

## 两株双歧杆菌的活性功能成分研究

杨展, 聂新, 刘凯龙, 张和平, 姚国强\*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室  
内蒙古乳品生物技术与工程重点实验室 乳酸菌与发酵乳制品省部共建协同创新中心 呼和浩特 010018)

**摘要** 目的:后生元制品中活性物质的功能研究是解析其益生机制的关键所在,通过探究双歧杆菌菌体代谢成分及其活性功能,可以更好地表征双歧杆菌作为后生元的益生功能。方法:以高密度发酵获得的青春双歧杆菌 B8589 和两歧双歧杆菌 B1628 干燥菌体为研究对象,采用非靶向代谢组学技术对菌体功能成分进行研究。结果:在青春双歧杆菌 B8589 中检出以黄酮类、脂类和类脂分子等为主的活性代谢物 48 种,例如:黄豆黄素、高良姜素,在两歧双歧杆菌 B1628 中检出以有机杂环化合物、脂类和类脂分子等为主的活性代谢产物 35 种,例如:四氢嘧啶、异甘草素。其中 B8589 和 B1628 共有活性代谢产物主要以黄酮类为主,其活性代谢物成分具有抗氧化、抗肿瘤和抗癌作用,对人体健康有益。结论:在双歧杆菌后生元制品开发过程中,对双歧杆菌菌体中有益的活性成分鉴定,可为双歧杆菌功能性成分评价及工业化应用提供借鉴。

**关键词** 青春双歧杆菌; 两歧双歧杆菌; 非靶向代谢组学; 活性物质

**文章编号** 1009-7848(2024)12-0037-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.12.004

作为肠道中一种重要的益生菌,双歧杆菌广泛应用于健康食品和药物制剂中,其生长代谢过程中产生对机体有益的活性物质,可以调节机体免疫系统,促进人体健康,维持肠道菌群平衡<sup>[1]</sup>。随着研究的不断深入,益生菌和后生元在维持人体肠道健康等方面的有益功效被证实,不仅活菌体可以起到益生的功效,而且其生长过程中产生的代谢产物也会发挥部分益生作用<sup>[2]</sup>。例如代谢过程中产生的黄酮类、短链脂肪酸类和胞外多糖等<sup>[3]</sup>。这类物质在机体内起到免疫调节,改善肠胃功能,抗氧化等功能活性<sup>[4-6]</sup>。

益生菌可维持细胞的生物活性,然而其贮藏活性较差。近年来许多研究表明灭活的益生菌及其代谢产物也对人体有益,因此新兴的后生元逐步被大家所熟知<sup>[7]</sup>。后生元经灭活处理仍保留着部分有益的功能活性成分,可在宿主中发挥作用<sup>[8]</sup>。例如,口服热灭活的副干酪乳杆菌,可促进抗原特异性 IgA 的增加并加速 T 细胞的分化,间接调节

免疫系统<sup>[9]</sup>。普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)的后生元制品可有效治疗克罗恩病,抑制肠道炎症<sup>[10]</sup>。关于后生元的研究目前处于起步阶段。代谢组学通量高、分辨率高、成本低,是目前检测其活性成分最主要的技术手段<sup>[11]</sup>。Heliyon 利用非靶向代谢组学鉴定出了藜麦当中特有的苦味物质并尝试解析其功能特性<sup>[12]</sup>。

本研究以高密度发酵后灭活的两株双歧杆菌为研究对象,采用 Q-TOF LC/MS 四级杆飞行时间-液-质谱联用技术,结合统计学的分析方法,对其代谢产物进行分析,挖掘两株双歧杆菌的代谢物活性物质,为双歧杆菌活性功能成分评价及应用提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验菌株

青春双歧杆菌 B8589(*Bifidobacterium adolescentis* B8589, *B. adolescentis* B8589)和两歧双歧杆菌 B1628 (*Bifidobacterium bifidum* B1628, *B. bifidum* B1628)由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室菌种保藏中心提供。

#### 1.2 试剂与设备

甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯),默克公司;甲酸(色谱纯)、2-氯苯丙氨酸,美国赛默飞世尔科技公司。QTOF/MS-6545 质谱仪、1290 Infinity LC

收稿日期: 2023-12-16

基金项目: 内蒙古自治区高等学校科学技术研究项目(NJZZ22488);国家自然科学基金项目(32272293);国家重点研发计划项目(2022YFD2100700)

第一作者: 杨展,男,硕士生

通信作者: 姚国强 E-mail: yaoguoqiang1985@163.com

超高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;涡旋混合器 MIX-200,上海净信实业发展有限公司;离心机 5427R,德国艾本德。

### 1.3 试验方法

1.3.1 菌株的纯化扩培 将冷冻保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的供试菌株接种于改良 MRS 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温严格厌氧条件下进行活化,活化完成后用移液枪将供试菌以 2%(体积分数)的接种量接种于种子培养基中,然后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温严格厌氧下持续培养 18 h,最后以 5%(体积分数)的接种量进行接种。为保证供试菌的纯度,对传代期间的微生物形态进行镜检观察。

1.3.2 样本的分组 菌体经处理之后,进行分组,分组信息如下:A:青春双歧杆菌 B8589(*Bifidobacterium adolescentis* B8589,*B.adolescentis* B8589)、B:两歧双歧杆菌 B1628(*Bifidobacterium bifidum* B1628,*B.bifidum* B1628)。以下简称 B8589、B1628。

1.3.3 样本的前处理 取样品 100  $\mu\text{L}$  加入 1.5 mL 的 EP 管当中,随后加入 300  $\mu\text{L}$  2-氯苯丙氨酸,振荡混匀,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育 0.5 h;取出再进行振荡混匀,之后进行离心(12 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 min),离心后,取上清液 200  $\mu\text{L}$ ,再次放置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱当中静置 0.5 h。后对上清液进行离心(12 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 min)。取上清于进样瓶中上机检测;所有样品另取等量上清混合成质控样品上机检测。

### 1.4 色谱质谱条件

1) 液相色谱条件 进样量为 2  $\mu\text{L}$ ,经色谱柱分离之后进入到质谱检测。色谱柱:Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 1.8  $\mu\text{m}$ ,2.1 mm $\times$ 100 mm;柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,流速为 0.40 mL/min。梯度洗脱程序:0~11 min,95%A,5%B;11~12 min,10%A,90%B;12~12.1,10%A,90%B;12.1~14 min,95%A;超纯水(0.1%的甲酸),5%B;乙睛(0.1%的甲酸)。

2) 质谱条件 质谱分析模式下,采用 ESI 离子源进行,选择正离子扫描模式进行检测。干燥气体温度维持 $325\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,气体流速为 8 L/min,雾化器压力为 40 kPa,鞘气流速为 11 L/min,鞘气温度为 $325\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,毛细管电压 1 500 V,喷嘴电压为 250 V。

### 1.5 数据处理

数据经峰提取、对齐和保留时间的矫正,对缺失率 $>50\%$ 的峰进行过滤等预处理,然后对其代谢产物进行统计学分析,使用主成分分析(Principal Components Analysis,PCA),和偏最小二乘法判别分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis,PLS-DA),结合 T 检验和 PLS-DA 分析的变量重要性投影(Variable Importance in Projection,VIP),进行差异代谢物(Significant Changed Metabolites,SCMs)的筛选,筛选条件满足  $P$  值 0.05 和  $\text{VIP}>1$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 双歧杆菌代谢物分析

2.1.1 质控分析 试验过程中色谱和质谱直接与样本进行接触,导致数据可能会发生部分的漂移<sup>[1]</sup>,检测质谱对同一样品不同时间检测的信号稳定性<sup>[4]</sup>。主成分分析,反映出了样本代谢物的相似趋势程度,是一种无监督模式下进行识别的数据统计方式<sup>[5]</sup>。表示代谢物的聚类情况,是否发生了组间分离,可以初步的对代谢情况进行了解<sup>[5]</sup>。(图 1a、1b 所示)各组别之间存在着明显的分组趋势,各自分组聚集明显,表明数据重复性良好。组间差异显著,表明两株双歧杆菌的代谢物之间得到了有效的区分。

2.1.2 正交偏最小二乘判别分析 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),这种方法是 PLS-DA 的扩展,可以去除数据中无关信息,有效的减少模型的结构复杂性<sup>[6]</sup>。OPLS-DA 数据显示,该模型的  $R^2X=0.724$ , $Q^2=0.984$ 。 $Q^2$  表示模型预测能力, $Q^2>0.5$  时表示该模型是有效的, $Q^2>0.9$  时表明该模型具有良好的线性拟合性和预测性。

2.1.3 代谢物的筛选 基于统计学分析当中得到的变量重要性投影(VIP 值)及  $P$  值进行代谢物的筛选,并对数据进行可视化处理(图 2a、2b 所示)。B8589 有效代谢物总数为 5 116 种,B1628 有效代谢物总数为 4 885 种。差异代谢物 1 744 种(部分差异代谢物筛选数据见表 1),其中上调物质 645 种,下调物质 1 099 种。控制  $P$  值 $<0.01$  时,检测到两株双歧杆菌之间的差异代谢物 107 种,其中具有活性功能的物质有 39 种,以脂类、氨基酸类和

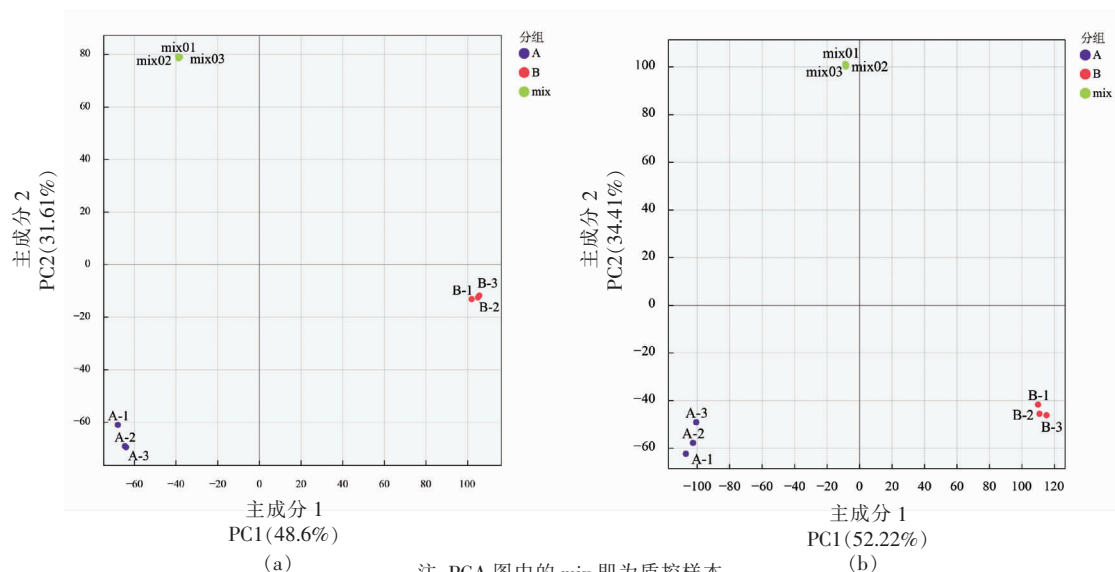


图 1 两种离子模式下的 PCA 图

Fig.1 PCA plots under two ion modes

表 1 部分差异代谢物数据

Table 1 Partial differential metabolite data

中文名称	化学式	VIP	P 值	上/下调类型
共轭亚麻油酸	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1.1798	0.0005	下调
人参皂苷 RO	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>19</sub>	1.1932	0.0018	下调
金雀异黄酮	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	1.1894	0.0035	上调
γ-亚麻酸	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	1.1736	0.0001	上调
紫苏醇	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	1.1739	0.0010	上调
人参皂苷 RO	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>19</sub>	1.1618	0.0062	下调
麦角甾醇	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O	1.1403	0.0099	上调
L-鹅肌肽	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	1.1704	0.0007	上调
尿苷	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	1.1753	0.0003	下调
柚皮素	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	1.1652	0.0014	下调
三叶豆紫檀苷	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	1.1621	0.0044	上调
甘草素	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	1.1344	0.0069	下调
芹菜素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	1.1733	0.0002	下调
柚皮素查耳酮	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	1.1629	0.0025	下调
苏达灭	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.1684	0.0002	下调
褪黑素	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.1689	0.0031	上调
川芎嗪	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	1.1760	0.0002	下调
7-羟基香豆素	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1.1650	0.0030	上调

注:表中数据基于 Fold Change>2, Fold Change<0.5, VIP>1, P 值 0.01 进行筛选。

黄酮类为主。

2.1.4 差异代谢物代谢通路分析 在代谢通路匹配当中(图 4a、4b 所示),差异显著的(P 值<0.01)的代谢通路有 26 条,富集到的代谢物数量最多的两条通路分别是次生代谢物的生物合成途径和苯

丙烷的生物合成途径。B8589 特有代谢途径有:肾素-血管紧张素途径、泛醌和其它萜类醌生物合成途径;B1628 特有代谢途径有:异黄酮生物合成途径、初级胆汁酸生物合成途径和精氨酸-脯氨酸代谢途径。

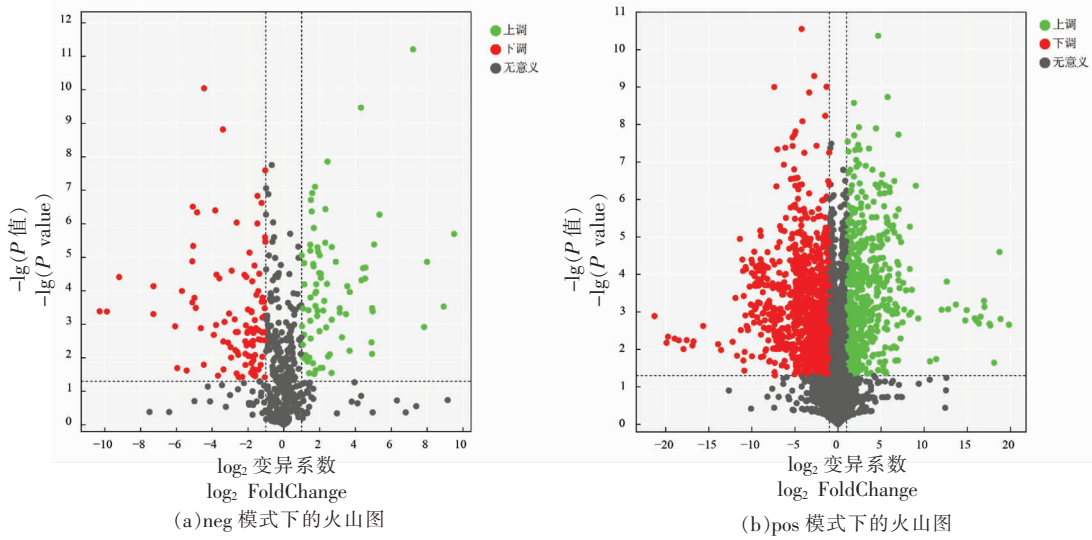


图2 两种离子模式下 B8589 与 B1628 差异代谢物火山图

Fig.2 Volcano plots of differential metabolites of B8589 and B1628 under two ion modes

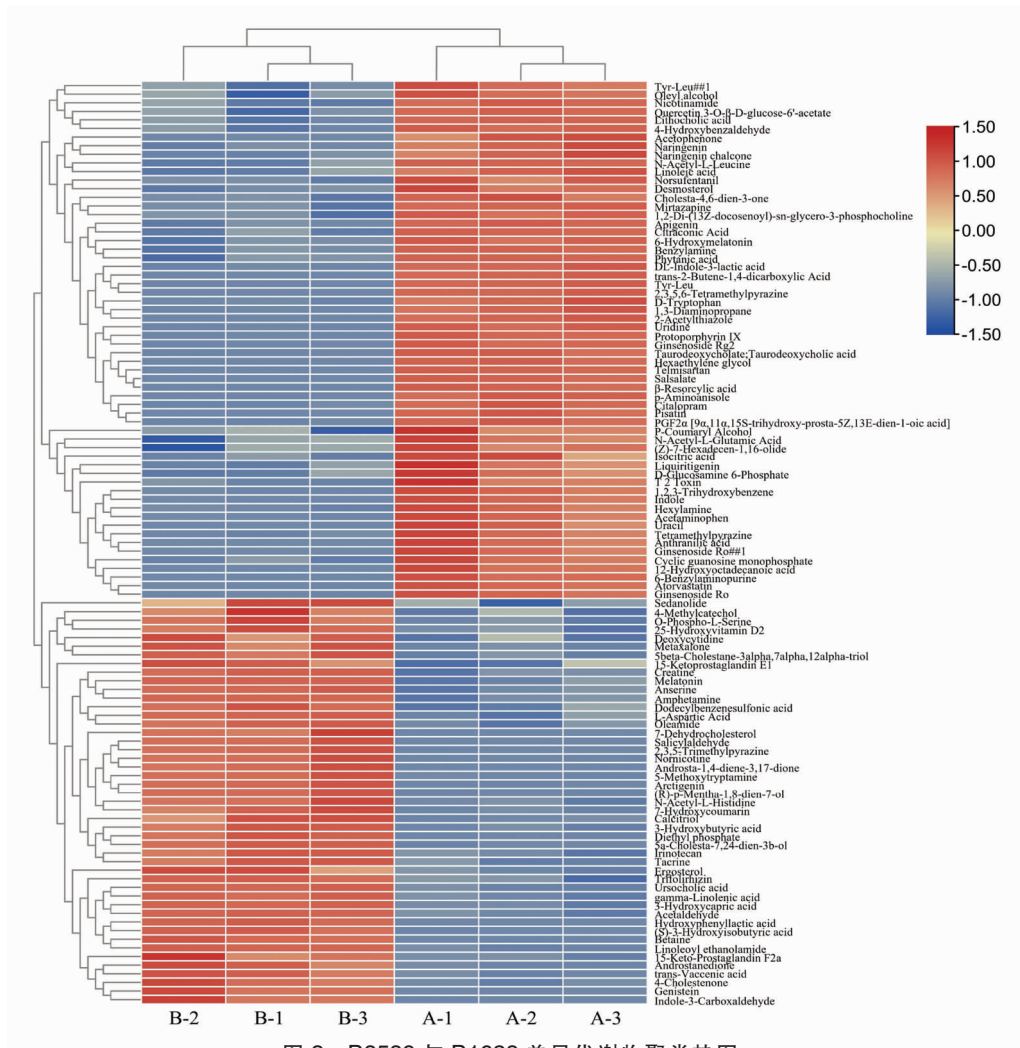


图3 B8589 与 B1628 差异代谢物聚类热图

Fig.3 Cluster heat map of differential metabolites between B8589 and B1628

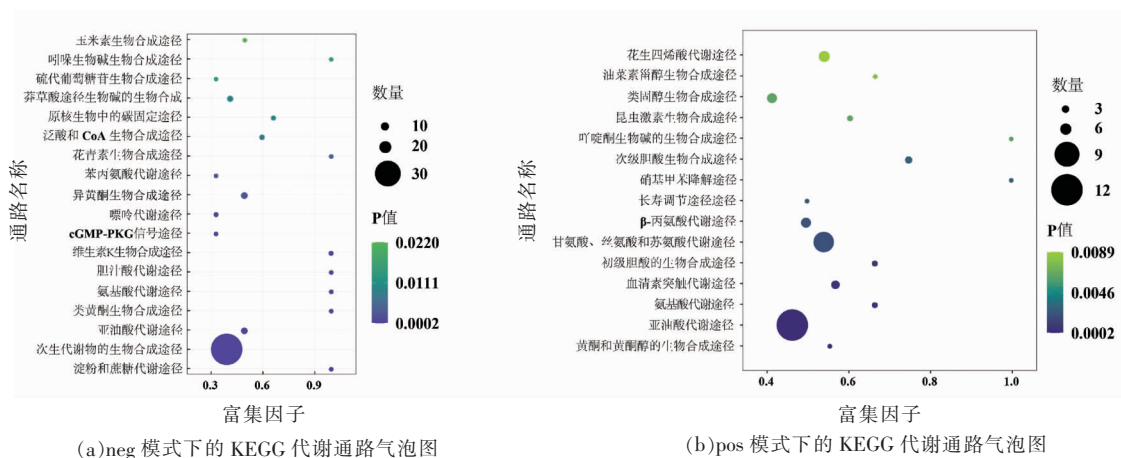


图 4 8589 与 B1628 代谢通路气泡图

Fig.4 Bubble diagram of metabolic pathways of B8589 and B1628

2.2 活性物质检索及分类

对两株双歧杆菌有效峰值内的活性代谢物进行检索, B8589 共检出以脂类和有机杂环化合物为主的 48 种活性代谢产物, B1628 共检出以有机杂环化合物和脂质类为主的 35 种活性代谢产物。青春双歧杆菌 B8589 共检出苯及其衍生物 10 种、脂类和类脂分子 9 种、有机杂环化合物 6 种、生物

碱及其衍生物 4 种, 黄酮类化合物 3 种、萜类化合物 3 种、有机酸及其衍生物 2 种、有机氧化合物 2 种和其他 14 种活性物质。B1628 中共检出脂类和类脂分子 6 种、有机杂环化合物 6 种、苯及其衍生物 5 种、有机酸及其衍生物 3 种、黄酮类 3 种和其它 12 种活性物质。表 2、表 3 中分别罗列两株双歧杆菌峰值靠前的前 15 种活性功能物质。

表 2 青春双歧杆菌 B8589 中峰值靠前的活性物质

Table 2 Active substances with the highest peak in *Bifidobacterium adolescentis* B8589

物质分类	化学式	名称	已报道功效	平均峰值
有机杂环化合物	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	西尼地平	有降压, 神经保护活性 <sup>[18]</sup>	1 793 082 896.92 ± 19 245.43
生物碱及其衍生物	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S	安吡昔康	有抗炎活性 <sup>[19]</sup>	1 760 159 520.65 ± 15 211.03
萜类化合物	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	γ-萜品烯	具有口服活性的抗氧化剂, 有较强的抗伤害活性 <sup>[20]</sup>	439 945 304.88 ± 10 751.22
有机酸及其衍生物	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	丙戊酸	应用于癫痫、双相情感障碍和偏头痛等的研究 <sup>[21]</sup>	413 328 357.14 ± 11 254.51
酚类化合物	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	没食子酸酯	多酚类物质, 具有抗癌作用 <sup>[22]</sup>	256 337 145.70 ± 8 678.54
萜类化合物	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	灵芝酸 H	可抑制乳腺癌细胞的生长 <sup>[23]</sup>	187 457 298.64 ± 9 456.75
苯类及其衍生物	C <sub>35</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	马尼地平	有降压作用 <sup>[24]</sup>	134 754 062.09 ± 8 579.21
黄酮类化合物	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	高良姜素	对肝癌细胞有抑制活性 <sup>[25]</sup>	59 552 739.21 ± 9 741.33
苯类及其衍生物	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	4-苯基丁酸	可用于癌症和感染等疾病的研究 <sup>[26]</sup>	27 276 008.12 ± 3 568.88
黄酮类化合物	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	黄豆黄素	抗氧化并可用于研究细胞凋亡 <sup>[27]</sup>	7 898 312.37 ± 4 589.96
萜类化合物	C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> O <sub>13</sub>	葎岩山皂苷 C	发挥抗炎作用 <sup>[28]</sup>	5 895 709.52 ± 3 629.78
黄酮类化合物	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	4',6,7-三羟基异黄酮	具有抗氧化和抗癌活性 <sup>[29]</sup>	3 255 287.15 ± 3 787.54
有机杂环化合物	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	对甲苯磺酸舒他西林	具有抗菌活性 <sup>[30]</sup>	3 066 841.43 ± 2 154.78
其它	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O	阿扎哌隆	有镇静及止吐作用 <sup>[31]</sup>	1 134 721.82 ± 1 765.16
脂类和类脂分子	C <sub>45</sub> H <sub>72</sub> O <sub>16</sub>	薯蓣皂苷	针对多种癌细胞有较好的抗癌活性 <sup>[32]</sup>	562 288.48 ± 447.54

表3 两歧双歧杆菌 B1628 中峰值靠前的活性物质

Table 3 Active substances with the highest peak in *Bifidobacterium bifidum* B1628

中文名称	化学式	名称	已报道功效	平均峰值
酮类及其衍生物	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> O <sub>11</sub>	升麻素苷	具有免疫抑制活性,起抗炎作用 <sup>[33]</sup>	811 889 455.21 ± 18 651.85
酚类化合物	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	丁香酚	具有抗菌,驱虫和抗氧化活性 <sup>[34]</sup>	61 078 242.57 ± 14 531.66
萜类化合物	C <sub>41</sub> H <sub>62</sub> O <sub>13</sub>	苦玄参苷 IA	可用于治疗感染,癌症和炎症 <sup>[35]</sup>	43 659 542.68 ± 12 671.34
氨基酸衍生物	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	四氢嘧啶	天然的细胞保护剂,可用于治疗过敏性鼻炎 <sup>[36]</sup>	21 221 899.80 ± 10 978.11
有机杂环化合物	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S	扎托洛芬	可作用于关节炎,发挥抗炎活性 <sup>[37]</sup>	9 133 509.36 ± 8 549.85
黄酮类化合物	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	异甘草素	黄酮类化合物,具有抗肿瘤的活性 <sup>[38]</sup>	9 039 127.17 ± 5 842.15
糖苷类化合物	C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>16</sub>	麦冬皂苷 D	用于治疗炎症和心血管疾病 <sup>[39]</sup>	5 395 453.63 ± 3 561.69
酯类化合物	C <sub>45</sub> H <sub>74</sub> O <sub>11</sub>	寡霉素 A	具有抗真菌的功能 <sup>[40]</sup>	2 403 546.77 ± 2 341.51
有机氮化合物	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub>	丁福明	具有抗癌活性 <sup>[41]</sup>	676 808.78 ± 257.88
木酚素和香豆素	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	牛蒡子苷元	有抗病毒和抗癌活性 <sup>[42]</sup>	565 862.88 ± 311.43
脂类和类脂分子	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	别孕烯醇酮	具有麻醉、催眠和镇静作用 <sup>[43]</sup>	332 849.42 ± 285.14
其它	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	L-高肌肽	防止 DNA 损伤 <sup>[44]</sup>	309 702.99 ± 286.26
苯类	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	大豆甙	具有抗氧化,抗癌,抗动脉粥样硬化活性 <sup>[45]</sup>	205 524.33 ± 216.83
黄酮类化合物	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	球松素查尔酮	对结肠癌细胞有抑制活性 <sup>[46]</sup>	198 529.95 ± 227.71
有机杂环化合物	C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	O-羟基阿伐他汀内酯	有效降低血脂的能力 <sup>[47]</sup>	125 493.19 ± 178.31

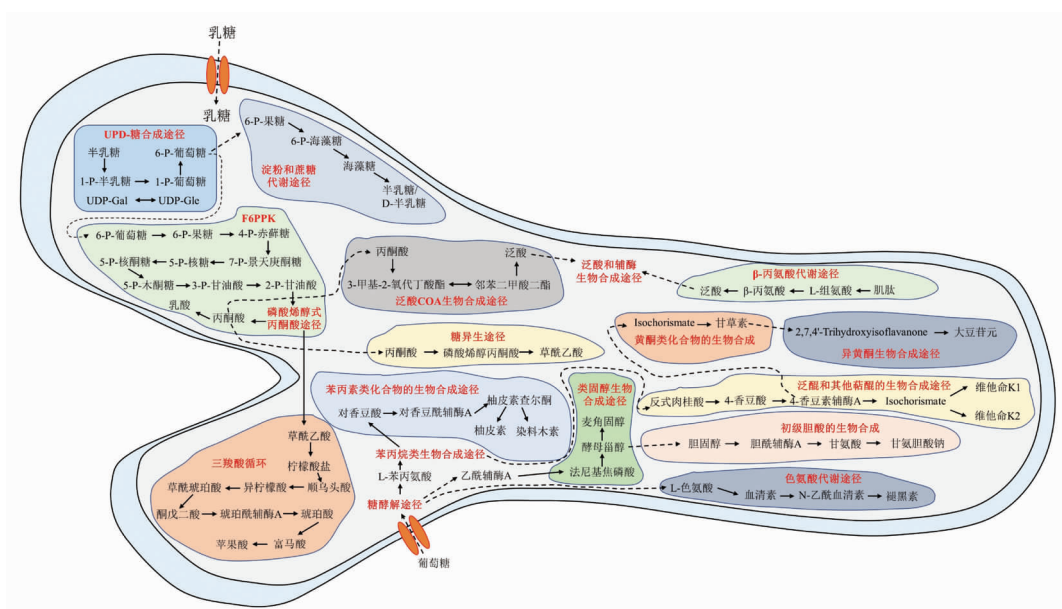
### 2.3 部分活性物质代谢通路分析

青春双歧杆菌 B8589 特有代谢途径有:肾素-血管紧张素途径、泛醌和其它萜类醌生物合成途径;两歧双歧杆菌 B1628 特有代谢途径有:异黄酮生物合成途径、初级胆汁酸生物合成途径和精氨酸-脯氨酸代谢途径。代谢通路上存在差异是菌株特异性的结果,对活性物质代谢通路进行分析,具体结果见图示。

在两株双歧杆菌的共有活性物质检索中,芹菜素是天然黄酮类化合物,是柚皮素在黄酮和黄酮醇的生物合成途径当中,经黄酮合酶的催化代谢生成。柚皮素可以显著降低血浆和肝脏当中的胆固醇含量<sup>[48]</sup>。该物质也可以通过次生代谢物的生物合成途径生成。褪黑素类物质在色氨酸代谢途径中,由色氨酸转化生成血清素,进一步代谢生成褪黑素,可以帮助失眠人群改善睡眠。双歧杆菌特有的 F6PPK 途径中产出的丙酮酸,进一步参与到原核生物碳固定途径及泛酸 COA 生物合成途

径,分别代谢生成草酰乙酸、异柠檬酸和泛酸类物质。泛酸同时可由  $\beta$ -丙氨酸代谢途径产出,可以起到制造抗体,帮助伤口愈合的疗效<sup>[49]</sup>。在两株双歧杆菌检索出的氟芬那酸(FFA)、茵芋苷、紫堇灵、阿魏酸甲酯、人参皂苷 CK 等物质,可以发挥其抗炎活性。例如,B1628 中检出的原阿片碱,作为一种具有抗炎作用的生物碱,原阿片碱在干扰组处理过的小鼠巨噬细胞种,可抑制相关蛋白激酶的表达,影响 NF- $\kappa$ B 信号传导来减轻小鼠的炎症反应<sup>[50]</sup>。

青春双歧杆菌 B8589 特有活性代谢物中,血管紧张素 II 由肾素-血管紧张素途径产出,在乳酸酶的催化作用下,血管紧张素 I 转化形成血管紧张素 II,且这两种物质可以继续参与到蛋白质合成途径和醇酮合成与分泌途径,该物质有助于调节人体血压及肾功能<sup>[51]</sup>。B8589 的活性物质中,检出的异嗪皮啶,是一种香豆素成分,由泛醌和其他萜类生物合成途径生成。在国外研究当中表明,



注:图中不同颜色表示不同代谢途径,并加以文字进行标注,虚线为同种物质在不同途径中的连接。

图 5 代谢途径分析

Fig.5 Analysis of metabolic pathways

该物质可以显著抑制肝癌细胞的扩散转移,在 mRNA 及蛋白质水平上抑制相关酶的表达,使得肝癌细胞当中的磷酸化进程受到抑制,且表明该物质很有可能成为靶向治疗肝癌的有效成分<sup>[52]</sup>。该途径可进一步利用苯丙烷生物合成途径中的产物反式肉桂酸代谢生成 4-香豆素,后进入泛醌和其他萘类醌生物合成途径,最终代谢生成维生素 K<sub>1</sub>、K<sub>2</sub>,其是一种非甾体类抗炎剂,能够抑制 COX-2 的活性。两者可以通过维生素 K 转化途径相互转化<sup>[53]</sup>。B8589 中检出的(±)-α-烟酸生育酚在血液当中,可以改善并降低红细胞膜上的氧化应激现象,有助于缓解 2 型糖尿病引发的心血管疾病<sup>[54]</sup>。

两歧双歧杆菌 B1628 特有活性代谢产物中,检出的黄豆苷由异黄酮生物合成途径产出,该通路也可代谢生成金雀异黄酮、芹菜素和柚皮素。苷氨酸利用类固醇生物合成途径生成的齐莫甾醇代谢生成胆固醇,进一步在初级胆汁酸生物合成途径产出苷氨酸。L-高肌肽,由三羧酸循环中产生的酮戊二酸,在精氨酸和脯氨酸代谢途径中进一步代谢生成,L-高肌肽具有抗氧化和抗炎作用,在人体当中由 GABA 在神经元当中生成,可以起到一定的抗惊厥作用<sup>[55]</sup>。B1628 中检出的球松素查尔酮,被证实对结肠癌细胞自噬有影响,该物质由

苯丙氨酸通过黄酮和类黄酮生物合成途径生成,前体物质为肉桂醛辅酶 A,发挥作用时通过促进 Bcl-2 信号通路的表达诱导细胞凋亡,提高了肿瘤细胞在小鼠体内的凋亡指数,使癌症细胞周期减缓甚至停滞,抑制结肠癌的生长<sup>[56]</sup>,该途径中生成的次级代谢产物异甘草素,在对糖尿病大鼠给予异甘草素干扰时,对糖醛还原酶有抑制活性,抑制了山梨糖醇在红细胞当中的积累,对糖尿病并发症有治疗功效<sup>[57]</sup>。检出的枯名醛、卡巴他赛等虽有功能活性,但并未检索到其产出的代谢途径。

### 3 结论

采用非靶向代谢组学技术分析两株双歧杆菌的菌体代谢产物,在青春双歧杆菌 B8589 和两歧双歧杆菌 B1628 中检出活性成分分别为 48 种和 35 种。以脂类和类脂分子、和黄酮类为主,其中可起到抗氧化、抗肿瘤、显示抗癌活性的代谢物成分对人体起到有益功效,具有潜在开发利用价值。

### 【致谢】

感谢内蒙古农业大学高层次/优秀博士人才引进科研启动项目(NDYB2021-17)、内蒙古农业大学食品科学与工程学院科技计划项目(SP-

KJ202206)的支持。

### 参 考 文 献

- [1] GRIMM V, WESTERMANN C, RIEDEL C U. *Bifidobacteria*-host interactions-an update on colonisation factors[J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 960826
- [2] 王婷, 彭敏, 童雅琴, 等. 后生元和类生元的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(3): 216-224. WANG T, PENG M, TONG Y Q, et al. Research progress of epibiotics and biolike elements[J]. Food Research and Development, 2022, 43(3): 216-224.
- [3] 李杨, 周湘人, 郭薇丹, 等. 后生元的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(16): 6558-6564. LI Y, ZHOU X R, GUO W D, et al. Research progress of epigenetic elements[J]. Food Safety Quality Inspection Journal, 2021, 12(16): 6558-6564.
- [4] HIDALGO-CANTABRANA C, DELGADO S, RUIZ L, et al. *Bifidobacteria* and their health-promoting effects[J]. Microbiol Spectr, 2017, 5(3): 10.1128.
- [5] 刘梦瑶, 阳田恬, 闫晓松, 等. 双歧杆菌及其后生元的益生功能与应用[J]. 饲料工业, 2022, 43(4): 9-14. LIU M Y, YANG T T, YAN X S, et al. The probiotic function and application of *Bifidobacteria* and their postbiotics[J]. Feed Industry, 2022, 43(4): 9-14
- [6] 白晓晔. 干酪乳杆菌 Zhang 和动物双歧杆菌乳亚种 V9 发酵乳缓解便秘机制研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020. BAI X Y. Study on the mechanism of relieving constipation by fermented milk of *Lactobacillus casei* Zhang and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis V9 [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.
- [7] 王婷, 彭敏, 童雅琴, 等. 后生元和类生元的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(3): 216-224. WANG T, PENG M, TONG Y Q, et al. Research progress of postbiotics and parabiotics[J]. Food Research and Development, 2022, 43(3): 216-224.
- [8] TAVERNITI V, GUGLIELMETTI S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept)[J]. Genes & Nutrition, 2011, 6(3): 261-274.
- [9] ARAI S, IWABUCHI N, TAKAHASHI S, et al. Orally administered heat-killed *Lactobacillus paracasei* MCC1849 enhances antigen-specific IgA secretion and induces follicular helper T cells in mice[J]. PLoS One, 2018, 13(6): e0199018.
- [10] ZHOU D, PAN Q, SHEN F, et al. Total fecal microbiota transplantation alleviates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice via beneficial regulation of gut microbiota[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1529.
- [11] RINSCHEN M M, IVANISEVIC J, GIERA M, et al. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019, 20(6): 353-367.
- [12] HUO J Q, FENG T T, FENG T T, et al. Non-targeted metabolomics reveals the characteristics of the unique bitterness substances in quinoa[J]. Heliyon, 2021, 7(17): e37133.
- [13] SOUZA A L, PATTI G J. A Protocol for untargeted metabolomic analysis: From sample preparation to data processing[M]//Mitochondrial Medicine: Volume 2: Assessing Mitochondria. New York, NY: Springer US, 2021: 357-382.
- [14] FIEHN O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling[J]. Current Protocols in Molecular Biology, 2016, 114(1): 1-32.
- [15] 阿基业, 何骏, 孙润彬. 代谢组学数据处理——主成分分析十个要点问题[J]. 药学学报, 2018, 53(6): 929-937. A J Y, HE J, SUN R B. Data processing of metabolomics - ten key issues of principal component analysis[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2018, 53(6): 929-937.
- [16] WORLEY B, POWERS R. PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability[J]. Curr Metabolomics, 2016, 4(2): 97-103.
- [17] ZAMORA OBANDO H R, DUARTE G H B, SIMIONATO A V C. Metabolomics data treatment: Basic directions of the full process[J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1336: 243-264.
- [18] MASUDA T, OGIURA M N, MORIYA T, et al. Beneficial effects of L- and N-type calcium chan-



- nel blocker on glucose and lipid metabolism and renal function in patients with hypertension and type II diabetes mellitus[J]. *Cardiovascular Therapeutics*, 2011, 29(1): 46–53.
- [19] AOKI T, YAMAGUCHI H, NAITO H, et al. Pre-medication with cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam reduced postoperative pain in patients after oral surgery[J]. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2006, 35(7): 613–617.
- [20] PASSOS F F B, LOPES E M, DE ARAÚJO J M, et al. Involvement of cholinergic and opioid system in  $\gamma$ -terpinene-mediated antinociception[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 3: 1–9.
- [21] ZHANG Z H, HAO C L, LIU P, et al. Valproic acid inhibits tumor angiogenesis in mice transplanted with Kasumi 1 leukemia cells[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 9(2): 443–449.
- [22] ZHOU H, LI H M, DU Y M, et al. C-geranylated flavanones from YingDe black tea and their antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibition activities[J]. *Food Chemistry*, 2017, 235: 227–233.
- [23] JIANG J, GRIEB B, THYAGARAJAN A, et al. Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF- $\kappa$ B signaling [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2008, 21(5): 577–584.
- [24] ROCA-CUSACHS A, TRIPOSKIADIS F. Antihypertensive effect of manidipine [J]. *Drugs*, 2005, 65: 11–19.
- [25] WEN M, WU J, LUO H, et al. Galangin induces autophagy through upregulation of p53 in HepG2 cells[J]. *Pharmacology*, 2012, 89(5/6): 247–255.
- [26] CHANG T H, SZABO E. Enhanced growth inhibition by combination differentiation therapy with ligands of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and inhibitors of histone deacetylase in adenocarcinoma of the lung[J]. *Clinical Cancer Research*, 2002, 8(4): 1206–1212.
- [27] YOSHIDA H, TERAMOTO T, IKEDA K, et al. Glycitein effect on suppressing the proliferation and stimulating the differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, 65(5): 1211–1213.
- [28] LEE Y, JUNG J C, ALI Z, et al. Anti-inflammatory effect of triterpene saponins isolated from blue cohosh (*Caulophyllum thalictroides*) [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 2(3): 1–8.
- [29] LEE D E, LEE K W, JUNG S K, et al. 6, 7, 4'-trihydroxyisoflavone inhibits HCT-116 human colon cancer cell proliferation by targeting CDK1 and CDK2[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(4): 629–635.
- [30] FRIEDEL H A, CAMPOLI-RICHARDS D M, GOA K L. Sultamicillin: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use[J]. *Drugs*, 1989, 37(4): 491–522.
- [31] DESMEDT L K C, VAN BRUGGEN J A A, NIEMEGEREERS C J E. The effects of azaperone, a sedative neuroleptic of the butyrophenone series, on dominant-subordinate behaviour in wistar rats competing for food[J]. *Psychopharmacologia*, 1975, 41: 285–289.
- [32] CHEN J, LI H M, ZHANG X N, et al. Dioscin-induced apoptosis of human LNCaP prostate carcinoma cells through activation of caspase-3 and modulation of Bcl-2 protein family[J]. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 2014, 34(1): 125–130.
- [33] ZHOU J, SUN Y Y, SUN M Y, et al. Prim-O-glucosylcimifugin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2017, 13(51): 378.
- [34] GARABADU D, SHAH A, SINGH S, et al. Protective effect of eugenol against restraint stress-induced gastrointestinal dysfunction: Potential use in irritable bowel syndrome[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2015, 53(7): 968–974.
- [35] WEN L, WEI Q Q, CHEN G, et al. Bioassay-and liquid chromatography/mass spectrometry-guided acetylcholinesterase inhibitors from *Picriafel-terrae*[J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2013, 9(Suppl 1): S25.
- [36] WERKHÄUSER N, BILSTEIN A, SONNEMANN U. Treatment of allergic rhinitis with ectoine containing nasal spray and eye drops in comparison with azelastine containing nasal spray and eye drops or with cromoglycic acid containing nasal spray[J]. *Journal of Allergy*, 2014, 5(12): 1–13.
- [37] HIRATE K, UCHIDA A, OGAWA Y, et al. Zaltoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, inhibits bradykinin-induced pain responses without blocking bradykinin receptors[J]. *Neuroscience Re-*

- search, 2006, 54(4): 288-294.
- [38] ZHANG X Y, ZHU P, ZHANG X Y, et al. Natural antioxidant-isoliquiritigenin ameliorates contractile dysfunction of hypoxic cardiomyocytes via AMPK signaling pathway[J]. *Mediators of Inflammation*, 2013, 5(1): 1-10.
- [39] WANG L, JIANG X L, ZHANG W M, et al. Homo-aro -cholestane, furostane and spirostane saponins from the tubers of *Ophiopogon japonicus*[J]. *Phytochemistry*, 2017, 136: 125-132.
- [40] SALOMON A R, VOEHRINGER D W, HERZENBERG L A, et al. Apoptolidin, a selective cytotoxic agent, is an inhibitor of FOF1-ATPase[J]. *Chemistry & Biology*, 2001, 8(1): 71-80.
- [41] LI J, CHEN L, LIU Q L, et al. Bufornin suppresses proliferation and invasion via AMPK/S6 pathway in cervical cancer and synergizes with paclitaxel[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2018, 19(6): 507-517.
- [42] YANG S C, MA J, XIAO J B, et al. Arctigenin anti-tumor activity in bladder cancer T24 cell line through induction of cell-cycle arrest and apoptosis [J]. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 2012, 295(8): 1260-1266.
- [43] DEBATIN T, BARBOSA A D E. Effect of isopregnanolone on rapid tolerance to the anxiolytic effect of ethanol[J]. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 2006, 28(1): 18-23.
- [44] KUMRUNGSEE T, ARIMA T, SATO K, et al. Dietary GABA induces endogenous synthesis of a novel imidazole peptide homocarnosine in mouse skeletal muscles[J]. *Amino Acids*, 2020, 52(5): 743-753.
- [45] KEUNG W M, VALLEE B L. Kudzu root: An ancient Chinese source of modern antidipsotropic agents[J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(4): 499-506.
- [46] MOHAMMED I A, AKHTAR M N, BIAU F J, et al. Isolation of cardamonin and pinostrobin chalcone from the rhizomes of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. And their cytotoxic effects on H-29 and MDA-MB-231 cancer cell lines [J]. *The Natural Products Journal*, 2019, 9(4): 341-348.
- [47] GUO C X, PEI Q, YIN J Y, et al. Effects of Ginkgo biloba extracts on pharmacokinetics and efficacy of atorvastatin based on plasma indices [J]. *Xenobiotica*, 2012, 42(8): 784-790.
- [48] MULVIHILL E E, ALLISTER E M, SUTHERLAND B G, et al. Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2009, 58(10): 2198-2210.
- [49] TAHILIANI A G, BEINLICH C J. Pantothenic acid in health and disease [J]. *Vitamins & Hormones*, 1991, 46: 165-228.
- [50] CHEN C H, LIAO C H, CHANG Y L, et al. Protopine, a novel microtubule-stabilizing agent, causes mitotic arrest and apoptotic cell death in human hormone-refractory prostate cancer cell lines[J]. *Cancer Letters*, 2012, 315(1): 1-11.
- [51] DE GASPARO M, CATT K J, INAGAMI T, et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors [J]. *Pharmacological Reviews*, 2000, 52(3): 415-472.
- [52] YAMAZAKI T, TOKIWA T. Isofraxidin, a coumarin component from *Acanthopanax senticosus*, inhibits matrix metalloproteinase-7 expression and cell invasion of human hepatoma cells [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 33(10): 1716-1722.
- [53] MANNA P, KALITA J. Beneficial role of vitamin K supplementation on insulin sensitivity, glucose metabolism, and the reduced risk of type 2 diabetes: A review [J]. *Nutrition*, 2016, 32(7/8): 732-739.
- [54] CHUNG T W, HAU YU J J, LIU D Z. Reducing lipid peroxidation stress of erythrocyte membrane by  $\alpha$ -tocopherol nicotinate plays an important role in improving blood rheological properties in Type 2 diabetic patients with retinopathy [J]. *Diabetic Medicine*, 1998, 15(5): 380-385.
- [55] KUMRUNGSEE T, ARIMA T, SATO K, et al. Dietary GABA induces endogenous synthesis of a novel imidazole peptide homocarnosine in mouse skeletal muscles [J]. *Amino Acids*, 2020, 52(5): 743-753.
- [56] GAO G Y, MA J, LU P, et al. Ophiopogonin B induces the autophagy and apoptosis of colon cancer cells by activating JNK/c-Jun signaling pathway [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 108: 1208-1215.
- [57] YAMAZAKI T, TOKIWA T. Isofraxidin, a coumarin component from *Acanthopanax senticosus*, inhibits

matrix metalloproteinase-7 expression and cell invasion of human hepatoma cells [J]. *Biological and*

*Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 33(10): 1716-1722.

### Studies on Active Functional Components of Two Strains of *Bifidobacteria*

Yang Zhan, Nie Xin, Liu Kailong, Zhang Heping, Yao Guoqiang\*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering of Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Processing of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering of Inner Mongolia Autonomous Region, Collaborative Innovative Center of Ministry of Education for Lactic Acid Bacteria and Fermented Dairy Products, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

**Abstract** Objective: The study of the functional properties of active substances in postbiotic products is key to elucidating their probiotic mechanisms. By investigating the metabolic components and bioactive functions of *Bifidobacterium* cells, the probiotic functions of *Bifidobacterium* as a postbiotic can be better characterized. Methods: The dried cells of *Bifidobacterium adolescentis* B8589 and *Bifidobacterium bifidum* B1628 obtained from high-density fermentation were selected as the research subjects. Untargeted metabolomics was used to study the functional components of the cells. Results: A total of 48 bioactive metabolites, primarily flavonoids, lipids, and lipid-like molecules, were identified in *B. adolescentis* B8589, including daidzein and galangin. Meanwhile, 35 bioactive metabolites, primarily organic heterocyclic compounds, lipids, and lipid-like molecules, were identified in *B. bifidum* B1628, including tetrahydropyrimidine and isoglycyrrhizin. Among these, both B8589 and B1628 shared active metabolites mainly composed of flavonoids. These bioactive components exhibit antioxidant, antitumor, and anticancer properties, contributing positively to human health. Conclusion: During the development of *Bifidobacterium*-based postbiotic products, the identification of beneficial active components within *Bifidobacterium* cells can serve as a valuable reference for evaluating functional components and facilitating industrial applications.

**Keywords** *Bifidobacterium adolescentis*; *Bifidobacterium bifidum*; untargeted metabolomics; active substances