种量加入种子液, 同时, 将 i772 菌泥加入灭菌生牛乳充分混匀, 42 $^{\circ}$ C 静置发酵至 pH 4.5 左右, 破乳后 4 $^{\circ}$ C 静置过夜。

召集专家级感官评价人员(23 人)对其进行综合评价。感官评价方法为整体口感喜好度, 用 9 点强度标度法(9 \rightarrow 1 表示喜欢 \rightarrow 不喜欢, <5 表示不被喜欢), 其它感官特性用 10 点强度标度法(10 \rightarrow 0 表示极强 \rightarrow 察觉不到)。采用此方法对上述发酵乳样品进行整体喜好度、香气、甜味、酸味、黏稠度、细腻度评价。

1.5 数据分析

使用 SPSS 软件对试验数据进行分析并通过 Origin 2018 作图。PCR 扩增产物鉴定后所得序列, 在 NCBI 中的 BLAST 检索系统数据库中进行比对确定, 使用 Bioedit 软件和 mega7.0 软件进行邻接法系统发育树作图。

2 结果与分析

2.1 菌株分离及鉴定

经过分离、纯化, 得到 1 株形态特征疑似双歧杆菌的菌株, 编号为 i772。其菌落形态和显微特征如图 1 所示。菌落圆形凸起, 微白不透明, 显微镜下呈棒状和分支状, 单生、V 字排列。API50 试验证明其可以利用 D-乳糖、L-阿拉伯糖、乳糖、果糖、棉籽糖等(表 4)。

进一步, 将测序得到的 DNA 序列利用 NCBI 中的 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将其进行同源性分析, 发现 i772 与长双歧杆

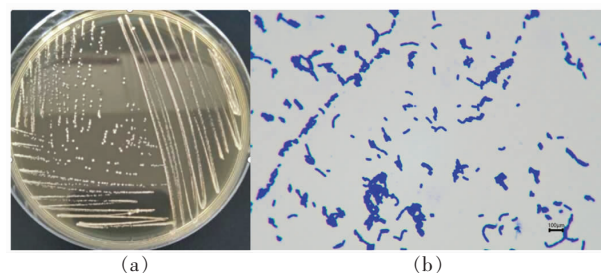


图1 i772 的菌落形态(a)和显微形态(b)

Fig.1 Colony morphology (a) and microscopy morphology (b) of i772

杆菌长亚种同源性最高达到 99%，将待鉴定菌株与部分双歧杆菌不同种的模式菌株的 16S rDNA 序列一起，以植物乳杆菌模式菌株作为外群，采用邻接法制作系统发育树。由图 2 可知，i772 与长双歧

杆菌长亚种 ATCC15707 聚为一类。因此，根据理化结果和基因分析结果将 i772 鉴定为长双歧杆菌长亚种 i772 (*Bifidobacterium longum subsp. Longum i772*)。

表 4 i772 的 API50 试验结果

Table 4 API50 experimental results for i772

底物	结果	底物	结果	底物	结果
甘油	-	甘露醇	-	松三糖	-
赤藓醇	-	山梨醇	-	棉子糖	+
D-阿拉伯糖	-	α-甲基-D-甘露糖甙	-	淀粉	+
L-阿拉伯糖	+	α-甲基-D-葡萄糖甙	-	糖原	-
D-核糖	+	N-乙酰-葡萄糖胺	-	木糖醇	-
D-木糖	+	苦杏仁甙	-	龙胆二糖	-
L-木糖	-	熊果甙	-	D-松二糖	-
阿东醇	-	七叶灵	-	D-来苏糖	-
β-甲基-D-木糖甙	-	水杨苷	-	D-塔格糖	-
D-半乳糖	+	纤维二糖	-	D-岩藻糖	-
D-葡萄糖	+	麦芽糖	-	L-岩藻糖	-
D-果糖	+	乳糖	+	D-阿拉伯糖醇	-
D-甘露糖	-	蜜二糖	+	L-阿拉伯糖醇	-
L-山梨糖	-	蔗糖	+	葡萄糖酸盐	-
L-鼠李糖	-	海藻糖	+	2-酮基-葡萄糖酸盐	-
卫茅醇	-	菊糖	-	肌醇	-

注：+，利用；-，不利用。

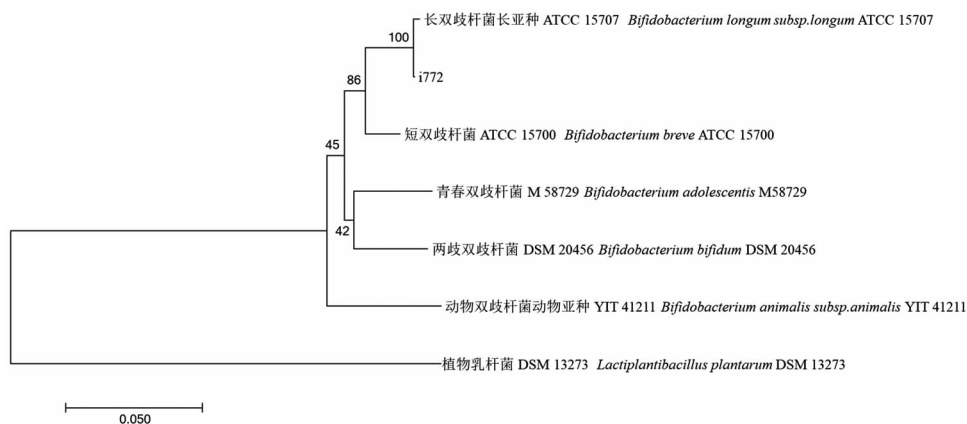


图 2 基于 16S rDNA 序列的 i772 系统发育树

Fig.2 The i772 phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences

2.2 i772 的抗生素耐受试验

乳酸菌尤其是双歧杆菌一般认为是安全的，然而随着基因技术和转基因乳酸菌的出现，菌株的抗生素耐药性成为益生菌应用前值得关注的问题。通过 K-B 法检测长双歧杆菌长亚种 i772 对 30 种抗生素的敏感性发现，长双歧杆菌长亚种 i772 对其中 25 种抗生素敏感，安全风险较低。

2.3 i772 的人工消化液耐受试验

益生菌能够以活菌形式到达肠道才能更好的定植和发挥其健康作用。因此能否耐受到达肠道前的酸碱胁迫是评价其能否发挥健康功能的重要指标。表 6 可以看出长双歧杆菌长亚种 i772 在初始活菌数为 6.90×10^8 CFU/mL 时，经过 2 h 胃液和 4 h 肠液处理后存活率达到 3.22%。其中，在胃液

中 2 h 存活率为 3.07%, 在肠液中活菌数不仅没有下降还略有增长, 这一结果与其它研究报告结果相似^[22-23]。这可能与人工肠液与长双歧杆菌长亚种

i772 分离自健康婴儿肠道的原生环境相似有关。提示长双歧杆菌长亚种 i772 在肠道环境中具有生长定植的潜力。

表 5 长双歧杆菌长亚种 i772 的抗生素抗性试验

Table 5 Antibiotic resistance experiments of i772

抗生素	敏感程度	抗生素	敏感程度	抗生素	敏感程度
哌拉西林/他唑巴坦	S	美罗培南	S	利福平	S
大观霉素	S	万古霉素	S	四环素	S
环丙沙星	R	奈替米星	R	复方新诺明	R
青霉素	S	头孢三曲松	S	阿米卡星	R
红霉素	S	头孢克罗	S	头孢他啶	S
氯霉素	S	头孢唑啉	R	头孢噻吩	S
阿奇霉素	S	头孢噻肟	S	头孢哌酮	S
克林霉素	S	氨苄西林	S	庆大霉素	R
强力霉素	S	头孢呋新	S	茶唑西林	R
克拉霉素	S	米诺环素	S	喹喃妥因	S

注: S. 敏感; M. 中度敏感; R. 抗性。

表 6 长双歧杆菌长亚种 i772 的消化液耐受试验

Table 6 Digestion solution tolerance experiment of i772

	0 h 的活菌数/ CFU·mL ⁻¹	2 h 的活菌数/ CFU·mL ⁻¹	6 h 的活菌数/ CFU·mL ⁻¹	胃液存活率/%	肠液存活率/%	消化液存活率/ %
i772	6.90×10 ⁸	2.12×10 ⁶	2.22×10 ⁶	3.07	104.72	3.22

2.4 i772 的免疫调节作用

IL-8 的主要生物学活性是吸引和激活中性粒细胞, 这些作用可导致机体局部的炎症反应, 达到杀菌和细胞损伤的目的^[24]。TLR 基因编码的蛋白质是 Toll 样受体 (TLR) 家族的成员, 该家族在病原体识别和先天免疫激活中起着基本作用。能够介导免疫力发展所必需的细胞因子的产生。TNF- α 是一种促炎细胞因子, 参与正常炎症反应和免疫反应^[25-26]。由图 3 可知, i772 与 THP-1 细胞相互作用 3 h 后, 细胞因子 IL-8、TLR4、TNF- α mRNA 的表达量为对照组的 12.71, 5.71, 12.56 倍。因此 i772 能够促进 THP-1 细胞中促炎因子表达, 具有一定免疫激活和增强作用。

2.5 i772 的发酵乳制备及风味评价

将制备好的含有长双歧杆菌长亚种 i772 的发酵乳与未添加的普通发酵乳, 召集专家级感官评价人员 23 人对其进行综合评价。结果如表 7 所示, 加入 i772 对于发酵乳的总体喜好度、总香气、酸味、甜味和粉感的影响没有显著性差异; 显著提

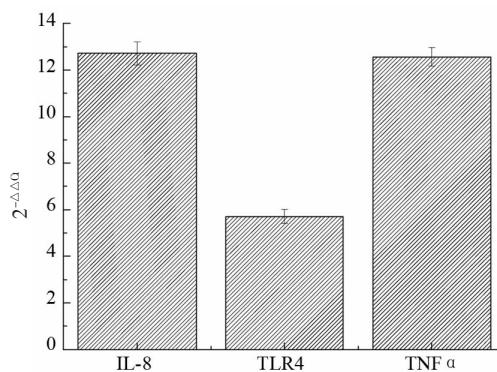


图 3 长双歧杆菌长亚种 i772 干预 THP-1 细胞炎症相关基因的相对表达量

Fig.3 Relative expression levels of genes related to inflammation in the i772 intervention in THP-1 cells

高了发酵乳的口中黏度和黏聚性。李达等^[27]通过研究不同菌株发现, 乳酸菌产生胞外多糖可以改善发酵乳的质构, 发酵乳更细腻, 同时提高了黏度和黏附性。李胜杰^[28]研究了两歧双歧杆菌 WBIN03 其胞外多糖产量可达 240 mg/L 左右。推测含 i772

的发酵乳口中黏度和黏聚性的提高,可能与其在发酵过程中产生胞外多糖,从而改变了发酵乳质构特性有关。胞外多糖的产生除了能够提升发酵

乳的质构,也会赋予益生菌良好的健康作用^[29-31],这还需要后续试验进一步验证。

表 7 长双歧杆菌长亚种 i772 发酵乳感官评价结果

Table 7 Sensory evaluation results of fermented milk of i772

	总体喜好度	总香气	酸味	甜味	口中黏度	粉感	黏聚性
对照组	6.74 ^a	5.44 ^a	5.00 ^a	5.22 ^a	5.86 ^b	2.69 ^a	5.06 ^b
含 i772 发酵乳	6.96 ^a	5.50 ^a	5.13 ^a	5.22 ^a	6.33 ^a	2.66 ^a	5.75 ^a

注:各样品指标上标的字母不同表示各样品、各指标在 5%水平上有显著性差异。

3 结论

从健康婴儿肠道样品中分离得到 1 株疑似双歧杆菌菌株,经过生理生化鉴定为长双歧杆菌,命名为长双歧杆菌长亚种 i772。进一步做抗生素抗性试验发现其对 25 种抗生素敏感;通过胃肠消化液的存活率为 3.22%;能够提高 IL-8、TLR4 和 TNF- α 3 种促炎因子的 mRNA 相对表达量。通过发酵和品尝发现添加长双歧杆菌长亚种 i772 对发酵乳的喜好度、香气等指标无显著影响,而显著提高了发酵乳的口中黏度和黏聚性。未来将进一步从 HRB 菌株和胞外多糖方向继续进行研究。

参 考 文 献

- [1] BUNESOVA V, VLKOVA E, KILLER J, et al. Identification of *Bifidobacterium* strains from faeces of lambs[J]. Small Ruminant Research, 2012, 105(1): 355-360.
- [2] MAGRO D O, DE OLIVEIRA L M R, BERNASCONI I, et al. Effect of yogurt containing polydextrose, *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* HN019: A randomized, double-blind, controlled study in chronic constipation[J]. Nutrition Journal, 2014, 13: 75.
- [3] 杨玲, 贾洪利, 严超, 等. 双歧杆菌发酵乳对人体的肠道调节作用研究[J]. 食品科技, 2021, 46(6): 7-13.
YANG L, JIA H L, YAN C, et al. Intestinal adjustment of *Bifidobacterium* fermented milk in human body[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(6): 7-13.
- [4] 李亦汉, 王琳琳, 赵建新, 等. 两歧双歧杆菌 CCFM1167 通过提升肠道中乙酸水平以抑制炎症从而
- 而实现便秘缓解[J/OL]. 食品与发酵工业: 1-9. (2022-06-14) [2022-06-28]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.031238>.
- [5] LI Y H, WANG L L, ZHAO J X, et al. *Bifidobacterium bifidum* CCFM1167 achieves constipation relief by increasing intestinal acetate level to suppress inflammation[J/OL]. Food and Fermentation Industries: 1-9. (2022-06-14) [2022-06-28]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.031238>.
- [5] 杜恒, 吴安定, 张红英, 等. 双歧杆菌通过 IL-6 介导 EMT 对 HCT116 结肠癌细胞侵袭转移影响[J]. 中国医药导报, 2022, 19(2): 13-16.
DU H, WU A D, ZHANG H Y, et al. Effect of *Bifidobacterium* on invasion and metastasis of HCT116 colon cancer cells through IL-6 mediated EMT[J]. Herald of Medicine, 2022, 19(2): 13-16.
- [6] 牛威, 宋扬, 信红月, 等. PD-L1 单克隆抗体联合双歧杆菌对小鼠胃癌的疗效观察[J]. 锦州医科大学学报, 2021, 42(3): 11-15.
NIU W, SONG Y, XIN H Y, et al. Therapeutic effect of PD-L1 monoclonal antibody combined with *Bifidobacterium* on gastric cancer in mice[J]. Jinzhou Medical University, 2021, 42(3): 11-15.
- [7] 刘亦伦. 壳聚糖/藻酸盐微凝胶包载双歧杆菌联合小分子 PD-L1 抑制剂对原位直肠癌的抗肿瘤研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2021.
LIU Y L. Antitumor effect of chitosan/alginate microgel-encapsulated *Bifidobacteria* combined with small molecule PD-L1 inhibitor on orthotopic rectal cancer[D]. Jilin: Jilin University, 2021.
- [8] FERNÁNDEZ-CALDERÓN M C, SÁNCHEZ-MORO M D H, RINCÓN E O. *In vitro* cholesterol assimilation by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BPL1) probiotic bacteria under intestinal conditions [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets,

- 2022, 22(4): 433-439.
- [9] 朱啟会, 何腊平, 张玲, 等. 降胆固醇双歧杆菌 BZ11 的筛选及其耐受性评价[J]. 中国酿造, 2017, 36(3): 54-58.
ZHU Q H, HE L P, ZHANG L, et al. Screening and tolerance evaluation of cholesterol-lowering *Bifidobacterium* BZ11[J]. China Brewing, 2017, 36(3): 54-58.
- [10] KIM H, SHIN J, KIM S, et al. *Bifidobacterium bifidum* BGN4 and *Bifidobacterium longum* BORI promotes neuronal rejuvenation in aged mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 603: 41-48.
- [11] 张宏娟, 王跃, 刘明方, 等. 双歧杆菌脂磷壁酸对 D-半乳糖致衰老小鼠表型的影响[J]. 中国微生物生态学杂志, 2008(3): 219-221.
ZHANG H J, WANG Y, LIU M F, et al. Effect of lipoteichoic acid of *Bifidobacterium* on senile phenotypes of aging mice induced by D-galactose[J]. Chinese Journal of Microecology, 2008(3): 219-221.
- [12] 黄石, 沈朝勇, 何天琪, 等. 生命早期短双歧杆菌干预对变应性鼻炎小鼠的免疫调节作用[J]. 四川医学, 2021, 42(12): 1189-1193.
HUANG S, SHEN C Y, HE T Q, et al. Immunomodulatory effect of *Bifidobacterium breve* intervention in early life on allergic rhinitis in BALB/c Mice[J]. Sichuan Medical Journal, 2021, 42(12): 1189-1193.
- [13] DEV K, BEGUM J, BISWAS A, et al. Hepatic transcriptome analysis reveals altered lipid metabolism and consequent health indices in chicken supplemented with dietary *Bifidobacterium bifidum* and mannan-oligosaccharides[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 17895
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S20 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Nineteenth informational supplement [S]. Wayne, PA: CISI, 2010.
- [15] WONG C B, ODAMAKI T, XIAO J Z. Insights into the reason of human-residential bifidobacteria (HRB) being the natural inhabitants of the human gut and their potential health-promoting benefits[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2020, 44(3): 369-385.
- [16] LIU S, FANG Z, WANG H, et al. Gene-phenotype associations involving human-residential bifidobacteria (HRB) reveal significant species- and strain-specificity in carbohydrate catabolism[J]. Microorganisms, 2021, 9(5): 883.
- [17] WONG C B, SUGAHARA H, ODAMAKI T, et al. Different physiological properties of human-residential and non-human-residential bifidobacteria in human health [J]. Beneficial Microbes, 2018, 9(1): 111-122.
- [18] SAKURAI T, HASHIKURA N, MINAMI J, et al. Tolerance mechanisms of human-residential bifidobacteria against lysozyme[J]. Anaerobe, 2017, 47(5): 104-110.
- [19] MINAMI J, ODAMAKI T, HASKURA N, et al. Lysozyme in breast milk is a selection factor for bifidobacterial colonisation in the infant intestine [J]. Beneficial Microbes, 2016, 7(1): 53-60.
- [20] SARAH L, INGMAR C, TYTGAT H L P, et al. Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(1): 185-193.
- [21] SODHI C P, WIPF P, YAMAGUCHI Y, et al. The human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose protect against the development of necrotizing enterocolitis by inhibiting toll-like receptor 4 signaling[J]. Pediatric Research, 2021, 89(1): 91-101.
- [22] CLAUDIA H, YAOYAO D, IVONNE P, et al. The probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces pathogen invasion and modulates cytokine expression in Caco-2 cells infected with Crohn's disease-associated *E. coli* LF82 [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2011, 77(7): 2541-2544.
- [23] 冯丽莉, 张栋, 刘尧尧, 等. 一株动物双歧杆菌乳亚种的分离鉴定及其特性研究[J]. 食品科技, 2021, 46(6): 1-6.
FENG L L, ZHANG D, LIU Y Y, et al. Isolation, identification and characterization of a strain of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis [J]. Food Science and Technology, 2021, 46(6): 1-6.
- [24] 张和平, 孟和毕力格, 王俊国, 等. 分离自内蒙古传统发酵酸马奶中 *L. casei* Zhang 潜在益生特性的研究[J]. 中国乳品工业, 2006(4): 4-10.
ZHANG H P, MENG H B L G, WANG J G, et al. Assessment of potential probiotic properties of *L. casei* Zhang strain isolated from traditionally home-

- made koumiss in Inner Mongolia of China[J]. China Dairy Industry, 2006(4): 4-10.
- [25] 孔雨昕. 三种乳酸菌对乌鳢生长、抗氧化、免疫及肠道屏障功能的影响[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2021.
- KONG Y X. Effect of three kinds of lactic acid bacteria on the growth, antioxidant, immune and intestinal barrier function of *Channa argus*[D]. Jilin: Jilin Agricultural University, 2021.
- [26] YUN X, LU M X, CHEN G, et al. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 76: 368-379.
- [27] 李达, 张雪, 张莉, 等. 西藏灵菇中产胞外多糖嗜热链球菌的分离筛选及其发酵性能测定[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 225-228.
- LI D, ZHANG X, ZHANG L, et al. Isolation, screening and fermentation performance of exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* from Tibetan Kefir[J]. Food Science, 2011, 32(13): 225-228.
- [28] 李胜杰. 两歧双歧杆菌 WBIN03 胞外多糖的抗菌/抗氧化活性及其对小鼠免疫和肠道菌群影响的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- LI S J. Research on the antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and its beneficial effects on the immunity and intestinal microbiota in mice[D]. Nanchang: Nanchang University, 2014.
- [29] OLEKSY M, KLEWICKA E. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(3): 450-462.
- [30] PATTEN D A, LAWS A P. *Lactobacillus*-produced exopolysaccharides and their potential health benefits: A review[J]. Beneficial Microbes, 2015, 6(4): 457-471.
- [31] LIU G, CHEN H, CHEN J, et al. Effects of bifidobacteria-produced exopolysaccharides on human gut microbiota *in vitro*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(4): 1693-1702.

Studies on Isolation, Identification and Characterization of a Human Strain of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* i772

Zhang Dong, Feng Lili, Xun Yiping, Xue Yuling, Ning Yibing, Wang Shijie*
(Junlebao Dairy Group Co., Ltd., Shijiazhuang 050221)

Abstract This study was aimed at isolate human bifidobacterium and identify and study its characteristics. A suspected bifidobacterium strain was isolated from the feces of healthy infants, and its probiotic characteristics and fermentation characteristics were identified and analyzed. The results showed that a strain isolated from stool samples of infants was identified as *Bifidobacterium longum* and named *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* i772. Further studies showed that it was sensitive to 25 antibiotics. The survival rate of artificial simulated digestive juice was 3.22%. *In vitro* intervention of THP-1 cells, *Bifidobacterium longum* i772 increased the proinflammatory immune factors IL-8, TNF- α and TLR4 by 12.71, 5.71 and 12.56 times, respectively, compared with the control group. In the fermented milk preparation experiment, the addition of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* i772 significantly ($P < 0.05$) improved the mouth viscosity and cohesion of the fermented milk. The above experiments showed that human *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* i772 had the characteristics of tolerance to artificial gastric and intestinal fluid, regulation of immunity, and was suitable to be added into fermented milk as probiotics.

Keywords *Bifidobacterium*; probiotics; fermented milk