

利用低聚半乳糖双歧杆菌的筛选及益生特性研究

孙 慧^{1,2}, 肖利红^{1,2}, 何明雪^{1,2}, 徐梓赫^{1,2}, 谭 泽^{1,2}, 张峰瑞^{1,2}, 张莉丽^{1,2*}, 韩建春^{3*}

(¹东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室 哈尔滨 150030

²东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030

³黑龙江省绿色食品科学研究院 哈尔滨 150028)

摘要 短链低聚半乳糖(SC-GOS)是双歧杆菌的有效增殖因子。本试验从婴儿粪便样品中筛选得到 7 株高效利用 SC-GOS 的双歧杆菌,经 16S rDNA 鉴定,它们为 1 株为长双歧杆菌婴儿亚种 BI_Y46,2 株为两歧双歧杆菌(BB_Y22、BB_S7),2 株假小链双歧杆菌(BP_Y43、BP_YA)以及 2 株长双歧杆菌(BL_S34、BL_H26)。以婴儿双歧杆菌 M63 和婴儿双歧杆菌 ATCC 15697 为对照,观察菌株形态并分析益生特性,初步筛选出具有应用潜力的益生菌株。结果表明,BI_Y46 形态特殊,分叉状有菌毛;BB_Y22、BP_Y43 的胞外多糖产量超过 0.45 mg/mL;BL_H26 菌体表面蛋白含量较高,为 0.74 mg/mL, BB_Y22、BB_S7 含量在 0.35~0.45 mg/mL 范围;同时 BP_Y43、BB_Y22 具有较强的表面疏水性和自聚集能力;在模拟胃液中及胆盐存在下, BB_Y22、BI_Y46 对胆盐和胃液的刺激显示出较强的耐受性。抑菌试验显示 BI_Y46、BB_S7 上清液对大肠杆菌 ATCC 25922 的抑菌效果较强。结论:长双歧杆菌婴儿亚种 BI_Y46、两歧双歧杆菌 BB_Y22 以及假小链双歧杆菌 BP_Y43 具有较好的益生潜力,为开发含有低聚半乳糖和双歧杆菌的产品提供一定参考。

关键词 双歧杆菌;短链低聚半乳糖;益生特性;肠道耐受;抑菌能力

文章编号 1009-7848(2023)11-0036-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.11.004

低聚半乳糖 (Galactooligosaccharides, GOS) 是人乳中含量较多的低聚糖^[1],由半乳糖残基和末端葡萄糖通过 β -糖苷键连接而成的低聚糖。目前的商业 GOS 是含有大量单糖和双糖的混合低聚糖;不同供应商的 GOS 的连接类型和聚合程度差异很大^[2]。GOS 具有优良的益生功能,抵抗近端胃肠道消化的能力极强,能够促进双歧杆菌的定殖。人体摄入一定量的 GOS 可以提高肠道吸收镁和铁元素的能力,在改善儿童缺铁性贫血方面具有积极作用^[3]。此外,GOS 还具有降低龋齿发生率、促进脂质代谢、保护肝脏、预防结肠癌等功能^[4-5]。

大部分双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 是从婴儿粪便中分离得到的,它是一种对人体肠道极其重要的微生物^[6]。双歧杆菌不仅可以促进机体生长发育,抑制肿瘤和衰老,还可以调节肠道动态平衡,促进肠道屏障的完整性,减轻结肠炎症状,增强机

体免疫力^[7-11]。双歧杆菌可以分解各种饮食来源和宿主肠道内的碳水化合物,从而显著促进宿主的新陈代谢,这一特征不仅保证其在肠道中的定殖,而且通过交叉喂养策略为宿主和其它肠道微生物提供营养^[12-13]。

双歧杆菌发酵 GOS 的能力依赖于 GOS 的聚合度和糖苷键类型。有研究证明双歧杆菌更加倾向于分解利用高聚合度的 GOS^[14]。Taskwan 等^[15]分析双歧杆菌与乳酸菌利用的 GOS 的情况,发现婴儿双歧杆菌 M63 和婴儿双歧杆菌 ATCC 15697 能够很好地利用短链低聚半乳糖 (Short chain galacto-oligosaccharides, SC-GOS)。SC-GOS 可以调节肠道微生物组成,增加双歧杆菌的丰度,改善乳糖不耐受症^[16]。Xiao 等^[17]给小鼠喂食含 2'-岩藻糖基乳糖、SC-GOS 和长链低聚果糖 (Long chain fructo-oligosaccharides, LC-FOS) 的混合物,发现小鼠的肠道微生物区系组成发生变化,并且代谢功能和免疫系统功能得到改善。有研究证实给婴儿食用 SC-GOS、LC-FOS 与短双歧杆菌 M-16V 的混合物,可使其粪便变软,粪便中双歧杆菌的数量大大增加^[18]。婴儿食用含有 SC-GOS 和 LC-FOS 的婴配粉可以降低肠绞痛的发生率^[19],预防轮状

收稿日期: 2022-11-04

基金项目: 黑龙江省重点研发计划项目(GA21B015);黑龙江省博士后科研启动金项目(LBH-Q2009)

第一作者: 孙慧,女,硕士生

通信作者: 张莉丽 E-mail: lilizhang2011@163.com

韩建春 E-mail: hanjianchun@neau.edu.cn

病毒引起的腹泻症状^[20],促进婴儿的生长发育^[21]。然而,目前有关利用 SC-GOS 的双歧杆菌研究较少,菌株资源较为有限。

本课题组从婴儿粪便中分离得到 126 株双歧杆菌,以 SC-GOS 为唯一碳源,从中筛选高效利用 SC-GOS 的双歧杆菌,结合基因测序技术确定其种属。评价胞外多糖含量、菌体表面蛋白含量、表面疏水性和自聚集能力、模拟胃液耐受能力、胆盐耐受能力以及上清液抑菌能力,以期获得高效利用 SC-GOS 且益生特性优良的双歧杆菌菌株,为开发出含有 GOS 和双歧杆菌的产品提供菌株资源。

1 材料与方法

1.1 微生物菌株

婴儿双歧杆菌 M63 (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* M63, BI_M63) 为实验室保藏菌种,婴儿双歧杆菌 ATCC 15697 (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, BI_15697) 及大肠杆菌 ATCC 25922 (*Escherichia coli* ATCC 25922, EC_25922) 购自中国微生物菌种保藏中心。

1.2 主要材料与试剂

低聚半乳糖(GOS)、葡萄糖、乳糖,上海源叶生物科技有限公司;MRS 肉汤培养基,青岛海博生物公司;*L*-半胱氨酸盐酸盐 (*L*-Cysteine HCl),德国 BioFroxx 公司;猪胆盐,上海瑞永生物科技有限公司;胃蛋白酶,天津阿尔法生物科技有限公司;DNA 提取试剂盒 Omega D4015-01, Omega Bio-Tek 公司

1.3 主要仪器与设备

CMax Plus 酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;SPL-150 生化培养箱,天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司;ZWY-A2102C 恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;TGL-23 离心机,四川蜀科仪器有限公司;BSC-1100-L II A2 生物安全柜,北京东联哈尔仪器制造有限公司。

1.4 培养基

还原液配制方法如下:10 g/L 细菌蛋白胨,5 g/L 氯化钠,0.5 g/L *L*-Cysteine HCl,1 mL/L 吐温 80。121 °C 灭菌 15 min。RB 琼脂培养基参照郭春峰^[22]

的方法配制,118 °C 灭菌 15 min。MRSC 培养基配制方法如下:MRS 肉汤培养基添加 0.5 g/L *L*-Cysteine HCl,加入 15 g/L 琼脂制成 MRSC 固体培养基,118 °C 灭菌 15 min。无碳源 MRSC 培养基配制方法如下:10 g/L 细菌蛋白胨,5 g/L 酵母浸粉、0.5 g/L *L*-Cysteine HCl,2 g/L 磷酸氢二钾、5 g/L 无水乙酸钠、2 g/L 柠檬酸铵、0.2 g/L 七水硫酸镁、0.05 g/L 一水硫酸锰、1 mL/L 吐温 80,118 °C 灭菌 15 min。

不同碳源培养基配制方法如下:在上述无碳源 MRSC 培养基中分别添加 10 g/L 的 P-GOS/GOS/葡萄糖/乳糖,118 °C 灭菌 15 min。

1.5 试验方法

1.5.1 菌株活化 将课题组前期从婴儿粪便中筛选分离得到的 126 株双歧杆菌菌株活化,即以 1% 接种量接种至 MRSC 液体培养基,37 °C 厌氧培养 24 h,传代 18 h 备用。

1.5.2 SC-GOS 的制备 根据 Taksawan 等^[15]的方法制备 SC-GOS。即将 0.15 mg/mL GOS 加样到已装填好 Sephadex G-25 凝胶 (Sigma-Aldrich) 的 XK 16/100 柱 (GE Healthcare Life Science) 中,洗脱收集。以乳糖为对照,应用苯酚-硫酸法^[23]确定 GOS 和乳糖的出峰时间,收集 GOS 和乳糖不重合部分,混合冻干得到 SC-GOS,用于后续试验。利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱分析确定所得到 SC-GOS 中不含有单糖和双糖。

1.5.3 可利用 SC-GOS 的双歧杆菌筛选 取 1 mL 上述 1.5.1 节菌液离心 (10 000×g, 5 min, 4 °C), 水洗沉淀并重悬制备菌悬液。分别取 200 μL SC-GOS-培养基、GOS-培养基、葡萄糖-培养基、乳糖-培养基至 96 孔板中,以 1% 接种量接种菌悬液,设置对照组 (无碳源 MRSC 培养基、SC-GOS-培养基、GOS-培养基、葡萄糖-培养基、乳糖-培养基以及加菌的无碳源 MRSC 培养基)。37 °C 厌氧培养,测定 0, 24, 48 h 的 OD_{595nm} 值以确定能利用 SC-GOS 的双歧杆菌。

1.5.4 利用 SC-GOS 双歧杆菌的生物学鉴定 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 Omega D4015-01 提取细菌基因组 DNA。根据郑慧娟等^[24]的研究用双歧杆菌特异引物 (Bif164-F: 5'-GGGTGGTAAT-GCCGATG-3'; Pbi R2: 5'-GACCATGCACCAC-

CTGTGAA-3')对菌株DNA进行扩增,1%琼脂糖凝胶电泳,送至上海生工生物科技有限公司测序。序列进行BLAST比对分析,确定菌株种属。

1.5.5 利用SC-GOS双歧杆菌形态观察 取1 mL上述1.5.1节菌液离心(10 000×g,5 min,4℃),PBS洗涤,应用孙明明等^[25]方法处理。即用2.5%戊二醛处理12 h,乙醇系列脱水并冷冻干燥,应用钨灯丝扫描电子显微镜S-3400N观察菌体形态。

1.5.6 益生特性分析

1.5.6.1 胞外多糖产量测定 取10 mL上述1.5.1节菌液离心(6 000×g,10 min,4℃),将上清液与3倍体积乙醇混合,4℃沉淀16 h,用3.5 ku透析袋透析,每8 h换1次水,透析48 h。用Alcian Blue法^[26]测定胞外多糖产量。

1.5.6.2 菌体表面蛋白含量测定 取10 mL上述1.5.1节菌液离心(6 000×g,10 min,4℃),PBS洗2次,加入2 mL 5 mol/L LiCl,恒温振荡反应(200 r/min,1 h,37℃),离心(6 000×g,10 min,4℃),将上清液与2倍体积冰丙酮混合,-20℃放置过夜。应用Bradford法^[27]测定菌体表面蛋白含量。

1.5.6.3 表面疏水性的测定 取3 mL上述1.5.1节菌液,加入等体积二甲苯,恒温振荡反应(250 r/min,10 min,37℃),静置1 h。吸取水相测定波长595 nm处的吸光度。重复进行3次,取平均值。疏水性(H)计算公式:

$$H(\%)=(1-A_1/A_0)\times 100 \quad (1)$$

式中, A_0 ——0 h吸光度; A_1 ——不同时间吸光度。

1.5.6.4 自聚集能力的测定 取5 mL上述1.5.1节菌液离心(4 500×g,15 min,4℃),PBS缓冲液洗涤并重悬制备菌悬液,测定0,2,4,6 h上述菌悬液在595 nm下的吸光度。自聚集率(A)计算公式:

$$A(\%)=(1-A_1/A_0)\times 100 \quad (2)$$

式中, A_0 ——0 h吸光度; A_1 ——不同时间吸光度。

1.5.6.5 模拟胃液耐受能力分析 取上述1.5.1节菌液按体积比1:5接种至pH值为2.0的人工胃液(胃蛋白酶10 g/L,加入盐酸溶液调节pH值)中,37℃静置培养,分别在0 h、30 min、3 h时菌落计数。

1.5.6.6 胆盐耐受能力分析 取1 mL上述1.5.1节菌液离心(10 000×g,5 min,4℃),洗涤菌体2次,重悬于含0.2%猪胆盐的MRSC培养液中,37℃厌氧培养,分别在0 h和30 min时菌落计数。

1.5.6.7 无细胞上清液抑菌能力测定 取5 mL上述1.5.1节菌液离心(10 000×g,5 min,4℃),将上清液通过0.22 μm的微孔滤膜。以EC_25922为指示菌,应用牛津杯法^[28]评估各菌株抑菌能力。

1.6 数据处理与分析

所有试验均独立进行3次,结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。试验数据使用SPSS软件进行沃勒-邓肯显著性分析, $P<0.05$,差异显著。使用Origin 8.0和GraphPad Prism 8进行绘图。

2 结果与分析

2.1 利用SC-GOS的双歧杆菌筛选及16S rDNA鉴定结果

Thomson等^[29]发现BI_15697在0.5% GOS上生长48 h的 OD_{595nm} 在0.3左右,本研究发现BI_15697在1% SC-GOS和GOS培养基中生长48 h的 OD_{595nm} 分别为0.25和0.63,故以BI_15697和BI_M63作为对照菌株,SC-GOS、GOS作为筛选的标志物,共54株利用SC-GOS效果优于BI_15697。根据菌落形态、来源、镜检结果等,最终选择7株利用SC-GOS能力($OD_{595nm} > 0.80$)远强于BI_15697($P<0.05$)的双歧杆菌进行16S rDNA鉴定。鉴定结果显示,1株长双歧杆菌婴儿亚种BI_Y46,2株两歧双歧杆菌(BB_Y22、BB_S7),2株假小链双歧杆菌(BP_Y43、BP_YA)以及2株长双歧杆菌(BL_S34、BL_H26)。双歧杆菌利用SC-GOS情况及发育树见图1,序列比对结果见表1。

2.2 扫描电镜观察双歧杆菌形态

扫描电镜观察菌株形态如图2所示,BL_S34(f)和BL_H26(g)呈勺状;BP_YA(d)中含分叉结构;BB_Y22(a)为弯杆状、BP_Y43(b)和BB_S7(e)为长杆状,表面均较为光滑。值得注意的是,BI_Y46(c)具有独特的菌毛结构,Francesca等^[30]发现两歧双歧杆菌PRL2010具有的菌毛结构有助于其黏附,并且具有免疫调节活性。短双歧杆菌UCC2003中也存在菌毛结构,虽然短双歧杆菌UCC2003不能单独利用3'-唾液酸乳糖或部分岩

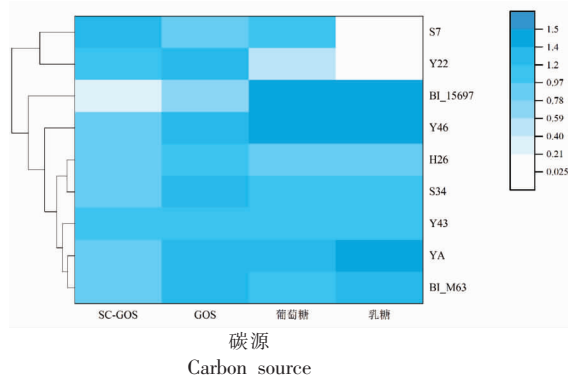


图 1 碳源利用情况及系统发育树

Fig.1 Utilization of carbon sources and phylogenetic tree

表 1 NCBI BLAST 比对结果

Table 1 NCBI BLAST comparison results

菌株编号	中文名称	拉丁文名称	同源性/%	缩写
BI_M63	婴儿双歧杆菌	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	99.32	BI_M63
BI_15697	婴儿双歧杆菌	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	99.87	BI_15697
BB_Y22	两歧双歧杆菌	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	99.25	BB_Y22
BP_Y43	假小链双歧杆菌	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	99.43	BP_Y43
BI_Y46	长双歧杆菌婴儿亚种	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	99.89	BI_Y46
BP_YA	假小链双歧杆菌	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	99.66	BP_YA
BB_S7	两歧双歧杆菌	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	98.75	BB_S7
BL_S34	长双歧杆菌	<i>Bifidobacterium longum</i>	99.66	BL_S34
BL_H26	长双歧杆菌	<i>Bifidobacterium longum</i>	99.89	BL_H26

藻糖,但可以与两歧双歧杆菌 PRL2010 共培养形成交叉喂养,发挥益生作用^[31-32]。因此推断菌体表面存在菌毛的 BI_Y46 可能具有较强黏附能力,同

时具有抑制病原菌等功能,未来将通过更多试验进行验证。

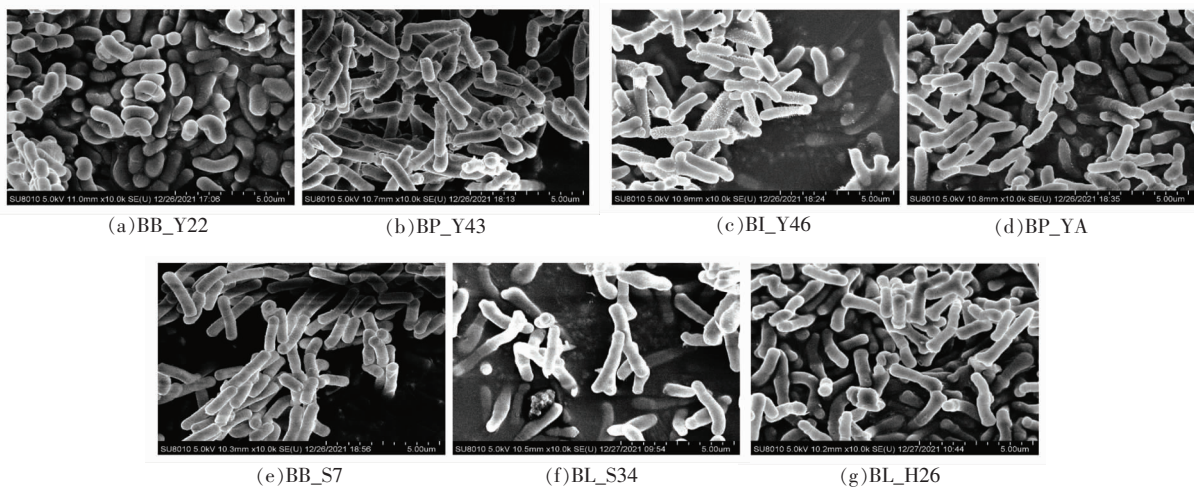


图 2 SEM 观察利用 SC-GOS 的双歧杆菌形态图

Fig.2 Observation of *Bifidobacterium* morphology using SC-GOS by SEM

2.3 利用 SC-GOS 的双歧杆菌胞外多糖产量

利用 SC-GOS 的双歧杆菌胞外多糖产量见图 3。其中, BB_Y22 胞外多糖产量最高, 为 (0.49 ± 0.04) mg/mL, BI_Y46 以及 BL_H26 胞外多糖产量在 $0.4 \sim 0.45$ mg/mL 之间。目前针对高产胞外多糖的双歧杆菌研究较少, 一般胞外多糖产量在几十到几百毫克每升不等, 蔡静静等^[33]分离得到双歧杆菌胞外多糖产量在 0.4 mg/mL 左右, 故 BB_Y22、BP_Y43 属于产胞外多糖能力较强的菌株, 为未来应用提供一定参考。

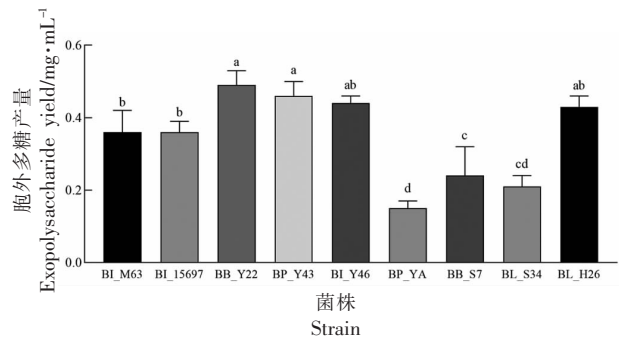
2.4 利用 SC-GOS 的双歧杆菌菌体表面蛋白含量分析

表面蛋白可以延长益生菌在肠道发挥作用的时间^[34], 本试验测定菌体表面蛋白, 为后续分析其具体成分或探讨其黏附功能及机制奠定基础。各试验菌株菌体表面蛋白含量见图 4。结果表明, BL_H26 菌体表面蛋白含量较高, 为 (0.74 ± 0.07) mg/mL ($P < 0.05$), 而 BB_Y22、BB_S7、BL_S34 含量接近, 均在 $0.35 \sim 0.45$ mg/mL 范围; 所有菌株表面蛋白含量均超过 BI_15697。目前有关双歧杆菌菌体表面蛋白的报道不多, 后续将对双歧杆菌的表面蛋白进一步分离, 以探讨其的功能特性。

2.5 表面疏水性和自聚集能力

表面疏水性和自聚集能力与黏附能力密切相关, 具有良好黏附能力的益生菌株可以抑制致病菌的侵袭^[35]。以 BI_M63 和 BI_15697 作为对照, 各试验菌株表面疏水性如图 5 所示。结果表明, BP_Y43、BP_YA 表面疏水性为 24.96% 、 24.90% , 与 BI_15697、BI_M63 的表面疏水性差异较小, 而显著高于 BI_Y46 和 BL_H26 ($P < 0.05$); 其余菌株如 BB_Y22、BB_S7、BB_S34 表面疏水能力处于中等水平, 均在 15% 左右, 低于陈美瑄^[36]筛选得到的双歧杆菌 Probio-M9 (50%), 可能是由于处理条件不同导致的。

自聚集试验表明, BB_Y22 和 BP_Y43 整体自聚集能力较强, BL_H26 较弱。在 2 h 时, BB_Y22 和 BP_Y43 的自聚集百分比分别为 $(51.08 \pm 4.02)\%$ 和 $(55.27 \pm 5.94)\%$, 明显高于其它菌株 ($P < 0.05$), 其余菌株与赵笑笑等^[37]的研究基本一致, 在 $10\% \sim 30\%$ 范围。在 4 h 时, BB_Y22 高达 $(73.16 \pm 4.06)\%$, 提高了 20% 左右, 同时 BP_Y43、BI_Y46、BP_YA、



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下同。

图3 利用 SC-GOS 双歧杆菌的胞外多糖产量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.3 The exopolysaccharide yield of *Bifidobacteria* able to utilize SC-GOS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

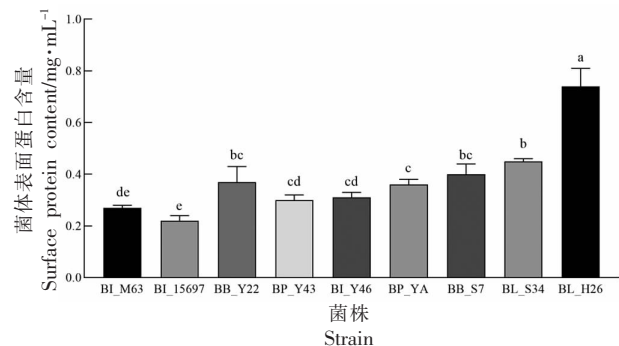


图4 利用 SC-GOS 双歧杆菌菌体表面蛋白含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.4 Surface protein content of *Bifidobacteria* able to utilize SC-GOS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

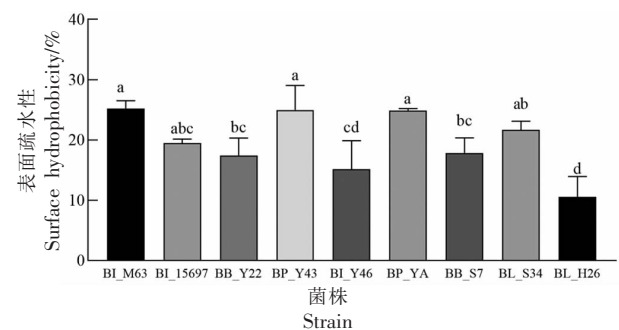


图5 各试验菌株表面疏水性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.5 Surface hydrophobicity of each experimental strain ($\bar{x} \pm s, n=3$)

BB_S7 以及 BL_S34 都有显著提升, 而 BI_M63 和 BI_15697 变化较小, 在 4 h 时分别为 $(27.37 \pm 1.89)\%$ 和 $(32.80 \pm 3.82)\%$; 在 6 h 时, BB_Y22 和 BP_Y43 达到了 80% 以上, 远高于其它菌株 ($P <$

表 2 各试验菌株自聚集能力($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 2 The self-aggregation ability of each experimental strain ($\bar{x}\pm s, n=3$)

菌株名称	2 h/%	4 h/%	6 h/%
BI_M63	17.67 ± 2.74 ^{Cc}	27.37 ± 1.89 ^{Bc}	38.98 ± 0.96 ^{Ad}
BI_15697	18.92 ± 1.49 ^{Cc}	32.80 ± 3.82 ^{Bkc}	48.43 ± 0.90 ^{Ad}
BB_Y22	51.08 ± 4.02 ^{Ca}	73.16 ± 4.06 ^{Ba}	85.06 ± 5.54 ^{Aa}
BP_Y43	55.27 ± 5.94 ^{Ba}	64.33 ± 6.86 ^{Ba}	81.68 ± 6.11 ^{Aa}
BI_Y46	30.56 ± 2.51 ^{Bb}	48.83 ± 5.76 ^{Abc}	68.56 ± 3.16 ^{Ab}
BP_YA	23.96 ± 2.37 ^{Cbc}	41.74 ± 1.81 ^{Bbcd}	66.97 ± 5.62 ^{Ab}
BB_S7	22.00 ± 4.52 ^{Cbc}	50.98 ± 2.05 ^{Bb}	70.30 ± 0.59 ^{Ab}
BL_S34	20.13 ± 5.97 ^{Cbc}	42.16 ± 0.99 ^{Bbcd}	68.17 ± 3.40 ^{Ab}
BL_H26	14.86 ± 1.58 ^{Bc}	37.51 ± 1.37 ^{Acde}	54.88 ± 0.86 ^{Ac}

注:不同大写字母为同一菌株不同时间差异显著($P<0.05$),不同小写字母为不同菌株同一时间差异显著($P<0.05$)。

0.05),同时超过陈美瑄^[36]筛选得到的双歧杆菌 Probio-M8(58%)和 Probio-M9(78%)。

2.6 利用 SC-GOS 的双歧杆菌模拟胃液耐受情况分析

双歧杆菌为到达并稳定地定居在大肠,必须应对胃肠道上发生的大量氧化、渗透、胆盐或胃液应激挑战^[38]。以 BI_M63 和 BI_15697 作为对照,各试验菌株在模拟胃液 pH 2.0 时的耐受情况如表 3 所示。处理 30 min 与 0 h 相比,BI_M63、BP_YA、BB_S7 菌落数量略微增长或持平,而其余菌株菌

落数量减少,BI_15697 相对减少菌落数量最多($P<0.05$);处理 3 h 与 0 h 相比,BI_15697 的存活率最低($P<0.05$),BI_M63 菌落数量增加,这可能与应激反应产生的物质相关,即受到刺激后产生促进自身生长的物质。其余菌株存活率接近 100%,说明菌株具有较强的胃液耐受性,所有筛选得到菌株在 pH 2.0 模拟胃液刺激下的存活率高于胡鹏钰等^[39]分离得到的两株双歧杆菌在 pH 2.5 模拟胃液刺激下的存活率(73%,75%),较强胃液耐受菌株在今后产品中的应用具有广阔前景。

表 3 菌株在模拟胃液(pH 2.0)耐受情况($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 3 Simulated gastric juice tolerance of strains at pH 2.0 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

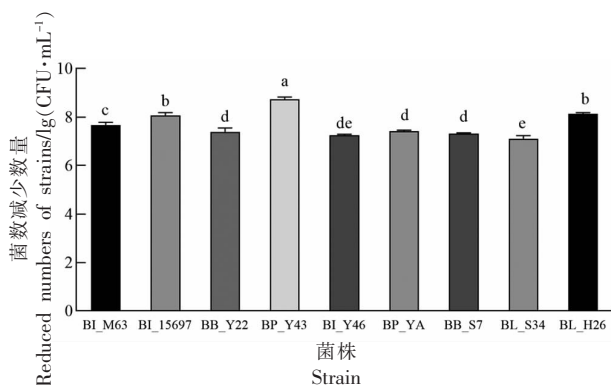
菌株名称	0 h/lg (CFU·mL ⁻¹)	30 min/lg (CFU·mL ⁻¹)	3 h/lg (CFU·mL ⁻¹)	3 h 存活率/%
BI_M63	7.08 ± 0.20 ^{Bc}	7.95 ± 0.02 ^{Aa}	8.23 ± 0.15 ^{Aa}	116.25 ± 2.58 ^a
BI_15697	7.88 ± 0.02 ^{Ab}	6.09 ± 0.08 ^{Bc}	5.46 ± 0.28 ^{Cd}	69.32 ± 3.56 ^c
BB_Y22	7.58 ± 0.02 ^{Ab}	7.31 ± 0.04 ^{Bd}	7.52 ± 0.08 ^{Ac}	99.14 ± 1.24 ^b
BP_Y43	6.56 ± 0.07 ^{Ad}	5.13 ± 0.08 ^{Bg}	5.07 ± 0.09 ^{Bc}	77.33 ± 2.25 ^d
BI_Y46	7.88 ± 0.04 ^{Aa}	7.76 ± 0.01 ^{Bbc}	7.81 ± 0.03 ^{Bb}	99.06 ± 0.45 ^b
BP_YA	7.84 ± 0.03 ^{Ab}	7.83 ± 0.04 ^{Ab}	7.82 ± 0.02 ^{Ab}	99.76 ± 0.57 ^b
BB_S7	7.88 ± 0.03 ^{Bab}	8.02 ± 0.05 ^{Aa}	7.88 ± 0.03 ^{Bb}	100.05 ± 0.23 ^b
BL_S34	6.43 ± 0.38 ^{Ad}	5.41 ± 0.04 ^{Bf}	5.46 ± 0.15 ^{Bd}	85.15 ± 7.37 ^c
BL_H26	7.91 ± 0.01 ^{Aa}	7.73 ± 0.02 ^{Bc}	7.71 ± 0.04 ^{Bbc}	97.46 ± 0.57 ^b

注:大写字母不同为同一菌株不同时间生长情况差异显著($P<0.05$),小写字母不同为不同菌株同一时间以及 3 h 存活率的差异显著($P<0.05$)。

2.7 利用 SC-GOS 的双歧杆菌胆盐耐受情况分析

潜在的益生菌要有较强的胆盐耐受能力,各试验菌株在 0.2%猪胆盐处理 30 min 时相较 0 h 的细菌数量减少情况如图 6 所示。结果表明,在胆

盐存在的条件下,所有菌株存活能力受到不同程度的影响,BP_Y43 的菌落数量减少 5.5×10^8 CFU/mL,其余菌株菌落数量减少 1.0×10^7 CFU/mL 左右($P<0.05$)。这个结果表明除 BP_Y43 外,其余试验

图6 胆盐耐受情况($\bar{x}\pm s, n=3$)Fig.6 Bile salt tolerance ($\bar{x}\pm s, n=3$)

菌株胆盐耐受性强($P<0.05$)。黄巧芬^[40]分离的长双歧杆菌 NCU712 在 0.3% 猪胆盐刺激下, 菌数减少了 3.9×10^7 CFU/mL, 可能是由于菌株不同和所用的胆盐不同, 未来将进一步探讨 0.3% 胆盐下的耐受情况。

2.8 利用 SC-GOS 的双歧杆菌上清液抑菌能力评价

Delcaru 等^[41]证实了双歧杆菌对大肠杆菌产生拮抗作用, 目前已经提出了部分益生菌对致病菌产生拮抗作用的机制, 如竞争排斥、宿主免疫调节等^[42]。以无菌的 MRSC 培养基作为对照, 各试验菌株的上清液抑制 EC_25922 能力见表 4。结果表明, BI_15697 上清液没有抑菌效果; BP_Y43、BP_YA 抑菌效果较强, 抑菌环直径分别为 10.33 mm 和 10.17 mm; BB_Y22、BL_S34、BL_H26 菌株

表4 菌株上清液对 EC_25922 抑制作用($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 4 Inhibitory effect of strain supernatant on EC_25922 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

编号	抑菌效果
BI_M63	++++
BI_15697	-
BB_Y22	+++
BP_Y43	++
BI_Y46	++++
BP_YA	++
BB_S7	++++
BL_S34	+++
BL_H26	+++

注: 牛津杯外径 8 mm。-。没有抑菌作用; +。抑菌环直径 8~9.5 mm; ++。抑菌环直径 9.5~11 mm; +++。抑菌环直径 11~12.5 mm; ++++。抑菌环直径 >12.5 mm。

上清液抑菌能力强, 抑菌环直径在 11~12.5 mm 之间, 而 BI_M63、BI_Y46 以及 BB_S7 上清液对大肠杆菌抑制作用更加明显, 抑菌环直径可以达到 12.5 mm 以上。

3 结论

从粪便样品中分离得到 7 株高效利用 SC-GOS 的双歧杆菌, 分别为两歧双歧杆菌 BB_Y22 和 BB_S7、假小链双歧杆菌 BP_Y43 和 BP_YA、长双歧杆菌婴儿亚种 BI_Y46 以及长双歧杆菌 BL_S34、BL_H26。

观察形态并分析益生特性, 发现 BI_Y46 具有菌毛结构, 蛋白含量较高, 为 (0.31 ± 0.02) mg/mL, 同时 BI_Y46 上清液对 EC_25922 的抑菌效果较强 ($P<0.05$); BB_Y22 的胞外多糖产量最高, 为 (0.49 ± 0.04) mg/mL, 菌体表面蛋白含量为 (0.37 ± 0.06) mg/mL, 具有较强表面疏水性和自聚集能力, 还具有较强的胃液耐受性 ($P<0.05$); BP_Y43 也同样具有较高胞外多糖产量和高菌体蛋白含量, 表面疏水性与自聚集能力也较强, 同时具有较强胆盐耐受能力, 有利于其在肠道中的定植 ($P<0.05$)。

综上, 本试验分离高效利用短链低聚半乳糖的双歧杆菌中, 长双歧杆菌婴儿亚种 BI_Y46、两歧双歧杆菌 BB_Y22 以及假小链双歧杆菌 BP_Y43 具有较好的益生潜力, 为开发益生菌产品、婴儿配方乳粉提供一定的参考, 也为后续研究提供菌株资源。

参 考 文 献

- [1] 归莉琼, 魏东芝. 生物活性物质-低聚半乳糖[J]. 中国乳品工业, 1998(4): 9-12.
GUI L Q, WEI D Z. Biologically active substance - Galactooligosaccharide[J]. China Dairy Industry, 1998 (4): 9-12.
- [2] GÄNZLE G M. Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose [J]. International Dairy Journal, 2012, 22(2): 116-122.
- [3] CHEN J H, WANG Y Y, PAN J L, et al. Prebiotic oligosaccharides enhance iron absorption via modulation of protein expression and gut microbiota

- in a dose-response manner in iron-deficient growing rats[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2022, 66(10): e2101064–e2101064.
- [4] 贾建萍, 裘娟萍. 低聚半乳糖的研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2003(1): 23–26.
- JIA J P, QIU J P. Advance in the research of galactooligosaccharides[J]. *China Dairy Industry*, 2003 (1): 23–26.
- [5] QAMAR T R, IQBAL S, SYED F, et al. Impact of novel prebiotic galacto-oligosaccharides on various biomarkers of colorectal cancer in wister rats[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18 (9): 1785.
- [6] 胥振国, 蔡玉华, 刘修树, 等. 双歧杆菌研究进展及应用前景[J]. *中国生物制品学杂志*, 2017, 30 (2): 215–220.
- XU Z G, CAI Y H, LIU X S, et al. Research progress and application prospect of *Bifidobacterium* [J]. *Chin J Biologicals* February, 2017, 30 (2): 215–220.
- [7] ZHANG M, ZHOU L, ZHANG S, et al. *Bifidobacterium longum* affects the methylation level of fork-head box P3 promoter in 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis in rats [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 110(1): 426–430.
- [8] HIDALGO-CANTABRANA C, DELGADO S, RUIZ L, et al. *Bifidobacteria* and their health-promoting effects[J]. *Microbiol Spectr*, 2017, 5(3): 73–98.
- [9] ALESSANDRI G, OSSIPRANDI M C, MACSHARRY J, et al. *Bifidobacterial* dialogue with its human host and consequent modulation of the immune system[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10(2348): 1–12.
- [10] LORENA R, SUSANA D, PATRICIA R M, et al. *Bifidobacteria* and their molecular communication with the immune system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8(2345): 1–9.
- [11] WANPING A, SHINJI F. Protective effects of *Bifidobacteria* against enteropathogens [J]. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12(6): 1097–1100.
- [12] QUINN E M, JOSHI L, HICKEY R M. Symposium review: Dairy-derived oligosaccharides – Their influence on host-microbe interactions in the gastrointestinal tract of infants[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(4): 3816–3827.
- [13] THOMSON P, MEDINA D A, GARRIDO D, et al. Human milk oligosaccharides and infant gut *bifidobacteria*: Molecular strategies for their utilization [J]. *Food Microbiology*, 2017, 75(17): 37–46.
- [14] BGER M, LEEUWEN S, BUEREN A, et al. Structural identity of galactooligosaccharide molecules selectively utilized by single cultures of probiotic bacterial strains [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2019, 67(50): 13969–13977.
- [15] TAKSAWAN T, HOEFLINGER J L, JOMAY C, et al. Prebiotic galactooligosaccharide metabolism by probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65 (20): 4184–4192.
- [16] AZCARATE-PERIL M A, RITTER A, SAVAIANO D, et al. Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(3): E367–E375.
- [17] XIAO L, ENGEN P A, LEUSINK M, et al. The combination of 2'-fucosyllactose with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides that enhance influenza vaccine responses is associated with mucosal immune regulation in mice[J]. *The Journal of Nutrition*, 2019, 149 (5): 856–869.
- [18] KOSUWON P, LAO-ARAYA M, UTHAISANG-SOOK S, et al. A synbiotic mixture of scGOS/lcFOS and *Bifidobacterium breve* M-16V increases faecal *Bifidobacterium* in healthy young children[J]. *Benef Microbes*. 2018, 9(4): 541–552.
- [19] VANDENPLAS Y, THOMAS L, HETTY B, et al. Randomised controlled trial demonstrates that fermented infant formula with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides reduces the incidence of infantile colic[J]. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway; 1992)*, 2017, 106(7): 1150–1158.
- [20] AZAGRA-BORONAT I, MASSOT-CLADERA M, KNIPPING K, et al. Supplementation with 2'-FL and scGOS/lcFOS ameliorates rotavirus-induced diarrhea in suckling rats[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8(23): 372.
- [21] HUET F, ABRAHAMSE-BERKEVELD M, TIMS S, et al. Partly fermented infant formulae with specific oligosaccharides support adequate infant growth and

- are well-tolerated[J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 2016, 63(4): e43-e53.
- [22] 郭春锋. 人源性益生菌降胆固醇机制及影响因素研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2011.
- GUO C F. Study on mechanisms and influencing factors of cholesterol-lowering function of human origin probiotics [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2011.
- [23] TATSUYA M, AKIO M, NORIMASA I, et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format [J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 339(1): 69-72.
- [24] 郑慧娟, 白晓晔, 高旭, 等. 双歧杆菌属特异性测序引物筛选及优化[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(7): 1736-1747.
- ZHENG H J, BAI X Y, GAO X, et al. Screening and optimization of *Bifidobacterium*-specific sequencing primers[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(7): 1736-1747.
- [25] 孙明明, 吕世翔, 李智媛, 等. 大豆菌核病菌丝侵染茎叶过程扫描电镜观察研究[J]. *大豆科学*, 2020, 39(1): 123-129.
- SUN M M, LÜ S X, LI Z Y, et al. Study of scanning electron microscopic observation on the mycelium infection process of soybean *Sclerotinia sclerotium* on leaf and stem[J]. *Soybean Science*, 2020, 39(1): 123-129.
- [26] ZHANG L L, CHICHLOWSKI M, GROSS G, et al. Milk fat globule membrane protects *Lactobacillus rhamnosus* GG from bile stress by regulating exopolysaccharide production and biofilm formation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(24): 6646-6655.
- [27] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [28] 王毅超. 肠源益生性抑菌乳酸菌的分离筛选及其抑菌物质的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- WANG Y C. Screening of beneficial bacteriostatic lactic acid bacteria from intestine and study on bacteriostatic substances[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.
- [29] THOMSON P, MEDINA D A, GARRIDO D. Human milk oligosaccharides and infant gut *bifidobacteria*: Molecular strategies for their utilization [J]. *Food Microbiol*, 2018, 75(14): 37-46.
- [30] FRANCESCA T, FAUSTA S, ELENA F, et al. Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(27): 11151-11156.
- [31] EGAN M, O'CONNELL M, VENTURA M, et al. Metabolism of sialic acid by *Bifidobacterium breve* UCC2003[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(14): 4414-4426.
- [32] MOTHERWAY M O C, O'BRIEN F, O'DRISCO L L T, et al. Carbohydrate syntrophy enhances the establishment of *Bifidobacterium breve* UCC2003 in the neonatal gut [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(10): 10623-10633.
- [33] 蔡静静, 徐晓裕, 张艳, 等. 新疆维吾尔族肠道中高产胞外多糖双歧杆菌的筛选及其抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2020, 41(8): 144-151.
- CAI J J, XU X Y, ZHANG Y, et al. Screening for and antioxidant activities of high exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* from the intestinal tract of uigur infants and their mothers in Xinjiang [J]. *Food Science*, 2020, 41(8): 144-151.
- [34] 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.
- [35] 张汝京. 具有潜在益生性的乳酸菌的筛选及其拮抗沙门氏菌黏附 Caco-2 细胞的机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- ZHANG R J. Screening of lactic acid bacteria with potential probiotics and study on the mechanism of anti-salmonella adhesion to Caco-2 cells[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019.
- [36] 陈美瑄. 母乳中益生乳杆菌和双歧杆菌的初步筛选及特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- CHEN M X. Preliminary screening and characterization of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolated from human breast milk[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.
- [37] 赵笑笑, 王光强, 夏永军, 等. 婴幼儿粪便中双歧杆菌的分离及其菌株特性研究[J]. *工业微生物*, 2019, 49(2): 1-6.
- ZHAO X X, WANG G Q, XIA Y J, et al. Screening

- and characteristics of *Bifidobacteria* from infant feces [J]. *Industrial Microbiology*, 2019, 49(2): 1–6.
- [38] GIULIA A, DOUWE V S, MARCO V. The genus *Bifidobacterium*: From genomics to functionality of an important component of the mammalian gut microbiota running title: *Bifidobacterial* adaptation to and interaction with the host[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19 (3): 1472–1487.
- [39] 胡鹏钰, 于俊娟, 王鹏, 等. 母乳来源益生菌的筛选及潜在益生特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(14): 190–195.
- HU P Y, YU J J, WANG P, et al. Screening of probiotics from breast milk and its potential probiotic characteristics[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(14): 190–195.
- [40] 黄巧芬. 优良双歧杆菌的筛选及其生理功能研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- HUANG Q F. Screening and physiological function of *Bifidobacteria*[D]. Nanchang: Nanchang University, 2014.
- [41] DELCARU C, ALEXANDRU I, PODGOREANU P, et al. Antagonistic activities of some *Bifidobacterium* sp. strains isolated from resident infant gastrointestinal microbiota on Gram-negative enteric pathogens [J]. *Anaerobe*, 2016, 39(2): 39–44.
- [42] 赵梓雯, 杨虹. 短双歧杆菌对鼠伤寒沙门氏菌的抑制[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2673–2688.
- ZHAO Z W, YANG H. Inhibition of *Salmonella typhimurium* by *Bifidobacterium breve*[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2673–2688.

Studies on Screening and Probiotic Characterization of *Bifidobacteria* with the Ability to Utilize Galacto-oligogalactosaccharides

Sun Hui^{1,2}, Xiao Lihong^{1,2}, He Mingxue^{1,2}, Xu Ziheng^{1,2}, Tan Ze^{1,2}, Zhang Fengrui^{1,2}, Zhang Lili^{1,2*}, Han Jianchun^{3*}

(¹Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030

²College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030

³Heilongjiang Green Food Science Research Institute, Harbin 150028)

Abstract Short chain-galactooligosaccharides (SC-GOS) is an effective proliferation factor of *Bifidobacteria*. Seven strains of *Bifidobacteria* with high utilization of SC-GOS were screened from infant fecal samples, the result of 16S rDNA identification was that one was *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* BI_Y46, 2 *B. pseudocatenulatum* (BP_Y43, BP_YA), 2 *B. bifidum* (BB_Y22, BB_S7) and 2 strains of *B. longum* (BL_S34, BL_H26). Compared with *B. infantis* M63 and *B. infantis* ATCC 15697, the morphology of the strains was observed and the probiotic characteristics were analyzed. Thus, the probiotics with application potential were screened. The results showed that BI_Y46 had special morphology with bifurcated fimbriae, and the exopolysaccharide yield of BB_Y22 and BP_Y43 was higher than 0.45 mg/mL. The surface protein content of BL_H26 was (0.74±0.07) mg/mL, the content of BB_S7 and BB_Y22 was between 0.35–0.45 mg/mL. Whereas, BP_Y43 and BB_Y22 had strong surface hydrophobicity and self-aggregation ability. BB_Y22 and BI_Y46 showed strong tolerance to the stimulation of bile salt and gastric juice. The supernatant of BI_Y46 and BB_S7 had strong inhibiting effect on *Escherichia coli* ATCC 25922. In summary, *B. infantis* BI_Y46, *B. bifidum* BB_Y22 and *B. pseudocatenulatum* BP_Y43 had good probiotic potential and provide some reference for the development of products containing galactoseoligosaccharides and *Bifidobacterium*.

Keywords *Bifidobacterium*; short-chain galactooligosaccharides; probiotic property; intestinal tolerance; bacteriostatic ability