

婴儿肠道源长双歧杆菌B2-01的益生特性及其高密度培养

彭芸燕, 钟舒莹, 刘冬梅, 许喜林*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510641)

摘要: 以广州市3月龄健康婴儿粪便中分离出的乳酸杆菌为研究对象, 经分子生物学鉴定确认为长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*), 命名为B2-01。对B2-01进行包括体外抗氧化活性和肝损伤保护活性在内的益生特性和高密度培养研究, 结果表明: B2-01具有较强的1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基、2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)阳离子自由基清除能力和抗脂质过氧化能力; 在最高作用水平(DMEM完全培养基中发酵上清液体积分数10%)下, 过氧化氢损伤和乙醇损伤L02细胞存活率可分别提高至89.10%和91.38%, 同时能显著降低肝细胞中转氨酶的活力; 高密度培养研究优化后的最佳培养条件确定为酵母浸提粉添加量3.45%、葡萄糖2.48%、乳糖2.79%、细菌学蛋白胨3.00%、低聚半乳糖2.50%。在此优化条件下, 发酵液的活菌数最高可达 4.20×10^9 CFU/mL, 比优化前(7.71×10^8 CFU/mL)提高5.45倍。

关键词: 长双歧杆菌; 婴儿肠道; 抗氧化活性; 酒精肝保护; 高密度培养

Prebiotic Properties and High-Density Culture of *Bifidobacterium longum* B2-01, a Strain Isolated from the Intestinal Tract of Infants

PENG Yunyan, ZHONG Shuying, LIU Dongmei, XU Xilin*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: In this study, a *Lactobacillus* strain was isolated from the feces of healthy 3-month-old infants in Guangzhou, identified and named as *Bifidobacterium longum* B2-01 by molecular biology, and its probiotic properties, such as *in vitro* antioxidant activity and hepatoprotective activity, and high-density culture were investigated. The results showed that B2-01 had a strong ability to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl, superoxide anion, and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) cation radicals and to resist lipid peroxidation. At the highest concentration of 10% (V/V) in the fermentation supernatant of DMEM medium, strain B2-01 increased the survival rates of L02 cells against hydrogen peroxide damage and alcohol damage to 89.10% and 91.38%, respectively, while significantly reducing the transaminase activity in hepatocytes. The optimal conditions for high-density culture were determined as follows: yeast extract concentration 3.45%, glucose concentration 2.48%, lactose concentration 2.79%, bacteriological peptone concentration 3%, and oligogalactose concentration 2.5%. Under these conditions, the maximum viable bacterial count of 4.20×10^9 CFU/mL was observed in the fermentation broth, which was 6.45 times as high as that before optimization (7.71×10^8 CFU/mL).

Keywords: *Bifidobacterium longum*; infant intestine; antioxidant activity; protection against alcoholic liver; high-density culture
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230728-306

中图分类号: Q93

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2025)01-0028-12

引文格式:

彭芸燕, 钟舒莹, 刘冬梅, 等. 婴儿肠道源长双歧杆菌B2-01的益生特性及其高密度培养[J]. 食品科学, 2025, 46(1): 28-39. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230728-306. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-07-28

基金项目: 广州市科技计划资助项目(201903010015);

广东省乡村振兴战略专项资金种业振兴项目(2022-440000-4301030402-9565); 国家自然科学基金面上项目(31771908)

第一作者简介: 彭芸燕(1999—)(ORCID: 0000-0002-0676-8999), 女, 硕士研究生, 研究方向为益生菌资源化挖掘及其利用。

E-mail: 386812136@qq.com

*通信作者简介: 许喜林(1964—)(ORCID: 0000-0002-7435-056X), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品中微生物的利用和控制。E-mail: xuxilin@scut.edu.cn

PENG Yunyan, ZHONG Shuying, LIU Dongmei, et al. Prebiotic properties and high-density culture of *Bifidobacterium longum* B2-01, a strain isolated from the intestinal tract of infants[J]. Food Science, 2025, 46(1): 28-39. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230728-306. <http://www.spkx.net.cn>

益生菌是活的微生物,当摄入充足数量的益生菌时,会对宿主产生健康益处^[1]。益生菌与健康逐渐成为研究热点,益生菌的研究日益深入,益生菌产业正蓬勃发展,益生菌产品的种类也越来越多。由于我国的益生菌产业起步较晚,我国本土来源、自主研发的益生菌菌株仍然较少,市场较为知名的商业菌株,如动物双歧杆菌Bb-12、长双歧杆菌BB536、鼠李糖乳杆菌GG等均来自国外。当前,我国的益生菌原料主要依赖国外进口,如美国杜邦、丹麦科汉森等^[2]。因此,自主研发我国本土来源的益生菌菌株在我国益生菌产业进一步发展的过程中具有重要意义。

肝脏作为人体重要的代谢器官,其受到脂肪性、酒精性、免疫性、药物性等内源或外源性损伤容易影响机体健康^[3]。酒精性肝损伤是世界范围内死亡率和发病率较高的一大疾病,通常与过量摄入乙醇导致的肝细胞损伤有关,其内在机制主要与乙醛和活性氧(reactive oxygen species, ROS)等乙醇代谢产物有关,乙醛和ROS能降低生物能量、损伤线粒体、诱导氧化应激、降低体内超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶的活力,加剧肝细胞损伤^[4],因此,具有抗氧化活性的益生菌具备潜在的减缓酒精性肝损伤的能力。

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是人和动物体内重要的益生菌,主要分布在成人肠道、婴儿肠道和动物肠道等区域^[5]。寄宿于人类的双歧杆菌为亲和人体双歧杆菌(human-residential bifidobacteria, HRB),而寄宿于动物或其他环境的为非HRB^[6]。相比于非HRB,HRB在人类肠道中更具有适应优势,HRB菌株将会是更理想的人类益生菌,对宿主会有更多的功效和更高的安全性^[7]。双歧杆菌在人体肠道内定植数量、相对丰度与年龄和健康状态有关。随着年龄的增长,肠道中双歧杆菌的相对丰度逐渐降低^[8],婴儿肠道菌群中双歧杆菌属丰度最高。因此,本研究从广州市3月龄的健康婴儿粪便中分离筛选出一株长双歧杆菌B2-01,经前期较为系统的安全性评价,证明该菌株安全无毒^[9],在此进一步对其包括体外抗氧化活性和肝损伤保护活性在内的益生特性进行研究。同时,由于益生菌在肠道定植,发挥益生功能,根据世界卫生组织的规定,需要益生菌的活菌数达到 10^6 CFU/g以上^[10],因此本研究还对长双歧杆菌B2-01的高密度培养进行研究,旨在为长双歧杆菌B2-01作为具有高应用价值的益生菌提供数据支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

长双歧杆菌B2-01由华南理工大学食品质量与安全实验室从广州3月龄婴儿粪便中筛选得到,并于2021年9月1日保存于广东微生物菌种保藏中心,保存的菌株编号为GDMCC No. 61911。长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697,购于广东省微生物菌种保藏中心。

细菌DNA提取试剂盒 生工生物工程(上海)股份有限公司;MRS肉汤培养基、革兰氏染色试剂盒 广东环凯微生物科技有限公司;BL琼脂培养基、莫匹罗星锂盐 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;过氧化氢酶 上海源叶生物科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 上海华蓝化学科技有限公司;2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)、水杨酸 上海阿拉丁生化科技有限公司;三氯乙酸 天津风船化学试剂科技有限公司;2-硫代巴比妥酸(2-thiobarbituric acid, TBA) 国药集团化学试剂有限公司;Tris-HCl、噻唑蓝(thiazolyl blue, MTT) 北京索莱宝科技有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 天津致远化学试剂有限公司;DMEM培养基 美国Gibco公司;天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)检测试剂盒 南京建成生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

TProfessional型聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪 德国Biomtra公司;752N型紫外分光光度计 上海精科仪器有限公司;Infinite Pro 2000型酶标仪 美国Bio-Tek公司;H1750R型高速台式冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;BPN-CH型CO₂恒温细胞培养箱 青岛海尔生物医疗股份有限公司;SW-CJ-1FD型超净工作台 苏州净化设备有限公司;LHS-80型恒温恒湿培养箱 上海一恒科学仪器有限公司;MHY-28473型麦氏浊度计 北京美华科技有限公司;Five Easy Plus型pH计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株的分离筛选及菌种鉴定

1.3.1.1 菌株分离筛选及形态学观察

从广州市母乳喂养的健康3月龄婴儿粪便样品中分离筛选菌株,用无菌生理盐水梯度稀释粪便样品,吸取

样品溶液均匀涂布于选择性培养基（每100 mL BL琼脂培养基添加5 mg莫匹罗星锂盐），厌氧培养48 h，挑取菌落进行分离纯化，分离得到的菌株命名编号。对命名为B2-01的菌株菌落形态进行观察，并从平板上挑取纯菌落进行革兰氏染色，镜检观察菌体形态。

1.3.1.2 基于16S rDNA测序的菌种鉴定

根据刘冬梅等^[11]的方法提取菌株DNA，将菌株发酵液离心（8 000 r/min、5 min）取菌体，用无菌生理盐水洗涤并重悬至麦氏浊度为1.5，用细菌DNA提取试剂盒提取菌株的DNA，检测DNA纯度，若OD_{260 nm}/OD_{280 nm}为1.8，则以该DNA为模板。用细菌16S rDNA引物27F（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）和1492R（5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'）进行PCR扩增，扩增条件为：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，58 ℃退火30 s，72 ℃延伸90 s，28个循环；72 ℃延伸5 min^[12]。将PCR扩增片段送至广州艾基生物公司进行16S rDNA测序。用NCBI数据库对B2-01菌株的16S DNA序列进行BLAST比对分析，并利用MEGA 6.0软件和生物进化距离（邻接法）构建系统发育树，确定菌株种属。

1.3.1.3 生理生化鉴定

参照冯丽莉等^[13]的生理生化鉴定方法，对B2-01菌株进行部分碳源利用和过氧化氢酶等试验。

1.3.2 体外抗氧化活性测定

1.3.2.1 待测样品制备

以长双歧杆菌ATCC 15697为对照菌株，用无菌生理盐水将菌株发酵液的浓度分别调整至 5×10^8 、 5×10^7 、 5×10^6 CFU/mL，离心（8 000 r/min、5 min）取上清液，经0.22 μm滤膜过滤除菌后得到对应浓度的发酵上清液。

1.3.2.2 DPPH自由基清除率测定

根据刘晓燕等^[14]的方法配制0.2 mmol/L DPPH-乙醇，将待测样品和DPPH-乙醇等体积混匀，避光反应40 min后测定A_{517 nm}。以无水乙醇分别代替样品和DPPH作为对照组和空白组。DPPH自由基清除率按式（1）计算：

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \frac{A_{\text{对照}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.2.3 羟自由基清除率测定

根据刘晓燕等^[14]的方法在离心管中按顺序依次加入1 mL 9 mmol/L FeSO₄溶液、1 mL样品溶液、3 mL 9 mmol/L水杨酸-乙醇溶液和1 mL 8.8 mmol/L过氧化氢溶液，于37 ℃水浴锅中加热反应15 min后测定A_{510 nm}。以等体积的蒸馏水分别代替样品溶液和过氧化氢溶液作为空白组和样品空白组。羟自由基清除率按式（2）计算：

$$\text{羟自由基清除率}/\% = \frac{A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})}{A_{\text{空白}}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.2.4 超氧阴离子自由基清除率测定

根据束文秀等^[15]的方法在离心管中加入3 mL Tris-HCl（pH 8.2），25 ℃水浴25 min后依次加入1 mL 25 mmol/L邻苯三酚、1 mL样品溶液，混合均匀后于25 ℃水浴锅中反应10 min，测定A_{320 nm}。以等体积的生理盐水代替样品溶液作为空白组，代替Tris-HCl及邻苯三酚作为样品空白组。超氧阴离子自由基清除率按式（3）计算：

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}/\% = \frac{A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})}{A_{\text{空白}}} \times 100 \quad (3)$$

1.3.2.5 ABTS阳离子自由基清除率测定

根据刘晓燕等^[14]的方法制备ABTS工作液。在96孔板中加入50 μL样品溶液和150 μL ABTS工作液，30 ℃避光反应10 min后测定A_{734 nm}。以等体积的蒸馏水分别代替样品溶液和ABTS工作液作为空白组和样品空白组。ABTS阳离子自由基清除率按式（4）计算：

$$\text{ABTS阳离子自由基清除率}/\% = \frac{A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})}{A_{\text{空白}}} \times 100 \quad (4)$$

1.3.2.6 抗脂质过氧化能力测定

根据王文琼等^[16]的方法制备卵黄悬液。向离心管中加入10 μL样品溶液、40 μL卵黄悬液、40 μL 25 mmol/L FeSO₄溶液和310 μL 0.1 mol/L磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS）（pH 7.45），充分混匀后于37 ℃反应15 min，向离心管中加入100 μL 20 g/100 mL三氯乙酸溶液和100 μL 0.8 g/100 mL TBA溶液，于沸水浴中加热15 min后取出离心管，冷却至室温后离心（3 500 r/min、10 min）取上清液测定A_{532 nm}。以等体积的PBS分别代替样品溶液和卵黄悬液作为空白组和样品空白组。抗脂质过氧化能力按式（5）计算：

$$\text{抗脂质过氧化能力}/\% = \frac{A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})}{A_{\text{空白}}} \times 100 \quad (5)$$

1.3.3 肝损伤保护活性测定

1.3.3.1 实验细胞准备

参考左玉^[17]的方法，将L02细胞密度调整为 8×10^4 个/mL后，按每孔100 μL加入96孔板，于37 ℃、5% CO₂培养箱中培养24 h，吸弃培养上清液后用100 μL PBS润洗2次备用。以长双歧杆菌ATCC 15697为对照菌株。实验均采用含10%胎牛血清和1%双抗（青霉素+链霉素）的DMEM高糖培养基，以下简称为DMEM完全培养基。

1.3.3.2 对L02细胞的毒性作用测定

取 5×10^8 CFU/mL菌株发酵液离心（6 000 r/min、5 min），取上清液经0.22 μm滤膜过滤除菌，然后采用DMEM完全培养基进行梯度稀释，得到上清液体积分数分别为40%、20%、10%、4%、2%的样品。

根据Shen Wenbin等^[18]的方法用MTT法检测细胞存活率。用PBS配制5 mg/mL的MTT母液（过0.22 μm滤膜

除菌, 4℃避光贮藏), 将MTT母液与DMEM基础培养基按体积比1:9混合均匀, 制得MTT工作液(需现配现用, 注意避光)。加入100 μL上述菌液作用细胞24 h后, 吸弃细胞培养上清液, 用100 μL PBS润洗2次, 避光加入100 μL MTT工作液继续培养4 h后, 吸弃培养液, 用PBS洗涤后每孔加入150 μL DMSO, 振板10 min, 测定 $A_{490\text{ nm}}$ 。空白组用DMEM完全培养基替代。细胞存活率按式(6)计算:

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100 \quad (6)$$

1.3.3.3 过氧化氢氧化损伤L02细胞模型的建立

过氧化氢溶液用0.22 μm滤膜过滤除菌, 并用DMEM完全培养基稀释至1.0~3.4 mmol/L, 不同浓度的过氧化氢作用于细胞6 h后, 由式(6)计算细胞存活率。空白孔用新鲜DMEM完全培养基替代过氧化氢溶液。

1.3.3.4 过氧化氢损伤L02细胞存活率测定

用100 μL 3.4 mmol/L过氧化氢损伤处理L02细胞6 h后弃去培养上清液, 用PBS润洗后加入100 μL含不同体积分数发酵上清液的DMEM完全培养基作用24 h, 模型组用新鲜DMEM完全培养基处理相同时间, 由式(6)计算细胞存活率。

1.3.3.5 酒精性损伤L02细胞模型的建立

用100 μL含有不同体积分数(2%~14%)乙醇溶液的DMEM完全培养基作用于细胞24 h, 培养结束后由式(6)计算细胞存活率。空白孔用新鲜DMEM完全培养基替代乙醇。

1.3.3.6 乙醇损伤L02细胞存活率和肝酶活力测定

实验组用100 μL同时含有体积分数6%乙醇和不同体积分数发酵上清液的DMEM完全培养基, 模型组用100 μL含有体积分数6%乙醇的DMEM完全培养基; 空白组用100 μL DMEM完全培养基, 作用于细胞24 h后, 由式(6)计算细胞存活率。同时将培养上清液收集至离心管中, 8 000 r/min离心10 min后取上清液, 用试剂盒测定上清液ALT和AST活力。

1.3.4 长双歧杆菌B2-01的高密度培养

1.3.4.1 不同营养成分对活菌数的影响

碳源: 向MRS肉汤培养基中添加葡萄糖或乳糖, 使其终质量分数分别为2%、3%、4%、5%、6%。

氮源: 向MRS肉汤培养基中添加酵母浸提粉或细菌学蛋白胨, 使其终质量分数分别为1%、2%、3%、4%、5%。

生长因子: 将新鲜西红柿洗净后称质量切碎, 与等量蒸馏水在100℃水浴中加热搅拌90 min, 然后用纱布过滤, 校正pH 7.0±0.1, 将浸出液分装后121℃高压灭菌15 min; 向MRS肉汤培养基中添加西红柿汁或低聚半乳糖, 使其终质量分数分别为1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%。

无机盐: 向MRS肉汤培养基中添加硫酸镁, 使其终质量分数分别为0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、

0.10%; 添加硫酸锰, 使其终质量分数分别为0.005%、0.010%、0.015%、0.020%、0.025%。

按3% (V/V) 的接种量接种二次活化的长双歧杆菌B2-01, 37℃培养18 h后测定活菌数。

1.3.4.2 Plackett-Burman试验设计

在单因素试验结果的基础上, 以酵母浸提粉、细菌学蛋白胨、乳糖、葡萄糖、低聚半乳糖添加量为影响因素, 以活菌数为响应值设计Plackett-Burman试验, 具体设计方案如表1所示。根据Plackett-Burman试验结果, 选出对B2-01活菌数影响最大的3个因素。

表1 Plackett-Burman试验设计因素及水平

Table 1 Codes and levels of independent variables used for Plackett-Burman design

因素	水平	
	-1	1
A酵母浸提粉添加量/%	2.00	4.00
B细菌学蛋白胨添加量/%	1.00	3.00
C乳糖添加量/%	2.00	4.00
D葡萄糖添加量/%	2.00	4.00
E低聚半乳糖添加量/%	1.50	2.50

1.3.4.3 最陡爬坡试验设计

通过Plackett-Burman试验中对B2-01活菌数贡献最大的3个影响因素的效应值确定其爬坡方向及步长, 具体设计方案如表2所示。

表2 最陡爬坡试验设计因素及水平

Table 2 Codes and levels of independent variables used for steepest ascent design

试验号	A酵母浸提粉添加量/%	B葡萄糖添加量/%	C乳糖添加量/%
1	2.00	4.00	2.00
2	2.50	3.50	2.25
3	3.00	3.00	2.50
4	3.50	2.50	2.75
5	4.00	2.00	3.00

1.3.4.4 Box-Behnken试验设计

在最陡爬坡试验结果的基础上, 确定响应面试验的中心点。以酵母浸提粉、葡萄糖和乳糖添加量为影响因素, 以活菌数为响应值, 设计3因素3水平的Box-Behnken试验, 具体方案如表3所示。

表3 Box-Behnken试验设计因素及水平

Table 3 Codes and levels of independent variables used for Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
A酵母浸提粉添加量/%	2.50	3.50	4.50
B葡萄糖添加量/%	2.00	2.50	3.00
C乳糖添加量/%	2.00	2.75	3.00

1.3.4.5 模型验证

利用响应面模型优化的最佳条件进行发酵实验, 比较模型预测值与实验值, 验证模型的有效性。

1.4 数据处理

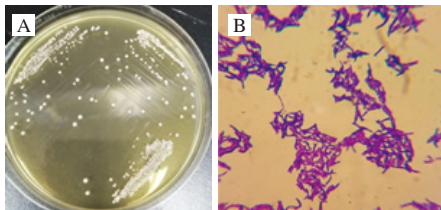
用MEGA 6.0软件构建系统进化树。用Design-Expert 10.0.7软件进行Plackett-Burman和Box-Behnken试验设计与数据分析。用SPSS 22.0软件对实验数据进行统计分析。用Origin 2021软件进行绘图。每个实验设置3个平行,采用单因素方差分析和邓肯检验分析实验结果间的差异,差异显著性水平为0.05。

2 结果与分析

2.1 菌株B2-01的分离筛选及种属水平鉴定

2.1.1 菌株B2-01分离筛选及形态学观察

从广州市母乳喂养的健康3月龄婴儿粪便样品中分离筛选到菌株B2-01。由图1可知,菌落形态特征为中间凸起,呈乳白色且不透明,表面光滑有光泽,边缘整齐。镜检后菌体为紫色,说明菌株为革兰氏阳性菌,菌体为棒状或Y型。



A.长双歧杆菌B2-01菌落形态图; B. 长双歧杆菌B2-01革兰氏染色图。

图1 长双歧杆菌B2-01的形态学观察

Fig. 1 Morphological observation of *B. longum* B2-01

2.1.2 菌株B2-01菌种鉴定

用NCBI数据库对菌株B2-01的16S rDNA序列进行BLAST比对,该菌株的16S rDNA序列与数据库中某些长双歧杆菌婴儿亚种菌株的16S rDNA序列相似度很高(>99%),与长双歧杆菌婴儿亚种2533同源性达到100%。由图2可知,菌株B2-01与长双歧杆菌婴儿亚种在同一个分支,说明菌株B2-01与长双歧杆菌婴儿亚种亲缘关系最近,可以确定菌株B2-01属于长双歧杆菌。菌株B2-01已于2021年9月1日在广东省微生物菌种保藏中心保藏,保藏编号为GDMCC No. 61911。

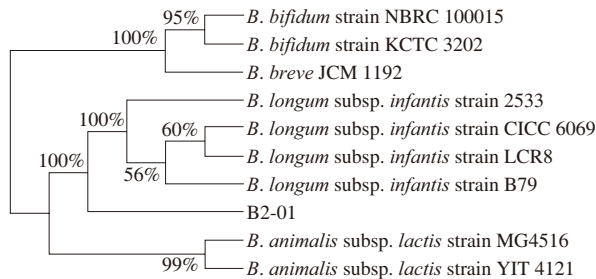


图2 长双歧杆菌B2-01的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *B. longum* B2-01

2.1.3 菌株B2-01生理生化鉴定

由表4可知,菌株B2-01过氧化氢酶阴性,且可以利用蔗糖、葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露糖等碳水化合物,长双歧杆菌婴儿亚种不能利用L-阿拉伯糖,而其他2个亚种可以利用,从L-阿拉伯糖的利用情况来看,菌株B2-01的分类更倾向于长双歧杆菌婴儿亚种。但也有研究^[19]发现,长双歧杆菌婴儿亚种有些菌株可以利用葡萄糖醛酸钠,而有些菌株则不能利用,同一亚种的菌株利用同一种碳水化合物的能力存在差异。

表4 菌株B2-01生理生化鉴定结果

Table 4 Biochemical identification results of strain B2-01

指标	结果	指标	结果	指标	结果
过氧化氢酶	—	半乳糖	+	α -甲基-D-甘露糖苷	—
甘油	—	葡萄糖	+	α -甲基-D-葡萄糖苷	—
赤藓醇	—	果糖	+	N-乙酰-葡萄糖胺	—
D-阿拉伯糖	—	甘露糖	+	苦杏仁苷	—
L-阿拉伯糖	—	山梨糖	—	熊果苷	—
棉子糖	+	鼠李糖	—	D-阿拉伯糖醇	—
D-木糖	+	卫矛醇	—	柳醇	—
L-木糖	—	肌醇	—	纤维二糖	—
阿东醇	—	甘露醇	—	麦芽糖	+
β -甲基-D-木糖苷	—	山梨醇	—	乳糖	+
蜜二糖	+	D-松二糖	—	淀粉	—
蔗糖	+	D-来苏糖	—	糖原	—
海藻糖	—	D-塔格糖	—	木糖醇	—
菊糖	—	D-岩糖	—	牦牛乳糖	—
松三糖	—	L-岩糖	—		

注:—,阴性;+,阳性。

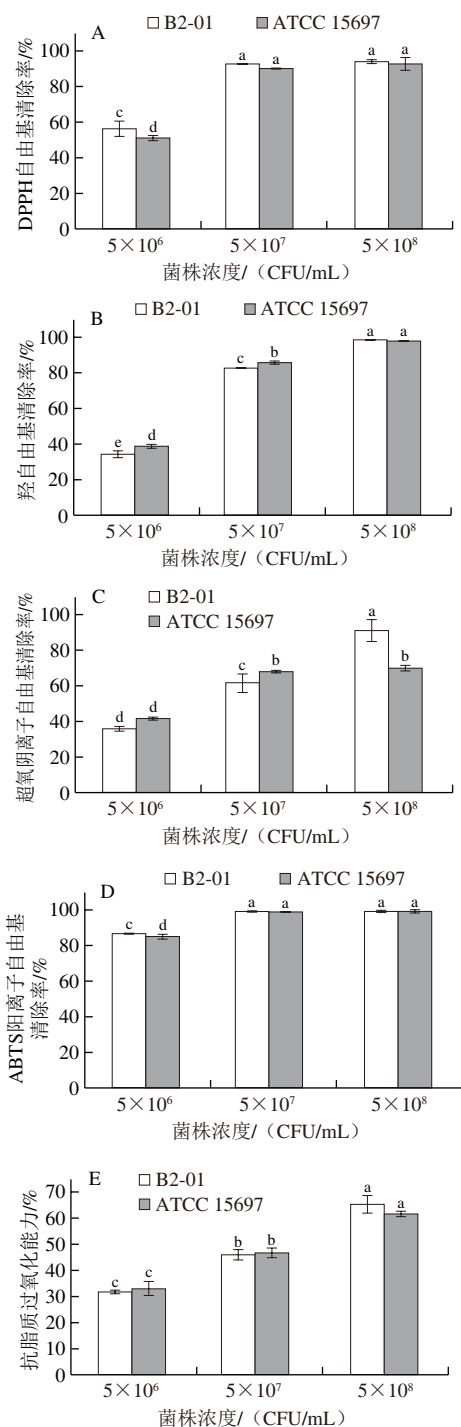
2.2 体外抗氧化活性研究结果

DPPH自由基清除率越高,表明样品抗氧化能力越强^[20]。由图3A可知,B2-01和ATCC 15697的上清液清除DPPH自由基的能力均呈浓度依赖性增长,且低菌株浓度与中高菌株浓度组间差异明显。低菌株浓度时B2-01上清液的DPPH自由基清除能力显著高于ATCC 15697($P<0.05$),在最高菌株浓度下(5×10^8 CFU/mL)清除率可达到93.93%。

羟自由基毒性较大,当其数量超过正常水平时会诱导DNA损伤、氧化线粒体、破坏细胞膜等^[21],从而导致人体疾病或衰老^[22]。由图3B可知,在实验菌株浓度下,B2-01和ATCC 15697的上清液均对羟自由基有一定的清除能力,相比之下,在中低菌株浓度时ATCC 15697上清液的羟自由基清除率显著高于B2-01($P<0.05$),但是在最高菌株浓度(5×10^8 CFU/mL)下二者并无显著性差异,此时B2-01上清液的羟自由基清除率最高可达到98.87%。

由图3C可知,虽然中低菌株浓度下ATCC 15697上清液的超氧阴离子自由基清除率略高于B2-01,但是随着菌株浓度升高至 5×10^8 CFU/mL,B2-01上清液的超氧阴离子自由基清除率随菌株浓度升高增长迅速,最高可达到

91.15%，而ATCC 15697上清液对超氧阴离子自由基的清除率仅从41.96%增长至70.06%，增幅较小，这说明B2-01具有更强的超氧阴离子自由基清除能力。



小写字母不同表示不同样品组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图3 菌株的DPPH自由基清除率(A)、羟自由基清除率(B)、超氧阴离子自由基清除率(C)、ABTS阳离子自由基清除率(D)和抗脂质过氧化能力(E)

Fig. 3 Scavenging capacity against DPPH (A), hydroxyl (B), superoxide anion (C) and ABTS cation (D) radicals and anti-lipid peroxidation activity (E) of strain B2-01

ABTS阳离子自由基溶液呈蓝绿色，在734 nm波长处有较强吸收峰，抗氧化剂可以与ABTS阳离子自由基反应使其褪色，因此溶液吸光度可以直观反映样品ABTS阳离子自由基清除能力^[23]。由图3D可知，B2-01和ATCC 15697上清液的ABTS阳离子自由基清除率均呈菌株浓度依赖性增长。当B2-01上清液在中高菌株浓度时，其ABTS阳离子自由基清除率分别为99.26%和99.47%，显著性分析结果表明清除率变化不明显，这说明B2-01上清液对于ABTS阳离子自由基的清除能力在中菌株浓度 (5×10^7 CFU/mL) 时趋于饱和，后续再增加菌株浓度对清除率影响较小。

由图3E可知，在所有实验菌株浓度下，各样品的抗脂质过氧化能力均随菌株浓度增大而升高，在最高菌株浓度下 (5×10^8 CFU/mL)，B2-01上清液的抗脂质过氧化能力略高于ATCC 15697，最高可达65.19%。

以DPPH自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基、ABTS阳离子自由基4种自由基清除能力和抗脂质过氧化能力共计5个指标评价菌株的抗氧化活性，结果表明，B2-01具有较强的抗氧化能力。

2.3 肝损伤保护活性研究结果

2.3.1 菌株B2-01对L02细胞的毒性作用

由图4可知，2株菌体积分数为40%的上清液处理L02细胞后，细胞存活率均不足30%，对L02细胞具有较强的毒性作用，而其余体积分数上清液培养L02细胞后，细胞存活率均在90%以上。因此选择体积分数为2%、4%、10%的上清液作为后续肝损伤保护研究的低、中、高水平。

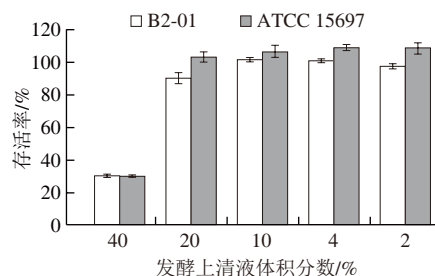


图4 B2-01和ATCC 15697上清液对L02细胞存活率的影响

Fig. 4 Effects of B2-01 and ATCC 15697 supernatants on the survival rate of L02 cells

2.3.2 过氧化氢氧化损伤L02细胞模型建立

由图5可知，当过氧化氢浓度高于2.6 mmol/L时，L02细胞的存活率下降明显，3.4 mmol/L过氧化氢作用6 h后，L02细胞的存活率仅为56.48%。因此，选择3.4 mmol/L过氧化氢作为后续实验的造模条件。

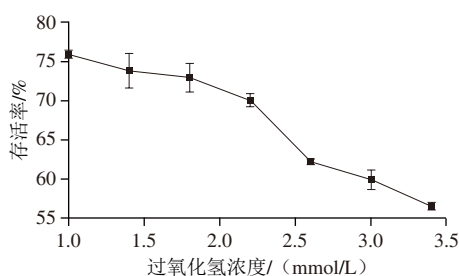
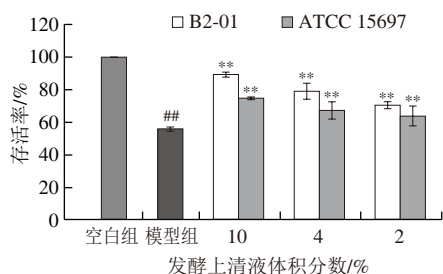


图5 不同浓度过氧化氢损伤后的L02细胞存活率

Fig. 5 Survival rates of L02 cells after injury with different concentrations of H₂O₂

2.3.3 菌株B2-01对过氧化氢损伤L02细胞存活率的影响

由图6可知,相较于空白组,模型组细胞存活率显著降低至55.58%,表明过氧化氢损伤模型建立成功。加入不同浓度的B2-01和ATCC 15697上清液干预后,细胞存活率均呈浓度依赖性升高,说明B2-01和ATCC 15697上清液对过氧化氢损伤的L02细胞均具有良好保护作用。相比于模型组,高、中、低浓度组B2-01上清液作用后的细胞存活率均显著提高,最高浓度(上清液体积分数10%)下的细胞存活率可高达89.10%,明显高于ATCC 15697上清液作用后的细胞存活率74.48%,表明B2-01上清液能够较为有效地减轻肝细胞的氧化损伤。B2-01上清液具有较强的羟自由基清除能力,因此B2-01可能通过清除细胞内的羟自由基以缓解过氧化氢诱导的氧化损伤。结合体外抗氧化结果,B2-01上清液具有良好的抗氧化活性,具有缓解机体氧化应激的潜力。



##.与空白组相比差异极显著 ($P < 0.01$); **.与模型组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。图8、9同。

图6 B2-01和ATCC 15697上清液对过氧化氢损伤后的L02细胞存活率的影响

Fig. 6 Effects of B2-01 and ATCC 15697 supernatants on the survival rate of L02 cells after H₂O₂ injury

2.3.4 酒精性损伤L02细胞模型建立

饮食摄入的乙醇大部分由肝脏氧化代谢^[24],代谢过程中会活化大量ROS,诱导机体产生氧化应激,导致肝脏细胞损伤^[25]。由图7可知,随着乙醇体积分数由2%逐渐提高至8%,L02细胞的存活率由80.24%下降至46.54%。当乙醇体积分数达到6%时,L02细胞的存活率为51.01%。因此,选择乙醇体积分数6%作为后续实验的造模体积分数。

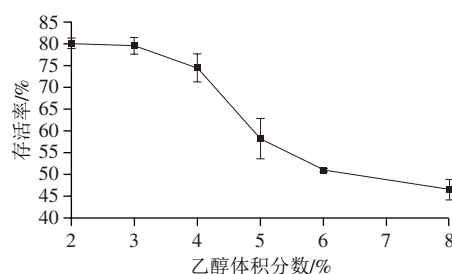


图7 不同体积分数乙醇损伤后的L02细胞存活率

Fig. 7 Survival rate of L02 cells after alcohol injury at different concentrations

2.3.5 菌株B2-01对乙醇损伤的L02细胞存活率和肝酶活力的影响

由图8可知,模型组L02细胞存活率仅为58.33%,说明在体积分数6%乙醇的损伤作用下,L02细胞的存活率与空白组相比显著降低,酒精性肝细胞损伤模型建立成功。但在不同浓度的B2-01和ATCC 15697上清液处理24 h之后,样品组细胞存活率显著高于模型组,说明B2-01和ATCC 15697上清液对乙醇损伤的L02细胞具有良好保护作用,同时存活率提高程度呈明显的剂量依赖性。相比于模型组,中剂量组B2-01上清液作用后的细胞存活率提升至85.67%,与ATCC 15697上清液作用后的细胞存活率86.84%无明显差异,而高剂量(上清液体积分数10%)组B2-01上清液作用后的细胞存活率可高达91.38%,高于同体积分数ATCC 15697上清液作用后的细胞存活率90.70%。乙醇代谢过程会产生大量自由基,引起氧化应激,使肝细胞损伤^[26],B2-01上清液对于乙醇损伤的保护作用可能与其凭借自身抗氧化能力有效清除自由基有关^[27-28]。以细胞存活率作为评估指标,对比过氧化氢损伤模型研究结果可知,B2-01上清液对乙醇损伤的L02细胞也具有较好保护作用,并且略强于对过氧化氢损伤的保护作用。

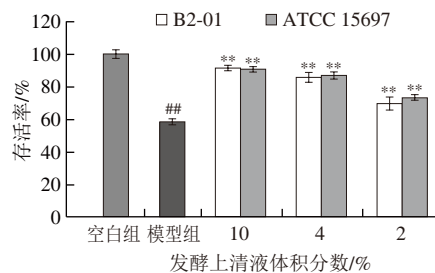


图8 B2-01和ATCC 15697上清液对乙醇损伤后的L02细胞存活率的影响

Fig. 8 Effects of B2-01 and ATCC 15697 supernatants on the survival rate of L02 cells after alcohol injury

转氨酶ALT和AST主要分布在肝细胞内^[29],如果肝细胞受到损伤,便会泄漏至胞外^[30]。由图9可知,相比于空白组细胞,模型组细胞上清液中ALT和AST活力分别显著提升至18.30、14.90 U/L,表明乙醇损伤模型建立成功。加入不同体积分数的B2-01上清液干预后,培养上清液中AST活力相较模型组显著降低,当B2-01上清液处于中剂量

(上清液体积分数4%)时,AST活力最低降至9.09 U/L,对细胞的修复作用最强。同样地,中高剂量B2-01上清液也能显著降低胞外ALT活力,但低剂量组B2-01上清液基本没有减少ALT向胞外泄漏的作用,中剂量组(上清液体积分数4%)B2-01上清液能使ALT活力最低降至14.36 U/L。中高剂量B2-01上清液干预受损细胞后,胞外AST和ALT活力几乎降至与空白组相当,这说明B2-01上清液对于乙醇诱导损伤的L02细胞具有较强的保护作用。

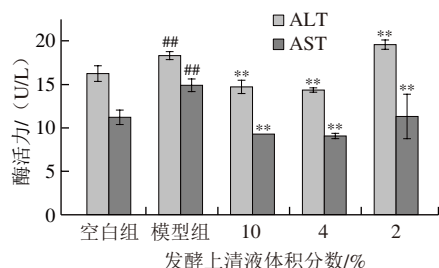


图9 B2-01上清液对乙醇损伤L02细胞中ALT和AST活力的影响

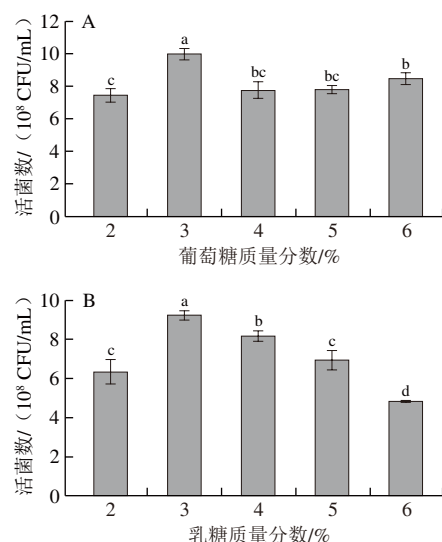
Fig. 9 Effects of B2-01 supernatant on ALT and AST levels in alcohol-injured L02 cells

2.4 高密度培养研究结果

2.4.1 不同营养成分对活菌数的影响

2.4.1.1 碳源的影响

由图10可知,随着葡萄糖和乳糖质量分数的升高,发酵液中的活菌数均呈先增加后减少的趋势。添加过多的葡萄糖和乳糖会使发酵菌液的渗透压增大,反而会抑制菌体细胞的生长。当葡萄糖的质量分数为3%时,获得最大的活菌数,为 $(9.93 \pm 0.32) \times 10^8$ CFU/mL,当乳糖的质量分数为3%时,获得最大的活菌数,为 $(9.23 \pm 0.21) \times 10^8$ CFU/mL。



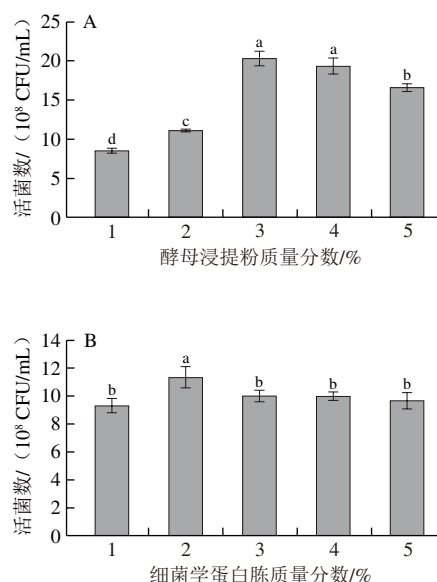
A.葡萄糖质量分数对活菌数的影响; B.乳糖质量分数对活菌数的影响。小写字母不同表示组间差异显著($P < 0.05$); 图11~13同。

图10 碳源对长双歧杆菌B2-01活菌数的影响

Fig. 10 Effects of carbon sources on the viable count of *B. longum* B2-01

2.4.1.2 氮源的影响

由图11可知,当酵母浸提粉的质量分数为3%时,B2-01活菌数最高,达到 $(20.27 \pm 0.90) \times 10^8$ CFU/mL。随着酵母浸提粉质量分数的升高,活菌数呈先增加后减少的趋势,说明培养基中的酵母浸提粉过多反而会抑制菌体的生长。当细菌学蛋白胨的质量分数为2%时,发酵液中的B2-01活菌数最高,为 $(11.33 \pm 0.76) \times 10^8$ CFU/mL。



A.酵母浸提粉质量分数对活菌数的影响;

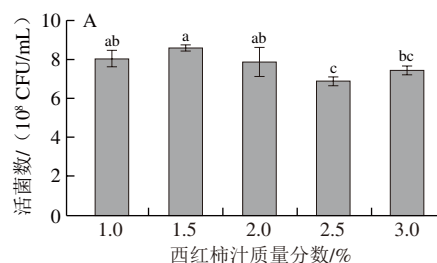
B.细菌学蛋白胨质量分数对活菌数的影响。

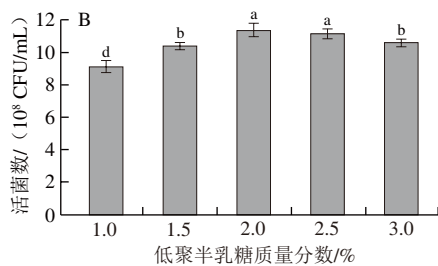
图11 氮源对长双歧杆菌B2-01活菌数的影响

Fig. 11 Effect of nitrogen sources on the viable count of *B. longum* B2-01

2.4.1.3 生长因子的影响

由图12可知,当西红柿汁的质量分数为1.5%时,B2-01活菌数最高,为 $(8.57 \pm 0.15) \times 10^8$ CFU/mL,西红柿汁对B2-01活菌数的影响较小,这一结果与王建等^[31]的研究结果相似。当低聚半乳糖的质量分数为2.0%时,B2-01活菌数最高,达到 $(11.37 \pm 0.40) \times 10^8$ CFU/mL。随着低聚半乳糖质量分数的升高,活菌数呈先增加后减少的趋势,说明培养基中的低聚半乳糖过多反而会抑制菌体的生长。





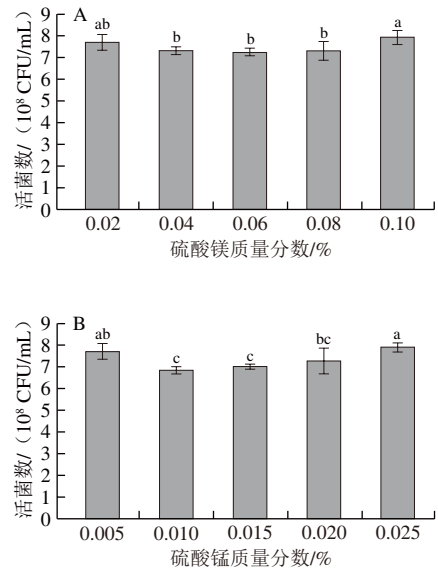
A. 西红柿汁质量分数对活菌数的影响；
B. 低聚半乳糖质量分数对活菌数的影响。

图 12 生长因子对长双歧杆菌B2-01活菌数的影响

Fig. 12 Effect of growth factors on the viable count of *B. longum* B2-01

2.4.1.4 无机盐的影响

由图13可知，MRS肉汤培养基中硫酸镁和硫酸锰的质量分数分别为0.02%、0.005%，继续增大其质量分数，活菌数均没有提高。可能是因为MRS肉汤培养基中的硫酸镁和硫酸锰已经满足B2-01菌株生长繁殖的需要，硫酸镁和硫酸锰对B2-01的促增殖作用在质量分数分别为0.02%、0.005%时已趋于饱和，继续增大其质量分数不能表现出明显的增菌效果。



A. 硫酸镁质量分数对活菌数的影响；B. 硫酸锰质量分数对活菌数的影响。

图 13 无机盐对长双歧杆菌B2-01活菌数的影响

Fig. 13 Effects of inorganic salts on the viable count of *B. longum* B2-01

2.4.2 Plackett-Burman试验结果

由单因素试验结果可知，当MRS肉汤培养基中分别含有质量分数3.00%酵母浸提粉、2.00%细菌学蛋白胨、3.00%葡萄糖、3.00%乳糖和2.00%低聚半乳糖时，获得的B2-01活菌数是各自单因素试验中最高的，因此，根据各单因素试验结果选择高、低2个水平，试验设计与结果如表5所示。

表 5 Plackett-Burman试验设计与结果
Table 5 Plackett-Burman design with results

试验号	A酵母浸提粉添加量	B细菌学蛋白胨添加量	C乳糖添加量	D葡萄糖添加量	E低聚半乳糖添加量	活菌数/(10 ⁸ CFU/mL)
1	1	1	-1	-1	-1	3.67±0.42
2	1	1	-1	1	1	2.76±0.06
3	-1	1	1	1	-1	2.31±0.08
4	1	-1	1	1	-1	3.42±0.40
5	1	1	1	-1	-1	3.81±0.80
6	1	1	-1	1	1	3.01±0.17
7	1	-1	-1	-1	1	3.26±0.27
8	-1	-1	1	-1	1	3.14±0.24
9	-1	-1	-1	-1	-1	1.88±0.05
10	-1	1	1	-1	1	2.75±0.05
11	1	-1	1	1	1	2.90±0.20
12	-1	-1	-1	1	-1	1.41±0.01

由表6可知，葡萄糖添加量的效应值为负，应该减小，而其他4个因素的效应值为正，应该增加。由贡献率的大小可知，这5个因素对模型影响的大小依次为：酵母浸提粉>葡萄糖>乳糖>细菌学蛋白胨>低聚半乳糖。试验整体因素模型P值为0.035 8<0.05，说明Plackett-Burman试验的结果具有可信度。因此，最终选择酵母浸提粉、葡萄糖和乳糖3个影响因素进行下一步的最陡爬坡试验。其余2个因素则根据每一因素的效应值进行取值，即选择细菌学蛋白胨添加量3.00%、低聚半乳糖添加量2.50%。

表 6 Plackett-Burman试验效应分析
Table 6 Effect analysis of independent variables tested in Plackett-Burman design

因素	水平		效应	贡献率/%	P
	-1	1			
A酵母浸提粉添加量	2.00	4.00	0.97	53.98	0.007 0
B细菌学蛋白胨添加量	1.00	3.00	0.38	8.43	0.163 5
C乳糖添加量	2.00	4.00	0.39	8.73	0.157 4
D葡萄糖添加量	2.00	4.00	-0.45	11.62	0.111 7
E低聚半乳糖添加量	1.50	2.50	0.22	2.78	0.397 4

2.4.3 最陡爬坡试验结果

由图14可知，最陡爬坡试验结果呈现先增高后降低的趋势，在4号试验点处出现最高点，该点处酵母浸提粉添加量3.50%、葡萄糖2.50%、乳糖2.75%，此时长双歧杆菌B2-01的活菌数达到最大，为(4.07±0.21)×10⁹ CFU/mL。该点即为下一步培养条件Box-Behnken试验设计的中心点。

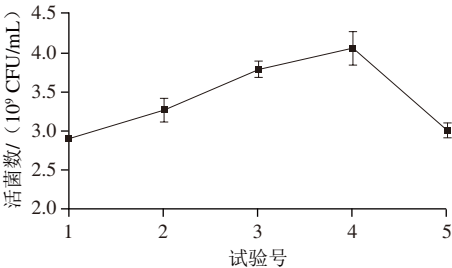


图 14 最陡爬坡试验结果

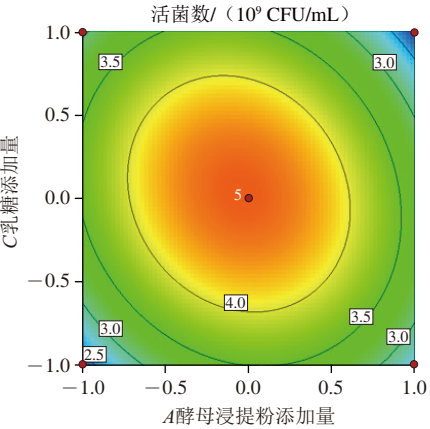
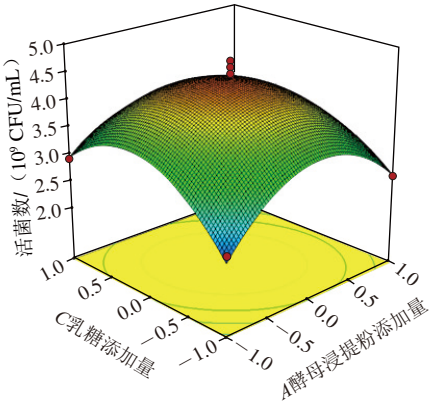
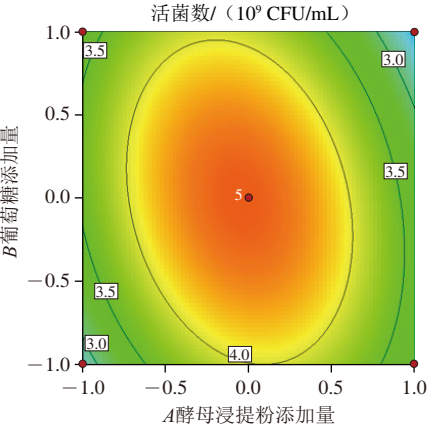
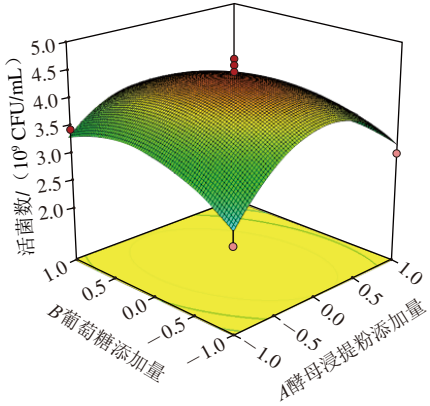
Fig. 14 Results of steepest ascent test

2.4.4 Box-Behnken试验结果

由表7、8可知：模型的 P 值为 $0.001\ 0<0.05$ ，模型显著，具有可信度；决定系数 $R^2=0.949\ 2$ ，失拟项的 P 值为 $0.212\ 6>0.05$ ，失拟项不显著，说明模型与实际情况的拟合较好。活菌数（ Y ）对酵母浸提粉添加量（ A ）、葡萄糖添加量（ B ）和乳糖添加量（ C ）的多元二次回归方程为： $Y=4.440\ 00-0.108\ 75A-0.037\ 50B+0.038\ 75C-0.297\ 50AB-0.270\ 00AC-0.612\ 50BC-1.010\ 00A^2-0.492\ 50B^2-0.910\ 00C^2$ 。通过方程可知，二次项系数为负值，由图15可知，其所代表的抛物面开口向下，表明方程具有最大值。当响应值 Y 最大时，酵母浸提粉添加量（ A ）为3.45%、葡萄糖添加量（ B ）为2.48%、乳糖添加量（ C ）为2.79%，此时理论预测B2-01活菌数为 4.45×10^9 CFU/mL。对该配方培养基进行验证，发酵液的活菌数为 4.20×10^9 CFU/mL，与预测值吻合，拟合率达94.38%，说明通过Box-Behnken试验设计建立的数学模型准确、可靠。使用该优化培养基进行培养，B2-01活菌数达到优化前的5.45倍。

表 7 Box-Behnken试验设计与结果				
Table 7 Box-Behnken design with results				
试验号	A酵母浸提粉添加量	B葡萄糖添加量	C乳糖添加量	Y活菌数/ (10^9 CFU/mL)
1	-1	1	0	3.46 ± 0.46
2	1	0	1	2.06 ± 0.09
3	0	1	1	2.28 ± 0.12
4	0	0	0	4.10 ± 0.10
5	-1	0	-1	2.44 ± 0.04
6	1	-1	0	3.01 ± 0.09
7	-1	0	1	2.93 ± 0.07
8	1	1	0	2.76 ± 0.15
9	0	0	0	4.50 ± 0.40
10	-1	-1	0	2.52 ± 0.02
11	0	0	0	4.70 ± 0.20
12	0	0	0	4.30 ± 0.40
13	0	1	-1	3.30 ± 0.10
14	0	-1	1	4.00 ± 0.30
15	0	-1	-1	2.57 ± 0.03
16	1	0	-1	2.65 ± 0.06
17	0	0	0	4.60 ± 0.20

表 8 回归模型方差分析结果						
Table 8 Analysis of variance of regression model						
方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	12.00	9	1.33	14.52	0.001 0	显著
A	0.095	1	0.095	1.03	0.343 8	
B	0.011	1	0.011	0.12	0.736 6	
C	0.012	1	0.012	0.13	0.728 2	
AB	0.35	1	0.35	3.86	0.090 3	
AC	0.29	1	0.29	3.18	0.117 9	
BC	1.50	1	1.50	16.35	0.004 9	
A ²	4.30	1	4.30	46.79	0.000 2	
B ²	1.02	1	1.02	11.12	0.012 5	
C ²	3.49	1	3.49	37.98	0.000 5	
残差	0.64	7	0.092			
失拟项	0.41	3	0.14	2.36	0.212 6	不显著
净误差	0.23	4	0.058			
总误差	12.64	16				



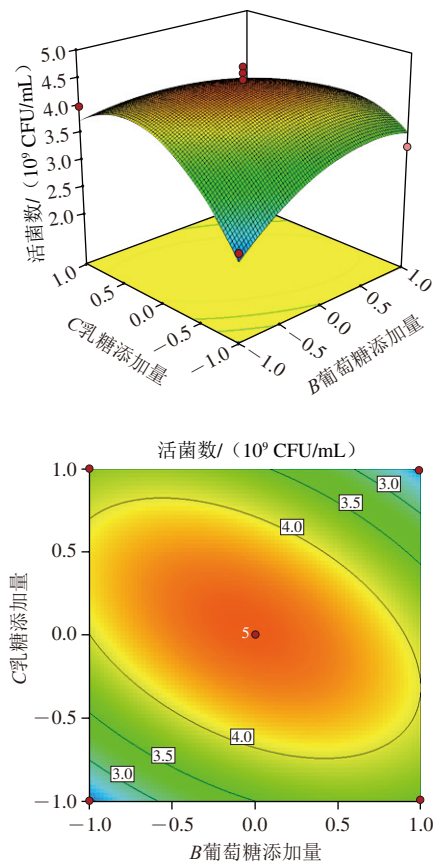


图 15 各因素交互作用对长双歧杆菌B2-01活菌数影响的响应面与等高线图
Fig. 15 Response surface and contour plots showing the interactive effects of variables on the viable count of *B. longum* B2-01

3 结论

本研究通过16S rDNA测序和生理生化鉴定,从广州市3月龄婴儿粪便中分离鉴定出一株长双歧杆菌B2-01。以DPPH自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基、ABTS阳离子自由基4种自由基清除能力和抗脂质过氧化能力共计5个指标评价B2-01的体外抗氧化活性,发现 5×10^8 CFU/mL的B2-01发酵上清液DPPH自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基、ABTS阳离子自由基4种自由基清除能力和抗脂质过氧化能力均强于对照菌株ATCC 15697。肝损伤保护活性结果显示,在过氧化氢损伤模型和酒精肝损伤模型中,DMEM完全培养基中体积分数10% B2-01发酵上清液可使L02细胞存活率分别提高至89.10%和91.38%,均高于对照菌株ATCC 15697(细胞存活率分别提高至74.48%和90.70%),同时,中高浓度B2-01上清液能使酒精损伤肝细胞胞外AST和ALT活力几乎降至与空白组相当,表明B2-01上清液对于乙醇诱导损伤的L02细胞具有较强的保护作用。高密度培养研究优化后的最佳培养条件确定为酵母浸提粉添加量3.45%、葡萄糖2.48%、乳糖2.79%、细菌学蛋白胨3.00%、低聚半

乳糖2.50%。在此优化条件下,发酵液的活菌数最高可达 4.20×10^9 CFU/mL,能够达到优化前(7.71×10^8 CFU/mL)的5.45倍。本研究为发掘长双歧杆菌B2-01的益生功能特性提供了参考,旨在为长双歧杆菌B2-01作为具有高应用价值的益生菌提供数据支持和理论依据。

参考文献:

- [1] WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food[R]. Rome: WHO, 2002.
- [2] 马赛荣, 王新明, 崔艳, 等. 益生菌产业的发展和趋势[J]. 生物产业技术, 2019, 71(3): 99-104.
- [3] XU Y, KE H H, LI Y T, et al. Malvidin-3-O-glucoside from blueberry ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by regulating transcription factor EB-mediated lysosomal function and activating the Nrf2/ARE signaling pathway[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(16): 4663-4673. DOI:10.1021/acs.jafc.0c06695.
- [4] INGAWALE D K, MANDLIK S K, NAIK S R. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2014, 37(1): 118-133. DOI:10.1016/j.etap.2013.08.015.
- [5] 李吉平, 陈雪, 刘建华, 等. 双歧杆菌生物特性及其功能研究进展[J]. 中国奶牛, 2020, 362(6): 57-61. DOI:10.19305/j.cnki.11-3009/s.2020.06.014.
- [6] 黄勤雯, 陈铁涛, 肖金忠. 亲和人体与非亲和人体双歧杆菌之间的生理特征差异[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(6): 24-31.
- [7] 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. DOI:10.1093/femsre/fuaa010.
- [8] TURRONI F, MILANI C, DURANTI S, et al. Bifidobacteria and the infant gut: an example of co-evolution and natural selection[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2018, 75(1): 103-118. DOI:10.1007/s00018-017-2672-0.
- [9] 刘冬梅, 钟舒莹, 徐仪倩, 等. 一株长双歧杆菌婴儿亚种B2-01及其应用: CN115927049A[P]. 2023-04-07.
- [10] 王丹婷, 王世博, 刘力, 等. 长双歧杆菌L-DT的高密度培养[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(12): 106-113.
- [11] 刘冬梅, 余佳佳, 彭鑫, 等. 德氏乳杆菌DMLD-H1的生物学特性研究及发酵培养基优化[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2021, 49(3): 71-79.
- [12] 许喜林, 钟舒莹, 周晓莉, 等. 粪肠球菌EF-ZA1107-06的安全性评价及益生特性研究[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2022, 50(11): 52-61.
- [13] 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. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2021.06.002.
- [14] 刘晓燕, 谢丹, 马立志, 等. 刺梨果渣发酵前后活性成分及抗氧化能力的比较研究[J]. 食品科技, 2021, 46(2): 16-24. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2021.02.004.
- [15] 束文秀, 吴祖芳, 翁佩芳, 等. 植物乳杆菌和发酵乳杆菌对胡柚汁发酵品质及其抗氧化性的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(2): 152-158. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171213-15.
- [16] 王文琼, 孙志勇, 黄冬成, 等. 乳酸菌发酵蓝莓乳清混合体系体外抗氧化特性分析[J]. 现代食品科技, 2021, 37(1): 142-149. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.01.0744.

- [17] 左玉. 脂质过氧化及抗氧化剂抗氧化活性检测方法[J]. 粮食与油脂, 2009(2): 39-42.
- [18] SHEN W B, SONG D, WU J Y, et al. Protective effect of a polysaccharide isolated from a cultivated *Cordyceps mycelia* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells[J]. *Phytotherapy Research*, 2011, 25(5): 675-680. DOI:10.1002/ptr.3320.
- [19] 李明洁, 杨波, 赵建新, 等. 长双歧杆菌婴儿亚种的快速区分[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(18): 43-49. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.021111.
- [20] ZHU J J, YANG J J, WU G J, et al. Comparative antioxidant, anticancer and antimicrobial activities of essential oils from *Semen platycladi* by different extraction methods[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 146: 112206. DOI:10.1016/j.indcrop.2020.112206.
- [21] 周孟, 廖祥明, 王珊, 等. 槲皮素抑制人肝癌细胞HepG2的体内外活性研究[J]. 安徽医药, 2019, 23(11): 2136-2141.
- [22] GUO H Q, REN F, ZHANG L, et al. Kaempferol induces apoptosis in HepG2 cells via activation of the endoplasmic reticulum stress pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 13(3): 2791-2800. DOI:10.3892/mmr.2016.4845.
- [23] 吴遵秋, 姜友军, 苏光灿, 等. 油橄榄叶中橄榄苦苷的体外抗氧化和抑菌活性[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 94-99. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201421019.
- [24] 朱力杰. 北五味子总三萜、木脂素对酒精性肝损伤的保护作用及其机制的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014: 35-49.
- [25] 胡婷. 苦丁茶有效成分的分离纯化、结构鉴定及生物活性评价[D]. 广州: 华南理工大学, 2016: 91-143.
- [26] 幸海燕. 金丝桃苷对过氧化氢诱导的L02细胞损伤的保护作用及机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2011: 21-64.
- [27] 王韵婷, 刘倩, 郭子晨, 等. 双歧杆菌二联制剂对小鼠抗氧化水平及肠道菌群的影响[J]. 食品科技, 2022, 47(5): 13-20. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2022.05.047.
- [28] SILVA P, FERNANDES E, CARVALHO F. Dual effect of red wine on liver redox status: a concise and mechanistic review[J]. *Archives of Toxicology*, 2015, 89(10): 1681-1693. DOI:10.1007/s00204-015-1538-1.
- [29] SUTOH Y, HACHIYA T, SUZUKI Y, et al. ALDH2 genotype modulates the association between alcohol consumption and AST/ALT ratio among middle-aged Japanese men: a genome-wide G × E interaction analyses[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 1622. DOI:10.1038/s41598-020-73263-1.
- [30] 邱萍, 李相, 孔德松, 等. 酒精性肝病发病机制研究的新进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(2): 160-163.
- [31] 王建, 李紫娟, 汪长钢, 等. 双歧杆菌促生长因子的筛选[J]. 中国酿造, 2012, 31(8): 109-111.