

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

蔡静静, 徐晓裕, 张艳, 张亚川, 魏小晶, 阚泽宇, 倪永清*
 (石河子大学食品学院, 新疆 石河子 832000)

摘要: 使用Wilkins-Chalgren厌氧菌琼脂和BSM培养基作为筛选平板, 结合重复基因外回文序列-聚合酶链式反应和16S rRNA序列分析, 对新疆维吾尔族婴儿及其母亲粪便中的双歧杆菌(*Bifidobacterium*)进行分离鉴定, 并筛选出高产胞外多糖的双歧杆菌, 测定其多糖的抗氧化活性以及菌株的耐受性和黏附性。结果显示, 20份粪便样品中共分离出52株双歧杆菌, 其中假小链双歧杆菌(*B. pseudocatenulatum*)14株, 假长双歧杆菌(*B. pseudolongum*)8株, 两歧双歧杆菌(*B. bifidum*)9株, 短双歧杆菌(*B. breve*)7株, 长双歧杆菌婴儿亚种(*B. longum* subsp. *infantis*)5株, 动物双歧杆菌乳亚种(*B. animal* subsp. *lactis*)6株以及长双歧杆菌(*B. longum*)3株。经过表型初筛和苯酚-硫酸法复筛, 共筛选出7株高产胞外多糖的双歧杆菌, 37℃发酵36 h后胞外多糖产量均可达400 mg/L以上。抗氧化活性实验结果表明7株双歧杆菌所产的胞外多糖对过氧化氢自由基、超氧阴离子自由基、羟自由基和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基均有清除能力。此外, 菌株BF66-16相较于其他几株双歧杆菌具有较强的胃肠道耐受性以及黏附性, 因此来源于婴儿粪便的BF66-16可以作为潜在的抗氧化菌株应用于制药和食品工业中。

关键词: 双歧杆菌; 重复基因外回文序列-聚合酶链式反应; 胞外多糖; 抗氧化活性

Screening for and Antioxidant Activities of High Exopolysaccharide-Producing *Bifidobacterium* from the Intestinal Tract of Uygur Infants and Their Mothers in Xinjiang

CAI Jingjing, XU Xiaoyu, ZHANG Yan, ZHANG Yachuan, WEI Xiaoqing, KAN Zeyu, NI Yongqing*
 (Food College, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: This study aimed to isolate and identify *Bifidobacterium* strains from the feces of Uygur infants and their mothers' in Xinjiang. Using Wilkins-Chalgren anaerobic agar and BSM medium plates, *Bifidobacterium* strains were isolated and they were identified by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction (rep-PCR) fingerprinting and 16S rRNA gene analysis. High-yield exopolysaccharides (EPS) producing strains were selected from these isolates and the antioxidant activities of the EPS produced by the selected strains as well as their tolerance and auto-adhesion ability were evaluated. The results showed that a total of 52 stains of *Bifidobacterium* were isolated from 20 feces samples and they belonged to *B. pseudocatenulatum* (14 strains), *B. pseudolongum* (8 strains), *B. bifidum* (9 strains), *B. breve* (7 strains), *B. longum* subsp. *infantis* (5 strains), *B. animal* subsp. *lactis* (6 strains) and *B. longum* (3 strains), respectively. Through phenotype screening and secondary screening using the phenol sulfuric acid method, we found 7 strains of *Bifidobacterium* with higher EPS yield. The yield of EPS produced by each of the 7 strains was more than 400 mg/L after 36 h fermentation at 37℃. The EPS had the ability to scavenge H₂O₂, superoxide anion, hydroxyl and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. Besides, strain BF66-16 had stronger tolerance to gastrointestinal juice and auto-adhesion ability than the other six strains. Thus, BF66-16 can be used as a potential antioxidant strain in the pharmaceutical and food industries.

Keywords: *Bifidobacterium*; repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction; exopolysaccharides; antioxidant activities
 DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190305-044

中图分类号: Q938

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2020) 08-0144-08

收稿日期: 2019-03-05

基金项目: 石河子大学高层次人才启动项目(CZX201432R)

第一作者简介: 蔡静静(1993—)(ORCID: 0000-0002-2106-8165), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: 694551934@qq.com

*通信作者简介: 倪永清(1969—)(ORCID: 0000-0002-7943-3882), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物学。

E-mail: niyqlzu@sina.com

引文格式:

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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190305-044. <http://www.spkx.net.cn>

CAI Jingjing, XU Xiaoyu, ZHANG Yan, et al. Screening for and antioxidant activities of high exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* from the intestinal tract of Uygur infants and their mothers in Xinjiang[J]. Food Science, 2020, 41(8): 144-151. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190305-044. <http://www.spkx.net.cn>

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是人体肠道内一类重要的益生菌,具有抗肿瘤、抗氧化、降胆固醇、维持肠道菌群平衡和免疫调节等生理功能^[1-6]。双歧杆菌胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是其生长代谢过程中产生的次级代谢产物,属于高分子生物聚合物,它们附着在细胞表面或分泌到环境中^[7]。目前报道的产生EPS的双歧杆菌包括*B. animalis*、*B. breve*、*B. longum*、*B. bifidum*、*B. longum* subsp. *infantis*、*B. pseudocatenulatum*和*B. adolescentis*^[8]。近年来,关于乳酸菌EPS的功能及其在奶制品中的应用报道有很多,然而关于双歧杆菌EPS的研究却很少。研究表明,双歧杆菌产生的EPS不仅可以调节肠道菌群结构并发挥其生物活性作用促进宿主健康^[9],还可以作为保护层帮助双歧杆菌在胃肠道逆环境中存活^[10],Alp等^[11]从母乳喂养的婴儿粪便中分离出31株双歧杆菌,发现EPS产量与其耐酸耐胆盐能力之间呈正相关。高产EPS是选择益生双歧杆菌的一个重要特征^[12]。

生物体内的氧化应激是由活性氧(reactive oxygen species, ROS)的负荷或积累增加引起的,当ROS在生物体中的积累过多时会对DNA、碳水化合物、脂质和蛋白质造成损害^[13],一般使用抗氧化剂中和这些ROS。国内外许多研究表明双歧杆菌EPS具有一定的抗氧化活性,Li Shengjie等^[14]发现从人粪便内分离的*B. bifidum* WBIN03产生的EPS对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基有较强的清除能力;有学者比较了从广西长寿老人粪便中分离的*B. animalis* RH两个级分EPS(中性EPS和酸性EPS)的体外抗氧化活性,发现它们对脂质过氧化和DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基均显示出抑制作用^[15]。

新疆独特的地理位置、特殊的文化习俗和饮食习惯为天然益生菌的开发提供了丰富的资源。本研究对新疆维吾尔族肠道中筛选的双歧杆菌进行EPS产量测定,并探究其所产EPS的抗氧化活性,菌株在模拟胃肠液中的存活情况以及体外黏附性,进而筛选出EPS产量高、抗氧化活性好且能够以较高的数量在胃肠道中存活的双歧杆菌,以期为后续开发适合少数民族群体的抗氧化型产品提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Wilkins-Chalgren厌氧菌琼脂参考文献[16]; BSM培养基^[17]:在MRS培养基基础上每升添加0.5 g半胱氨酸盐酸盐、50 mg莫匹罗星、25 mg制霉菌素;脱脂乳培养基^[18]:每升90 g脱脂乳、3.5 g酵母提取物、3.5 g蛋白胨和10 g葡萄糖,105 °C灭菌10 min。

DNA提取试剂盒 北京全式金生物技术有限公司;Tris碱、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、邻苯三酚、浓盐酸、硫酸亚铁、过氧化氢、无水乙醇、无水甲醇、三氯化铁、铁氰化钾、三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)(均为分析纯) 北京博奥拓达科技有限公司。

1.2 仪器与设备

多功能酶标仪 美国BioTek仪器有限公司;pH计梅特勒-托利多仪器有限公司;聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪 英国Techne公司;HWS智能型恒温恒湿培养箱 太仓市华美生化仪器厂;H2050R-2离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司;厌氧培养箱 英国DWS公司;水平电泳仪、凝胶成像系统美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集及预处理

样品采自新疆维吾尔族的婴儿粪便及其母亲粪便。使用粪便采样器采集样品,置于车载冰箱中-20 °C保存,24 h之内转运至实验室。

1.3.2 双歧杆菌的分离、纯化和保藏

样品用无菌生理盐水稀释至 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} ,分别吸取原液和样品稀释液100 μL涂布均匀于Wilkins-Chalgren厌氧菌琼脂和BSM平板上,每个梯度3个平行。将平板置于37 °C厌氧培养箱中培养2~3 d,挑取平板上的单菌落进行革兰氏染色,并使用相差显微镜观察细胞形态,选择具有双歧杆菌典型特征的菌落在平板上继续划线纯化,直至镜检菌体细胞的形态和排列方式一致。将所选菌株液体富集后加甘油和新鲜液体培养基用2 mL冻藏管放置于-20 °C冰箱保藏备用。

1.3.3 双歧杆菌的生物学鉴定

1.3.3.1 基因组DNA的提取

使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取菌株DNA。

1.3.3.2 重复基因外回文序列-聚合酶链式反应 (repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, rep-PCR) 指纹图谱去重

表1 PCR扩增体系和程序
Table 1 PCR amplification system and program

BOXA1R引物		双歧杆菌属引物	
体系	程序	体系	程序
Mixture 12.5 μL	95 °C 预变性7 min	Mixture 12.5 μL	95 °C 预变性5 min
DNA 3 μL	94 °C 变性1 min	DNA 1 μL	94 °C 变性30 s
ddH ₂ O 8 μL	52 °C 退火1 min	ddH ₂ O 10 μL	62 °C 退火40 s
BOXPrimer 1.5 μL	65 °C 延伸8 min	Bifid-R 0.5 μL	72 °C 延伸1 min
	65 °C 延伸16 min	Bifid-F 0.5 μL	72 °C 延伸10 min

使用引物 BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGGCGACGCTGACG-3') 对提取的菌株DNA进行PCR扩增。rep-PCR扩增体系和条件如表1所示，35个循环，扩增产物用1.2 g/100 mL的琼脂糖凝胶电泳检验，电泳结束后，在紫外凝胶成像仪中观察电泳结果并拍照，用软件Gel Compar II对DNA图谱进行聚类分析。DNA带型完全一致的菌株通常被认为属于同一物种，可据此将分离所得菌株归为若干种系型，并从每组中选取至少1株代表菌株进一步测序分析。

1.3.3.3 16S rDNA片段扩增与检测

为确保准确性，使用双歧杆菌属引物 (Bifid-R: 5'-GGTGTCTCCCGATATCTACA-3'; Bifid-F: 5'-CTCCTGGAAACGGGTGG-3') 对去重后的菌株DNA进一步扩增，体系和程序如表1所示，35个循环，选择单一且明亮的条带用细菌的通用引物27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') 和1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 进行16S rDNA基因片段扩增。扩增体系和程序参考Prasanna等^[19]的方法进行。扩增产物送至上海生工生物科技有限公司测序。序列在NCBI核酸数据库中进行BLAST在线分析，搜索与其相似性最高的序列，利用MEGA 5.0.5构建发育树，确定待测菌株的种属。

1.3.4 产EPS双歧杆菌的筛选

1.3.4.1 产糖菌株初筛

菌株活化后，吸取100 μL菌液涂布于MRS平板，另取200 μL接种至100 mL脱脂乳培养基中，37 °C厌氧培养32~48 h。观察平板上单菌落生长情况以及在脱脂乳培养基中的黏稠拉丝情况，并作记录。

1.3.4.2 产糖菌株复筛

将初筛中明显黏稠拉丝的菌株按2% (V/V) 的接种量接种于MRS液体培养基中，37 °C厌氧培养36 h制得发酵液。发酵液4 °C、8 000 r/min离心20 min去除菌体，将上清液用旋转蒸发仪浓缩为原体积的1/3，并加入3倍体积预冷无水乙醇4 °C沉淀过夜，取沉淀用超纯水溶解，使

用质量分数为6%的TCA溶液去除蛋白，8 000 r/min离心20 min后将上清液置于4 °C超纯水中透析48 h，每8 h换一次水。

1.3.4.3 EPS含量的测定

采用苯酚-硫酸法测定EPS含量，参照文献[20]配制不同质量浓度的标准葡萄糖溶液，然后测定波长490 nm处的吸光度。以葡萄糖质量浓度为横坐标，吸光度为纵坐标绘制标准曲线。根据标准曲线回归方程y=0.005x-0.011 9, R²=0.996 6，计算菌株EPS的含量。

1.3.5 菌株EPS体外抗氧化活性测定

1.3.5.1 EPS的提取

参考1.3.4.2节方法提取粗多糖，冷冻干燥得到粗多糖样品^[21]，调整糖液质量浓度为0.6 mg/mL备用。

1.3.5.2 过氧化氢自由基清除能力测定

参考文献[22]，稍作修改。向0.6 mL浓度为40 mmol/L H₂O₂溶液中加入2.4 mL磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4)，摇匀，加入1 mL样品，振荡混匀，室温反应10 min，测定体系230 nm波长处的吸光度，3个平行实验。根据式(1)计算样品的过氧化氢自由基清除能力：

$$\text{清除率} / \% = \frac{1 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中：A₀为未加样品的吸光度，即以水代替样品；A₁为样品溶液与自由基反应后的吸光度；A₂为样品溶液的吸光度，即以水代替自由基溶液，排除样品本身吸光度对结果的影响。

1.3.5.3 超氧阴离子自由基清除能力测定

参考文献[23]，稍作修改。将3 mL 50 mmol/L pH 8.2的Tris-HCl缓冲液与1 mL样品充分混匀，25 °C保温30 min，加入0.3 mL 30 mmol/L邻苯三酚溶液，摇匀，25 °C反应5 min。最后向反应体系中加入1 mL浓盐酸以终止反应。紫外分光光度计以Tris-HCl缓冲液调零，测定反应体系325 nm波长处吸光度。3次平行实验。根据式(1)计算样品的超氧阴离子自由基清除率。

1.3.5.4 羟自由基清除能力测定

参考文献[24]，稍作修改。取1 mL样品，加入1 mL 9 mmol/L的FeSO₄溶液、1 mL 9 mol/L的水杨酸-乙醇溶液，振荡混匀，立即加入1 mL 9 mmol/L的H₂O₂溶液以开始发生反应，摇匀，37 °C反应40 min，测定反应体系510 nm波长处吸光度，3次平行实验。按式(1)计算样品的羟自由基清除率。

1.3.5.5 DPPH自由基清除能力测定

参考文献[25]，稍作修改。吸取2 mL样品，加入2 mL 0.2 mmol/L DPPH-乙醇溶液，摇匀，暗反应40 min，测定混合液517 nm波长处的吸光度，3次平行实验。根据式(1)计算样品的DPPH自由基清除率。

1.3.6 产糖菌株模拟胃肠液耐受性

1.3.6.1 模拟胃液中的存活情况

人工模拟胃液：参考Liao Ning等^[26]的方法稍作修改，在每升MRS肉汤里添加3 g胃蛋白酶。将菌株以2%（V/V）的接种量接入MRS培养基，37℃厌氧培养28 h后，4 000 r/min离心10 min收集菌体沉淀，用磷酸盐缓冲液洗涤菌体沉淀2次后重悬于生理盐水中，混匀制得菌悬液。采用稀释涂布平板法计算此时的菌液浓度（CFU/mL）。用浓度为12 mol/L HCl溶液调节模拟胃液pH值至2.0、2.5、3.0、3.5、4.0，灭菌冷却后，将1 mL菌悬液分别接入9 mL模拟胃液中，37℃厌氧培养3 h。记录不同条件下的活菌数（CFU/mL）。每组3个平行实验。以0 h菌落总数为对照，根据式（2）计算菌株存活率：

$$\text{存活率}/\% = \frac{\text{各条件下活菌数}}{0\text{ h活菌数}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.6.2 模拟肠液中的存活情况

人工模拟肠液^[26]：在每升MRS肉汤里添加1 g胰蛋白酶和3 g牛胆盐，0.1 mol/L NaOH溶液调节pH 2.5。参照1.3.6.1节方法，制备菌悬液。将1 mL菌悬液接入9 mL模拟肠液中，37℃厌氧培养3 h。记录各菌株的活菌数（CFU/mL）。每组3个平行实验。以0 h菌落总数为对照，根据式（2）计算菌株存活率。

1.3.7 产糖菌株自凝聚测定

将菌株发酵液4 000 r/min离心20 min，用无菌生理盐水洗涤2次后用磷酸盐缓冲液调节菌悬液浓度为10⁷ CFU/mL。取5 mL菌悬液于10 mL试管中旋涡振荡10 s，在室温条件下静置5 h，每隔1 h取出菌悬液置于600 nm波长处测其吸光度^[27]。每组3个平行实验。菌株自凝聚率按照式（3）计算：

$$\text{自凝聚率}/\% = (1 - \frac{A_t}{A_0}) \times 100 \quad (3)$$

式中： A_t 为时间t为1、2、3、4 h和5 h的吸光度； A_0 为0 h吸光度。

1.3.8 产糖菌株表面疏水性测定

将菌株发酵液4 000 r/min离心20 min后，用无菌生理盐水洗涤2次重悬于0.1 mol/L KNO₃（pH 6.2）溶液中，调节菌悬液浓度为10⁷ CFU/mL，600 nm波长处测定样品吸光度 A_0 。分别吸取1 mL二甲苯、乙酸乙酯、氯仿溶剂加到3 mL菌液中混匀，室温静置10 min后涡旋振荡两相体系2 min，室温下放置20 min后取水相，测定其在600 nm波长处的吸光度（ A_1 ）^[28]。疏水性用细菌对溶剂的黏附百分比表示，计算如式（4）所示：

$$\text{黏附百分比}/\% = (1 - \frac{A_1}{A_0}) \times 100 \quad (4)$$

1.4 数据分析与处理

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计学分析；所有实

验重复3次，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，显著性分析采用Duncan检验。采用Gel Compar II凝胶分析软件进行指纹图谱聚类分析，并使用Origin 9.0.6进行相关图表绘制。

2 结果与分析

2.1 双歧杆菌的鉴定结果

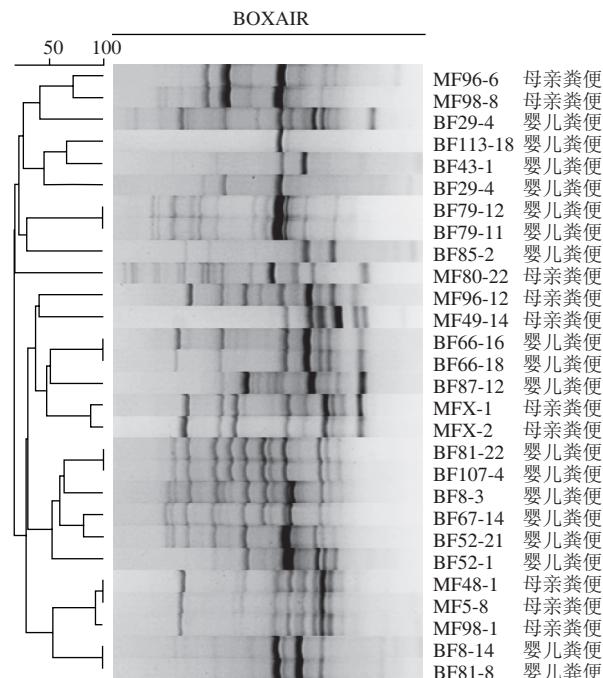


图1 BOXA1R扩增菌株的rep-PCR基因指纹图谱
Fig. 1 Rep-PCR gene fingerprints of strains amplified with BOXA1R

将分离得到的73株疑似双歧杆菌经rep-PCR（图1）去重后，挑选20株代表菌株测序，序列在NCBI数据库进行BLAST在线分析，结果有17株属*Bifidobacterium*，3株属*Propionibacterium*。将17株双歧杆菌的部分16S rRNA基因序列测序结果在NCBI数据库进行BLAST在线分析，并选取同源性最高的序列构建系统发育树，见图2。可以看出17株双歧杆菌分属于5个种，2个亚种，菌株BF81-22、BF67-14和BF8-3属于假长双歧杆菌（*B. pseudolongum*），菌株BF79-11和MF85-2属于动物双歧杆菌乳亚种（*B. animal subsp. lactis*），菌株BF66-16属于长双歧杆菌婴儿亚种（*B. longum subsp. infantis*），菌株MFX-1属于长双歧杆菌（*B. longum*），菌株MF29-4、BF113-1和BF43-1属于短双歧杆菌（*B. breve*），菌株MF98-1、BF88-5、MF80-22和MF96-12属于假小链双歧杆菌（*B. pseudocatenulatum*），菌株MF49-14、BF52-1和BF87-12属于两歧双歧杆菌（*B. bifidum*）。

BLAST比对的亲缘标准菌株和样品来源如表2所示，与之前相同序列比较，共得到52株肠道来源的双歧杆菌，14株*B. pseudocatenulatum*，8株*B. pseudolongum*，

9株*B. bifidum*, 7株*B. breve*, 5株*B. longum* subsp. *infantis*, 6株*B. animalis* subsp. *lactis*和3株*B. longum*。

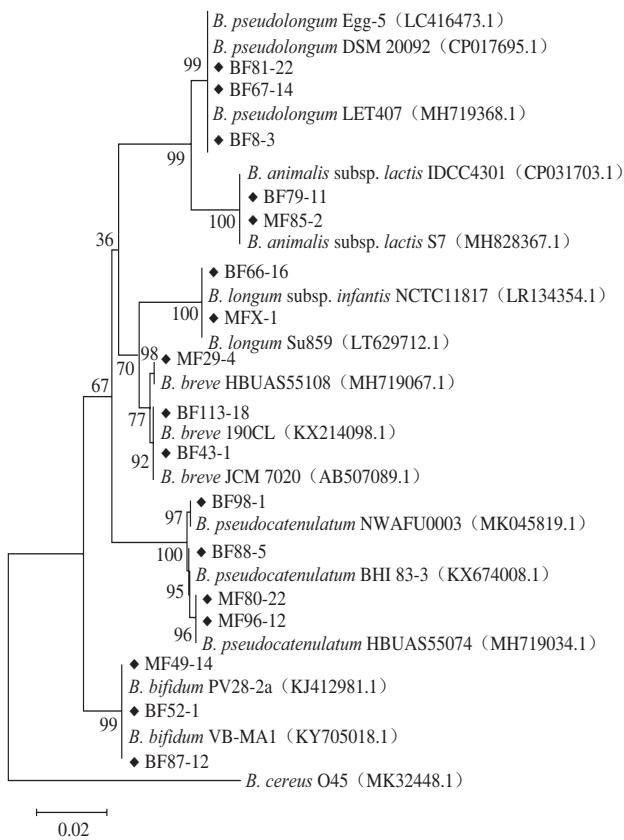


图2 菌株16S rRNA基因序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strains based on 16S rRNA gene sequences

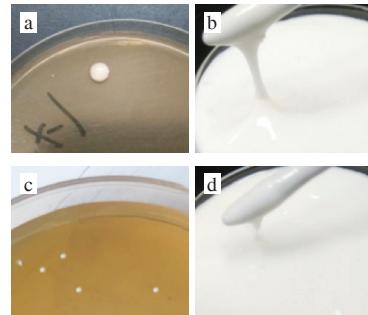
表2 NCBI BLAST比对结果
Table 2 Results of alignment based on NCBI BLAST

代表菌株	样品编号	相同带型数	BLAST最匹配种	相似度/%	样品来源
BF67-14	f67	8	<i>B. pseudolongum</i> (MH719368.1)	100	婴儿粪便
BF79-11	f79	2	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (CP031703.1)	100	婴儿粪便
MF85-2	F85	4	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (MH828367.1)	99	母亲粪便
BF66-16	f66	5	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> (LR134354.1)	100	婴儿粪便
MFX-1	F48	3	<i>B. longum</i> (LT629712.1)	99	母亲粪便
BF113-1	f113	2	<i>B. breve</i> (KX214098.1)	99	婴儿粪便
MF29-4	F29	5	<i>B. breve</i> (MH719067.1)	99	母亲粪便
MF98-1	F98	4	<i>B. pseudocatenulatum</i> (MK045819.1)	100	母亲粪便
BF88-5	f88	4	<i>B. pseudocatenulatum</i> (KX674008.1)	99	婴儿粪便
MF80-22	F80	6	<i>B. pseudocatenulatum</i> (MH719034.1)	99	母亲粪便
BF52-1	f52	2	<i>B. bifidum</i> (KY705018.1)	100	婴儿粪便
BF87-12	f87	7	<i>B. bifidum</i> (KJ412981.1)	100	婴儿粪便

2.2 产EPS的双歧杆菌筛选

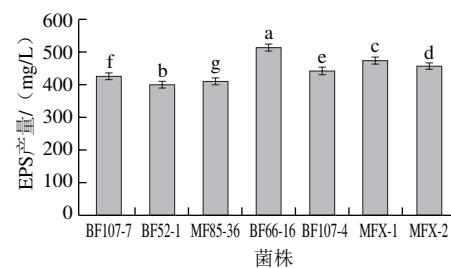
52株双歧杆菌经过初筛，发现有11株双歧杆菌(*B. longum* MFX-1、MFX-2和MFX-3, *B. longum* subsp. *infantis* BF66-16、BF85-15、BF85-36和BF107-4, *B. bifidum* BF107-7、BF52-1, *B. breve* MF29-2、MF29-26)在MRS平板和脱脂乳培养基中有产黏拉丝的

情况，图3为产糖与不产糖的菌株表型对比。通过苯酚-硫酸法对11株双歧杆菌进行了复筛，实验结果显示有7株双歧杆菌的EPS含量较高(图4)，可以看出，所测7株菌EPS产量均达到400 mg/L以上，尤其是来源于婴儿粪便的*B. longum* subsp. *infantis* BF66-16 EPS产量高达513.06 mg/L，具备工业生产的可能。



a.产糖菌株菌落; b.产糖菌株发酵制得酸乳;
c.不产糖菌株菌落; d.不产糖菌株发酵制得酸乳。

图3 产糖与不产糖的菌株表型对比图
Fig. 3 Phenotypic comparison between EPS-producing and non-EPS-producing strains



字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

图4 菌株EPS产量

Fig. 4 EPS yields of selected strains

2.3 双歧杆菌粗多糖的体外抗氧化分析

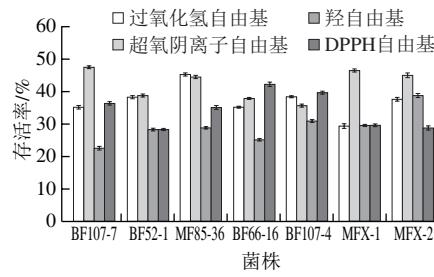


图5 菌株抗氧化活性

Fig. 5 Antioxidant activities of selected strains

过氧化氢自由基、超氧阴离子自由基和羟自由基都属于人体内细胞衰老的诱导因子，它们能够通过细胞膜，与大量生物活性分子发生反应，缓慢地氧化机体，对机体造成氧化损伤^[29]。如图5所示，几株双歧杆菌EPS对过氧化氢自由基、超氧阴离子自由基、羟自由

基和DPPH自由基均有一定的清除能力, EPS质量浓度为0.6 mg/mL, 7株双歧杆菌EPS对4种自由基的清除率都超过了20%, 表明7株双歧杆菌所产的EPS均具有一定的抗氧化活性, 有作为这些自由基清除产品的可能。

2.4 产EPS双歧杆菌的耐受性

人体胃液的pH值通常在3.0左右, 受饮食及其他因素影响, 胃液pH值也会在1.5~4.0之间浮动, 胃液的强酸性及胃蛋白酶会严重阻碍双歧杆菌的转运, 因此双歧杆菌需要具备耐受胃液低pH值及胃蛋白酶的能力才能进入小肠发挥作用^[30]。7株菌胃肠耐受实验结果见图6, 菌株在pH值为2.0时基本无法存活。在pH值大于2.5时, 7株菌均表现出了一定的耐酸性, 尤其菌株BF66-16在pH值为4.0时, 存活率超过了80%, 耐受胃液能力较强, 具备益生菌潜质。

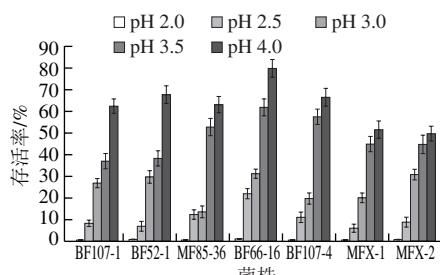


图6 菌株耐受胃液能力

Fig. 6 Abilities of selected strains to tolerate gastric juice

人体小肠是可食用益生菌发挥功效的场所, 小肠中过高的胆盐含量限制了益生菌的使用^[31], 能够在人体肠液中存活一定数量的菌株才可以发挥益生作用。模拟肠液结果见图7, 7株菌在模拟肠液中培养3 h后均能达到40%以上的存活率, 其中BF66-16相比较于其他菌株存活率明显较高, 达到了61.05%, 表明菌株对酸性条件和胆汁盐环境具有很强的抵抗力, 这可能与其高产EPS有关。在Yang Xin等^[32]的研究中, 转录组和生理学分析显示EPS的产生使*B. breve* BB8的酸适应性得到改善。*B. animalis* subsp. *lactis*在0.3%牛胆盐存在的条件下诱导eps基因表达, 且随着胆汁盐添加百分比的增加, EPS的合成量按比例增加^[33]。因此双歧杆菌合成这些聚合物可以作为保护机制, 以应对其肠道中遇到的恶劣条件。

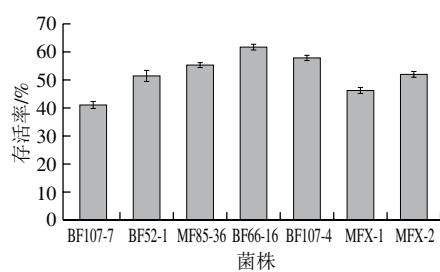


图7 菌株耐受肠液能力

Fig. 7 Abilities of selected strains to tolerate intestinal juice

2.5 产EPS双歧杆菌的自凝聚能力

益生菌黏附于肠上皮细胞的能力在胃肠道定植中发挥着重要作用, 可以防止菌株因蠕动而减少, 从而在生态系统中提供竞争优势^[34]。已有研究证明, 体外测量细菌的自凝聚和表面疏水性可用于初步筛选适合商业应用的潜在黏附细菌^[30]。自凝聚是同一种菌株间相互凝集形成多细胞簇的现象, 益生菌通过自凝聚作用相互凝集到一定的数量时黏附才牢固, 进而达到菌株发挥益生功效所需要的数量。7株产EPS的双歧杆菌的自凝聚能力结果见表3, 菌株悬液的自凝聚率随着静止时间的延长而逐渐增大, 且不同的菌株间自凝聚率具有明显的差异, 其中菌株BF66-16与其他菌株相比表现出较好的自凝聚能力, 5 h后菌株BF66-16的自凝聚率达到95.59%, 有较强的自凝聚性。

表3 产EPS菌株的自凝聚结果
Table 3 Auto-aggregation ability of EPS-producing strains

菌株	自凝聚率/%				
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
BF107-7	66.85±0.27	76.75±0.29	82.48±0.22	84.76±0.19	86.02±0.17
BF52-1	4.90±0.04	12.78±0.90	27.47±0.72	27.57±0.75	27.76±0.75
MF85-36	4.01±0.09	4.28±0.05	11.29±0.97	21.68±0.86	24.86±0.82
BF66-16	78.72±0.39	82.20±0.74	92.23±0.10	93.50±0.08	95.59±0.05
BF107-4	8.21±0.08	8.68±0.97	13.36±0.90	16.89±0.87	15.46±0.88
MFX-1	9.61±0.46	13.79±0.50	20.69±0.32	25.62±0.30	24.14±0.30
MFX-2	7.93±0.52	7.39±0.14	13.15±0.48	18.74±0.45	42.34±0.34

2.6 产EPS双歧杆菌的疏水性

表4 产EPS菌株的疏水性结果
Table 4 Hydrophobicity of EPS-producing strains

菌株	疏水性/%		
	氯仿	二甲苯	乙酸乙酯
BF107-7	72.53±0.32	9.37±0.68	4.27±0.21
BF52-1	85.64±0.25	10.42±0.27	3.71±0.23
MF85-36	40.27±0.59	43.95±0.21	5.27±0.56
BF66-16	94.26±0.36	58.19±0.53	8.05±0.42
BF107-4	34.32±0.21	45.63±0.23	6.10±0.15
MFX-1	70.11±0.04	54.18±0.25	9.94±0.36
MFX-2	44.21±0.52	48.41±0.03	7.64±0.29

疏水性较高的菌株, 会对小肠组织产生较高的黏附能力^[35]。由表4可以看出, 所有菌株均表现出一定的疏水性, 不同菌株的疏水性差异较大, 二甲苯是一种非极性溶剂, 除菌株BF107-7和BF52-1外, 其余5株菌均表现出对二甲苯较高的疏水性(>40%), 说明这些菌株都具有疏水的细胞表面。氯仿是酸性溶剂, 属于电子受体, 而乙酸乙酯是单碱性溶剂, 属于电子供体。7株双歧杆菌对氯仿的疏水性都明显的高于对乙酸乙酯的疏水性, 尤其是菌株BF52-1和BF66-16对氯仿的疏水性均大于85%, 说明这两株双歧杆菌都是电子供体。因此本研究通过自凝聚和疏水性筛选出的菌株BF66-16初步判断其能够黏附

在胃肠道中，且BF66-16在模拟胃肠液中的存活能力较强，说明菌株可以在胃肠液环境中以较高的数量存活下来，发挥其抗氧化活性。

3 结 论

本研究从新疆维吾尔族肠道中分离出52株双歧杆菌，分属于*B. pseudocatenulatum*、*B. bifidum*、*B. breve*、*B. pseudolongum*、*B. longum*五个种以及*B. longum* subsp. *infantis*、*B. animal* subsp. *lactis*两个亚种。对菌株产EPS的能力进行初筛和复筛后，共得到7株EPS产量较高的双歧杆菌，质量浓度均在400 mg/L以上，且所产的EPS具有一定的抗氧化活性，对人体健康有益。模拟胃肠液耐受性和体外黏附性实验结果表明，菌株BF66-16耐受胃肠液能力相比于其他几株双歧杆菌较强，在pH 2.0的胃液环境下，存活率仍可达3.39%，在pH 4.0时存活率为81.13%，模拟肠液中存活率达到了61.05%；同时BF66-16对氯仿和二甲苯的黏附百分比超过60%，5 h后的自凝聚率为95.59%，证明菌株能够以较高的活菌量黏附于胃肠道中，以发挥其抗氧化活性。由此可见，来源于婴儿粪便的BF66-16可以作为潜在抗氧化菌株，为后续开发适合少数民族消费的益生型产品提供新的研究思路和菌株资源。

参考文献：

- [1] MILANI C, DURANTI S, BOTTACINI F, et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2017, 81(4): e00036-17. DOI:10.1128/MMBR.00036-17.
- [2] BAOTHMAN O A, ZAMZAMI M A, TAHER I, et al. The role of gut microbiota in the development of obesity and diabetes[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2016, 15(1): 108-115. DOI:10.1186/s12944-016-0278-4.
- [3] RELMAN D A. The human microbiome: ecosystem resilience and healthy[J]. *Nutrition Reviews*, 2012, 70(Suppl 1): S2-S9. DOI:10.1111/j.1753-4887.2012.00489.
- [4] GUARNER F. The intestinal microbiota and inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2011, 34(3): 147-154. DOI:10.1016/j.gastrohep.2010.11.009.
- [5] LUGLI G A, MILANI C, TURRONI F, et al. Investigation of the evolutionary development of the genus *Bifidobacterium* by comparative genomics[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(20): 6383-6394. DOI:10.1128/aem.02004-14.
- [6] MAK A, SARKER M, LI T, et al. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview[J]. *Biomed Research International*, 2018, 2018(2): 1-8. DOI:10.1155/2018/9478630.
- [7] LEI L, YUXUAN Q, YANG W, et al. Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* RH, a probiotic bacterium producing exopolysaccharides[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 189: 86-87. DOI:10.1016/j.jbiotec.2014.08.041.
- [8] SALAZAR N, GUEIMONDE M, HERNANDEZ-BARRANCO A M, et al. Exopolysaccharides produced by intestinal *Bifidobacterium* strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4737-4745. DOI:10.1128/AEM.00325-08.
- [9] LINARES D M, FITZGERALD G, HILL C, et al. Production of vitamins, exopolysaccharides and bacteriocins by probiotic bacteria[M]//Probiotic dairy products, 2nd edition. John Wiley & Sons, Ltd., 2017: 167-194. DOI:10.1002/9780470995785.ch8.
- [10] LEIVERS S, HIDALGO-CANTABRANA C, ROBINSON G, et al. Structure of the high molecular weight exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA-R1 and sequence analysis of its putative eps cluster[J]. *Carbohydrate Research*, 2011, 346(17): 2710-2717. DOI:10.1016/j.carres.2011.09.010.
- [11] ALP G, ASLIM B. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk[J]. *Anaerobe*, 2010, 16(2): 101-105. DOI:10.1016/j.anaerobe.2009.06.006.
- [12] SALAZAR N, BINETTI A, GUEIMONDE M, et al. Safety and intestinal microbiota modulation by the exopolysaccharide-producing strains *Bifidobacterium animalis* IPLA R1 and *Bifidobacterium longum* IPLA E44 orally administered to Wistar rats[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 144(3): 342-351. DOI:10.1016/j.carres.2011.09.010.
- [13] HILAL Y, NEVA K. Microbial exopolysaccharides: resources and bioactive properties[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 72: 41-46. DOI:10.1016/j.procbio.2018.06.009.
- [14] LI S J, HUANG R, SHAH N P, et al. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315[J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(12): 7334-7343. DOI:10.3168/jds.2014-7912.
- [15] XU R, SHANG N, LI P. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH[J]. *Anaerobe*, 2011, 17(5): 226-231. DOI:10.1016/j.anaerobe.2011.07.010.
- [16] 杨同香, 仲玉备, 吴孔阳. 高产胞外多糖乳酸菌的筛选及其在发酵乳中的应用[J]. 食品科技, 2016, 41(2): 31-35.
- [17] 霍冬雪, 张家超, 白娜, 等. 适用于分离人肠道中双歧杆菌的选择性培养基[J]. 微生物学报, 2014, 54(4): 433-441. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.2014.04.010.
- [18] RUAS-MADIEDO P, SÁNCHEZ B. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(3): 837-856. DOI:10.3168/jds.s0022-0302(05)72750-8.
- [19] PRASANNA P H P, GRANDISON A S, CHARALAMPOPOULOS D. Screening human intestinal *Bifidobacterium* strains for growth, acidification, EPS production and viscosity potential in low-fat milk[J]. *International Dairy Journal*, 2012, 23(1): 36-44. DOI:10.1016/j.idairyj.2011.09.008.
- [20] MASUKO T, MINAMI A, IWASAKI N, et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 339(1): 69-72. DOI:10.1016/j.ab.2004.12.001.
- [21] PATRICIA R M, MIGUEL G, ABELARDO M, et al. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus[J]. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(8): 2011-2015. DOI:10.4315/0362-028x-69.8.2011.
- [22] 王晓宇, 杜国荣, 李华. 抗氧化能力的体外测定方法研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(3): 247-252. DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2012.03.004.

- [23] LIN M Y, CHANG F J. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356[J]. *Digestive Diseases & Sciences*, 2000, 45(8): 1617-1622. DOI:10.1023/A:1005577330695.
- [24] LI S, ZHAO Y, ZHANG L, et al. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 605-621. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.06.048.
- [25] ZHANG L, LIU C, LI D, et al. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 54: 270-275. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2012.12.037.
- [26] LIAO N, LUO B L, GAO J, et al. Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract[J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40: 1-10. DOI:10.1007/s10529-018-02634-6.
- [27] ROKANA N, SINGH B P, THAKUR N, et al. Screening of cell surface properties of potential probiotic lactobacilli isolated from human milk[J]. *Journal of Dairy Research*, 2018, 85(3): 1-8. DOI:10.1017/S0022029918000432.
- [28] CASTAGLIUOLO I, GALEAZZI F, FERRARI S, et al. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2005, 43(2): 197-204. DOI:10.1016/j.femsim.2004.08.011.
- [29] ZHANG J, ZHAO X, JIANG Y, et al. Antioxidant status and gut microbiota change in an aging mouse model as influenced by exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibetan kefir[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(8): 89-104. DOI:10.3168/jds.2016-12480.
- [30] DEL R B, SGORBATI B, MIGLIOLI M, et al. Adhesion, auto-aggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 31(6): 438-442. DOI:10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x.
- [31] KOS B, ŠUŠKOVIĆ J, VUKOVIĆ S, et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94(6): 981-987. DOI:10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x.
- [32] YANG X, HANG X, TAN J, et al. Differences in acid tolerance between *Bifidobacterium breve* BB8 and its acid-resistant derivative *B. breve* BB8d pH, revealed by RNA-sequencing and physiological analysis[J]. *Anaerobe*, 2015, 33: 76-84. DOI:10.1016/j.anaerobe.2015.02.005.
- [33] RUAS-MADIEDO P, GUEIMONDE M, ARIGONI F, et al. Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2009, 75(4): 1204-1207. DOI:10.1128/AEM.00908-08.
- [34] CROCIANI J, GRILL J P, HUPPERT M, et al. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 21(3): 146-148. DOI:10.1111/j.1472-765X.1995.tb01027.x.
- [35] HAN Q, KONG B, CHEN Q, et al. *In vitro*, comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 32: 391-400. DOI:10.1016/j.jff.2017.03.020.