文章编号：1009-038X(2004)04-0069-05

酸与胆汁盐耐性双歧杆菌菌种的筛选

SHIGWEDHA Nditange[1,2]， 杨 颖[1]， 张 灏[1]， 贾 莉[1]
(1. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214036；2. 纳米比亚大学 食品科学与技术部，纳米比亚温得和克，专用邮箱 13301)

摘 要：从婴儿粪便和药品中筛选到耐酸和胆汁盐的 2 株双歧杆菌菌种，分别命名为 *Bi. bifidum* WN-04 与 *Bi. longum* GB-03. 在 pH 值 2.0 条件下培养 2 h 后再于胆汁盐质量浓度 1.0 g/dL 的条件下培养 2 h. 2 株菌在 pH 值分别为 2.0 和 3.0 的 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液中存活率较高；在胆汁盐质量浓度分别为 0.25，0.5，1.0 g/dL 和 2.0 g/dL，pH 值为 6.8 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液中存活率也较高，胆汁盐耐受性没有明显区别. 在 4 ℃保存于新鲜牛乳中，*Bi. bifidum* WN-04 能够在 8 周内保持最高活菌数[lg(CFU/mL) >9]，其它菌种活菌数[lg(CFU/mL)] <8.

关键词：双歧杆菌；筛选；酸与胆汁耐受性；婴儿粪便
中图分类号：Q 933 **文献标识码**：A

Screening of *Bifidobacterium* Strains with Resistances to Acids and Bile Salts

SHIGWEDHA Nditange[1,2]， YANG Ying[1]， ZHANG Hao[1]， JIA Li[1]
(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. University of Namibia, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Windhoek, Namibia, Private Bag 13301)

Abstract: Low pH and high bile salts resistant strains of *Bifidobacterium* were isolated from infant feces and a pharmaceutical product. Strains were firstly pre-enriched in Raffinose *Bifidobacterium* (RB) medium before stressed in an acid (pH 3.0) and then in 1.0 g/dL bile salt for 2 hr. Two isolates, designated *Bi. longum* GB-03 and *Bi. bifidum* WN-04, showed considerably high survival rates when incubated in 50 mmol phosphate buffer solution with pH 2.0 or 3.0. The survival rate was also high in the same buffer solution (pH 6.8) containing oxgall of 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 g/dL. Both isolates were not significantly different in the survial properties when tested at these different bile salts concentrations. All strains tested had similar growth rates at pH 4.5. *Bi. bifidum* WN-04 showed high culture stability (lg CFU/mL > 9) when grown in fresh milk at 4 ℃, while all others declined below 8.
Key words: *Bifidobacterium*; isolation; acid and bile resistance; infant feces

收稿日期：2003-05-28； **修回日期**：2003-11-24.
作者简介：SHIGWEDHA Nditange(1974-)，男，纳米比亚人，江南大学食品科学与工程硕士研究生.

万方数据

双歧杆菌是人和动物肠道正常菌群的重要成员[1],在维持肠道菌群平衡方面起着重要作用[2],目前已经检验的有32种.据报道,大量双歧杆菌能够抑制外源病原体的增殖[3,4],其原因可能是双歧杆菌在肠道表面形成生物膜或者通过分泌乙酸与乳酸等降低肠道pH值,阻止病原体增殖[2,5].摄入产生β-半乳糖苷酶的双歧杆菌或者饮用经双歧杆菌发酵的牛乳还可以缓解特定人群的乳糖不耐症状[6,7],增强人体免疫力,提高对癌症的抵抗力[8]等.

能够在肠道定植的双歧杆菌必须对人体的消化道环境有良好的适应性,在低pH值的胃液和高胆汁盐质量浓度的小肠中有一定的存活率[9].不同双歧杆菌对于胃酸和胆汁的耐受力不同[9,10].本实验分别从婴儿粪便和双歧杆菌药品中筛选出对于酸和胆汁质量浓度具有较好耐受性的菌株.

1 材料与方法

1.1 增殖和分离培养基

棉子糖-双歧杆菌(RB)[1]培养基用作双歧杆菌的增殖培养基并进行平板稀释培养测定菌落形成单位;MRS[11]培养基用于培养分离所得的菌种.分别用盐酸与牛胆汁盐(上海化学试剂公司产品)降低培养基pH值,提高胆汁质量浓度.

1.2 菌种的来源、分离与鉴定

1.2.1 来源 参照菌种:*Bi. infantis*(婴儿双歧杆菌)CGMCCC 1.505,购于中国普通微生物培养保藏中心(北京);*Bi. adolescentis*(青春双歧杆菌)Sun 2001.09为本实验室保存菌;*Bi. bifidum* WN-04(两歧双歧杆菌WN-04)分离于无锡第四人民医院4 d龄婴儿的粪便;*Bi. longum* GB-03(长双歧杆菌GB-03)分离自金双歧药品Golden Bifid、双歧杆菌和嗜热链球菌与保加利亚乳酸菌的混合物.

1.2.2 分离 *Bi. bifidum* WN-04样品每天9:00之前收集,置于灭菌的30 mL试管中塞紧,在排泄之后20 min之内处理或者保存于厌氧环境(最长10 h).

每1.0 g样品于10 mL RB肉汤培养基中活化12 h后,转接1.0 mL到pH 3.0的新鲜RB培养基中,38.5 ℃厌氧培养2 h.酸处理以后将季氨氯化物培养基(1.0 mL)添加到新鲜的RB培养基中,补充质量浓度1.0 g/dL的牛胆汁盐于38.5 ℃继续培养3 h.将最终培养物进行梯度稀释(10倍)并添加体积分数10%的甘油.每一稀释度取100 μL直接接种于RB和MRS琼脂平板上,培养3 d并选择耐性双歧杆菌菌落.

Bi. longum GB-03的分离步骤同上.

1.2.3 鉴定 采用bioMerieux公司的API 50 CH试剂盒检验6-磷酸果糖磷酸激酶[12]的存在,并进行革兰氏染色/形态学观察.挑取6-磷酸果糖磷酸激酶阳性的革兰氏阳性杆菌,检测糖发酵情况(见表1).

表1 菌种的特性鉴定

Tab.1 Identity characterization of the isolates and reference strains

特 性	*Bi. bifidum* WN-04	*Bi. longum* GB-03	*Bi. infantis*	*Bi. adolescentis*
孢子形成	-	-	-	-
革兰氏反应	+	+	+	+
形态 杆状、双叉	+	+	+	+
厌氧生长	+	+	+	+
好氧生长	-	-	-	-
利用乳酸产气	-	-	-	-
过氧化氢酶	-	-	-	-
F6PPK	+	+	+	+
醋酸盐与乳酸盐产品	+	+	+	+
运动性	-	-	-	-
发酵实验				
纤维二糖	-	+	-	+
果糖	+	+	+	+
低聚果糖	-	+	+	+
半乳糖	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+
异麦芽糖	-	+	+	+
乳糖	+	+	+	+
麦芽糖醇	-	-	-	-
甘露糖	-	-	-	-
松三糖	-	-	-	-
棉子糖	+	+	+	+
水苏糖	+	+	+	+
海藻糖	-	-	-	-
木糖	-	+	-	+

注:1. +表示正反应或者发酵,-表示负反应或者没有观察到发酵现象;2. 麦芽糖醇已经广泛用作防止龋齿的甜味剂和糖类替代品,但仍然没有作为益生剂应用;3. 用HPLC系统检验发酵脱脂牛乳中乙酸盐和乳酸盐.

1.3 在不同pH值胆汁盐质量浓度培养基中生长

分别将100 μL(活菌数约为10^8 CFU/mL)培养物转接到pH值依次为6.8,5.0,4.5与4.3以及pH值为5.5,而胆汁盐质量浓度分别为0.05,0.15

万方数据

g/dL 的 15 mL 新鲜 RB 培养基中，38.5 ℃厌氧培养. 采用分光光度计（WFJ 2000，尤尼卡公司产品）每 3 h 测定一次细胞数的吸光度（A_{620nm}）. 另外用梯度稀释平板法进一步确认活菌数.

1.4　在不同 pH 值胆汁盐质量浓度下的存活率

分别将 100 μL 培养物转接到 pH 值为 2.0 与 3.0 的 50 mmol/L 无菌磷酸盐缓冲液中，每 30 min 取样一次，38.5 ℃厌氧培养于 RB 琼脂培养基上测定其存活率. 以同样方法测定质量浓度为 0.25，0.5，1.0 和 2.0 g/dL 的胆汁盐对于细胞生长的影响.

1.5　在新鲜牛乳中的存活情况

购于无锡天润发超市的新鲜牛乳提前在 95 ℃水浴中预热 15 min，以 $10^7 \sim 10^9$ CFU/mL 的接种量、38.5 ℃厌氧培养 16 h 后保存于 4 ℃的冰箱中，以 RB 琼脂培养基为计数平板每 2 周测定一次活菌数.

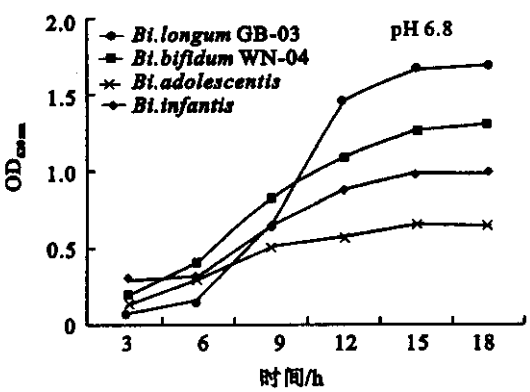
2　结　果

2.1　耐性菌种的鉴定

将 2 株革兰氏阳性、6-磷酸果糖磷酸激酶阳性的杆菌 API 系统的鉴定结果与伯杰氏细菌鉴定手册对照[12]，将其鉴定为双歧杆菌.

2.2　不同 pH 值条件下的生长与存活

各菌种在 pH 值分别为 6.8，5.0，4.5 和 4.3 的 RB 培养基上的生长情况见图 1（接种量为 10^8 CFU/mL）. 在 pH 值 6.8，5.0，4.5 时的生长情况各不相同，所有菌种在 pH 值 4.3 时都未见生长. 将菌种在 pH 值为 2.0 和 3.0 缓冲液中的存活率与 pH 值4.5的 RB 培养基上的存活率相比较，前者的活细胞下降率更显著（见表 2）. pH 值 2.0 处理 1 h 后 *Bi. bifidum* WN-04 与 *Bi. longum* GB-03 的活菌数分别下降了 100 倍和 1 000 倍，表现出最高的存活率；pH 值 3.0 处理 2 h 后其活细胞数仅仅下降了 100 倍.



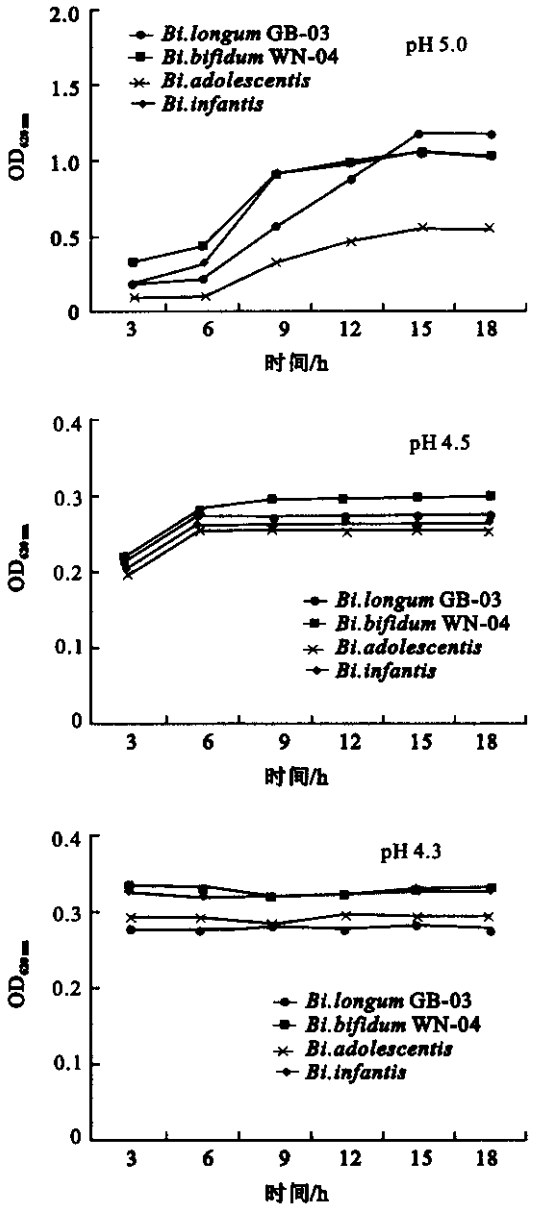


图 1　菌种在不同 pH 值的 RB 培养基中的生长情况

Fig. 1　The growth curves at different pH levels in RB medium

2.3　低 pH 值和不同胆汁盐质量浓度下菌种的生长与存活

L. S. D 实验表明，培养 18 h 后酸与胆汁盐耐性菌种的生长情况在质量浓度 0.05 g/dL 水平上有显著差异；0.15 g/dL 时 *Bi. bifidum* WN-04 的细胞生长情况不同；*Bi. bifidum* WN-04 和 *Bi. longum* GB-03 表现了最高的胆汁耐性.

2.4　菌株在新鲜牛奶中的存活情况

由图 2 可见，在冷藏温度下，菌株 *Bi. longum* GB-03 和 *Bi. adolescentis* 在 6 周内的存活情况很相似，但菌株 *Bi. bifidum* WN-04 在培养时间达 2 个月时仍保持较低的衰亡速率，具有很大的应用价值.

万方数据

表2 菌种在低pH值和高胆汁盐质量浓度下的生长与存活情况

Tab. 2 Survival rates of the isolates and reference strains at low pH and high bile salt concentrations

暴露30 min

菌种	pH值		胆汁质量浓度/(g/dL)			
	pH 3	pH 2	0.25	0.5	1.0	2.0
Bi. infantis 1.505	6.4±0.32	3.2±0.05	7.9± 0.25	6.2±0.25	3.0±0.08	0
Bi. adolescentis Sun	2.3±0.19	1.7±0.22	7.7±0.23	4.6±0.09	4.6±0.08	0
Bi. bifidum WN-04	6.6±0.07	3.4±0.09	8.0±0.13	6.7±0.23	5.3±0.23	0
Bi. longum GB-03	6.5±1.21	2.0±0.22	7.6±0.34	5.5±0.11	5.2±0.11	0

暴露60 min

菌种	pH值		胆汁质量浓度/(g/dL)			
	pH 3	pH 2	0.25	0.5	1.0	2.0
Bi. infantis 1.505	5.6 ±0.31	2.0 ±0.05	7.2±0.25	6.0±0.17	2.0±0.12	0
Bi. adolescentis Sun	0	0	5.7±0.23	4.4±0.06	1.4±0.25	0
Bi. bifidum WN-04	5.9 ±0.06	1.8±0.09	7.7±0.13	6.5±0.31	3.3±0.22	0
Bi. longum GB-03	5.0±1.11	1.0±0.99	6.8±0.31	5.3±0.19	2.2±0.22	0

暴露90 min

菌种	pH值		胆汁质量浓度/(g/dL)			
	pH 3	pH 2	0.25	0.5	1.0	2.0
Bi. infantis 1.505	3.2 ±0.24	0.2 ±0.02	6.6±0.30	5.7±0.12	1.0±0.13	0
Bi. adolescentis Sun	–	–	4.3±0.11	3.6±0.10	0	0
Bi. bifidum WN-04	4.0 ±0.22	0.4±0.08	7.6±0.12	5.8±0.22	2.1±0.08	0
Bi. longum GB-03	2.0±1.28	0	6.6±0.34	4.8±0.01	0.2±0.21	0

暴露120 min

菌种	pH值		胆汁质量浓度/(g/dL)			
	pH 3	pH 2	0.25	0.5	1.0	2.0
Bi. infantis 1.505	1.6 ±0.020	0	6.1±0.05	5.1±0.25	0	–
Bi. adolescentis Sun	–	–	3.5±0.23	1.8±0.11	0	–
Bi. bifidum WN-04	1.8 ±0.11	0.2 ±0.01	7.3±0.14	5.0±0.23	1.5±0.01	–
Bi. longum GB-03	0	0	6.1±0.08	4.5±0.11	0	–

注:表内数值[lg(CFU/mL)]为处理后38.5 ℃培养2 h所测定的活菌数,均为2次平行实验的平均值.

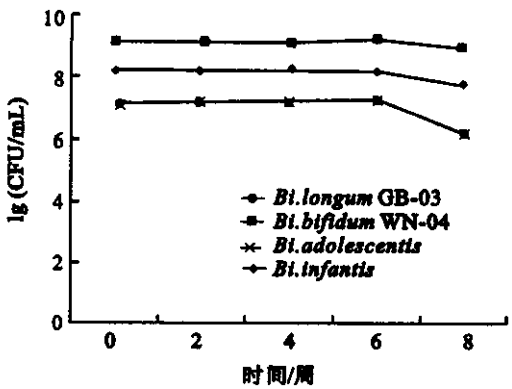


图2 菌株在新鲜牛乳中4 ℃冷藏8周时的稳定性

Fig. 2 Stability curve of the isolates and reference strains in fermented fresh milk at refrigeration temperature (4 ℃), for 8 weeks

3 讨 论

人体胃液的pH值一般在3.0以下,几乎可以抑制所有细菌生长,也能杀灭一些生活周期短的细菌.在进餐期间或者饭后很短的时间内,胃部的pH值可以升到6.0左右[13],进入小肠之前短期双歧杆菌可能在胃液中存活.肠道分泌物中只有胆汁具有较强的抑菌效果.据报道,小肠下部分胆汁被稀释,pH值接近中性[14],有利于双歧杆菌通过消化道并在肠道中定植生长.

对酸和胆汁盐耐受性较好的菌株更易在人体肠道内定植.Ibrahim与Bezkorovainy报道[15],当胆汁盐质量浓度变化范围达3 g/L时,婴儿双歧杆菌具有最高的存活率,其次是两歧双歧、短双歧和长双歧杆菌.而Clark与Martin的报道[9]认为,胆汁盐质量浓度为2.0 g/dL或4.0 g/dL时,长双歧杆菌具有最高的耐受力,其次是两歧双歧与婴儿双歧杆菌.这些结果表明,某些特异性菌株对胆汁盐具有抗性.

本实验中,2株耐性菌种*Bi. longum* GB-03与*Bi. bifidum* WN-04在胆汁盐质量浓度为0.25 g/dL的培养基中生长良好.测定其在胆汁盐质量浓度分

万方数据

别为 0.5 g/dL 和 1.5 g/dL 的 RB 肉汤培养基上的存活率进一步确认了 2 株菌的耐性. 起始 pH 值为 5.0 和 6.8 时耐性菌株比参照菌株的最终活菌数大得多,可见,实验选择的菌种对生长中产生的酸具有更好的耐性. 在 MRS 培养基中连续转接 1 年时间依然保持对酸和胆汁的耐性. 将选择的菌种接种在新鲜牛乳保存于 4 ℃冰箱中,可以保持最高细胞数达 2 个月之久,后期 *Bi. bifidum* WN-04 的存活率尤其高. 乙酸是双歧杆菌发酵的主要副产物,对于乙酸(相对于盐酸而言)耐受性的增加对其生存率的影响可能更大. 实验分离的 2 株双歧杆菌菌种 *Bi. longum* GB-03 和 *Bi. bifidum* WN-04 是通过酸与胆汁盐的压力选择实验得到的,其在低 pH 值或高胆汁盐质量浓度下具有良好的生长情况和较高的存活率. 实验结果表明,本研究所采用的筛选程序是有效的、可行的,所选择的菌种有可能在乳品工业上获得应用.

参考文献:

[1] Hartemink R. Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria [J]. **J Appl Meth**, 1996, 27: 33 – 43.

[2] Homma N. Bifidobacteria as a resistance factor in human beings [J]. **Bifidobact Microfl**, 1988, 7: 35 – 43.

[3] Gibson GR, Wang X J. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria [J]. **Appl Bacteriol**, 1994, 77: 412 – 420.

[4] Gilliland SE. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria [J]. **FEMS Microbiol Rev**, 1990, 87: 175 – 188.

[5] Araya-Kojima T, Yaeshima T, Ishibashi N, *et al.* Inhibitory effects of human-derived Bifidobacterium on pathogenic *E. coli* serotype O-111 [J]. **Biosci Microfl**, 1996, 15: 17 – 22.

[6] Mustapha A, Jiang T, Savaiano DK J. Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk [J]. **Dairy Sci**, 1997, 80: 1537 – 1545.

[7] Rasic JL, Kurmann JA. Bifidobacteria and Their Role [M]. Switzerland: Birkhauser Verlag Basal, 1983.

[8] Sekine K, Toida T, Saito M, *et al.* A new morphological characterized cell wall preparation from Bifidobacterium infantis [J]. **Cancer Res**, 1985, 45: 1300 – 1307.

[9] Clark PA, Martin JH. Selection of bifidobacteria for use as adjuncts in cultured dairy foods [J]. **Cult Dairy Prod J**, 1994, 29: 18 – 21.

[10] Berrada N, Lemeland JF, Laroche G, *et al.* Bifidobacterium from fermented milks: survival during gastric transit [J]. **Dairy Sci**, 1991, 74: 409 – 413.

[11] DE Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for cultivation of lactobacilli [J]. **J Appl Bacteriol**, 1960, 23: 130 – 135.

[12] Scardovi V. Genus Bifidobacterium [M]. New York: Williams & Wilkins, 1986.

[13] Hill MJ. The normal gut bacteria flora [A]. Hill MJ. Role of Gut Bacteria in Human Toxicology and Puharmacology [C]. New York: Wilkins -Interscience, 1995.

[14] Lee A. Neglected niches - the microbial ecology of the gastrointestinal tract [J]. **Adv Micr Ecol**, 1985, 8: 115 – 162.

[15] Ibrahim SA, Bezkorovainy A. Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt [J]. **J Sci Food Agric**, 1993, 62: 351 – 354.

(责任编辑 杨 勇)

万方数据