

长寿老人源双歧杆菌优良菌株的筛选*

李平兰 江志杰 马长伟**

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要:以人结肠腺癌细胞系 HT-29 细胞为试材,对来源于广西巴马百岁以上长寿老人肠道的 24 株双歧杆菌进行了体外黏附试验。结果发现,双歧杆菌均具有一定的黏附能力,其中 TTF、Z2、TZ5 和 J-1 菌株具有较高的黏附能力。进一步对 4 株初筛双歧杆菌耐胃酸、胆汁酸和合成 B 族维生素能力的试验发现,双歧杆菌 TTF 菌株不仅能合成较高的 B₁、B₂、B₆、B₁₂ 等多种 B 族维生素,而且在 pH 3.0 的条件下处理 120min 存活率达 93.11%,同时在 2% 胆盐浓度下处理 24h 有较好的存活,具有显著的综合优势。

关键词:长寿老人,双歧杆菌,菌株,筛选

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0007-06

The Screening of *Bifidobacterium* from Macrobian*

LI Ping-Lan JIANG Zhi-Jie MA Chang-Wei**

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: Using colon adenocarcinoma cell line HT-29 as testing material, adhesion test was carried out for 24 strains of *Bifidobacteria* isolated from dejecta of longevous people aged one hundred years. The results showed that all strains could adhere to colon adenocarcinoma cells HT-29, among which the strains of TTF, Z2, TZ5 and J-1 showed higher adhesive capability. Thus these four strains of *Bifidobacteria* were further tested for their endurance to stomach acid and bile acid. The production of vitamin B by these bacterial were also tested. All these tests indicated that the strain of TTF has high ability to produce Vitamin B₁, B₂, B₆, B₁₂. The survival rate after the treatment under pH 3.0 for 120 min was 93.11%, at the same time, the strain TTF can survive after being treated with 2% bile acid for 24h.

Key words: Macrobian, *Bifidobacteria*, Strains, Screening

乳酸菌是一类从可发酵性碳水化合物(主要指葡萄糖)产乳酸的细菌的通称,广泛用于食品工业、轻工业、发酵工业、医药和饲料工业;作为人和动物体内正常的生理性细菌,它们在调节肠道微生态平衡方面起着非常重要的作用。近年来,随着微生物生态学的深入,微生态制剂迅猛发展起来,而双歧杆菌作为人和动物胃肠道微生物区系中发挥重要生理作用的菌种越来越受到了青睐。然而双歧杆菌能否合成多种维生素、能否耐过胃酸、胆汁酸及在肠道内黏附定植是影响活菌制剂效果的关键因素。黏附是指细菌与肠上皮细胞通过生物化学作用产生的特异性的粘连^[1]。黏附是定植的第一步,不能黏附于肠上皮细胞表面的细菌,只能是过路菌而不能在肠道内定植,也就不能充分发挥生理功能。HT-29 细胞是一种体外易培养的人结肠腺癌细胞,其形态、黏附能力

* 国家高技术研究发展计划项目(“863”项目)(No. 2002AA248041)

Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2002AA248041)

** 通讯作者 Tel: 010-62737643, E-mail: chwma@263.com

收稿日期: 2004-07-19, 修回日期: 2004-08-20

等与肠上皮细胞类似,能表达正常人肠细胞的形态和某些生理特性^[2],国外用其作为体外黏附试验的模拟细胞。本试验选用 HT-29 细胞作为模拟细胞对来源于广西巴马百岁以上长寿老人肠道的 24 株双歧杆菌进行了体外黏附试验,并对初选的 4 株黏附能力较高的双歧杆菌菌株进行了体外合成 B 族维生素和耐胃酸、胆汁酸能力菌株的进一步复筛,目的是为发酵食品和微生态制剂用优良菌株提供资源和参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种:24 株黏附试验用双歧杆菌全部为食品微生物教研室保藏菌种,分离自广西巴马百岁以上长寿老人肠道(表 1);TTF、Z2、TZ5、J-1 四株初筛的黏附能力较高的双歧杆菌菌株用于体外合成维生素和耐胃酸、胆汁酸试验。

培养基:双歧杆菌用 MRS 培养基和改良 MRS 培养基 37℃,亨盖特厌氧条件培养。附改良 MRS 培养基配方如下:蛋白胨 10g,牛肉膏 10g,酵母膏 5g,葡萄糖 20g,乙酸钠 5g, K_2HPO_4 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.2g, 双歧杆菌促生长物质 3g, 半胱氨酸盐酸盐 0.2g, 土温 80 1mL, 蒸馏水定容至 1,000mL, 调 pH 至 7.0。

HT-29 细胞:人结肠腺癌细胞系 HT-29 细胞由北京协和医院提供。

1640 培养液:由 78% PRMI 1640, 20% 小牛血清, 1% 青霉素、链霉素双抗溶液, 1% 谷氨酰胺, 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化液组成。

PBS 缓冲液 (pH7.4):由 8g NaCl, 0.20g KCl, 1.14g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 0.24g KH_2PO_4 加水定容至 1,000 mL 配置而成。

1.2 仪器与设备

超净工作台、高压灭菌锅、CO₂细胞培养箱、厌氧培养箱、厌氧罐、厌氧管、氮气瓶、电热恒温培养箱、显微镜、水浴锅、高效液相色谱仪等。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞培养:HT-29 结肠腺癌细胞系在 1640 细胞培养液 37℃、5% CO₂-5% 空气的二氧化碳培养箱中恒温培养。每天更换营养液,每周传代 1 次。

1.3.2 黏附试验:将培养好的 HT-29 细胞消化,制成细胞悬液 (5×10^4 个/mL),向预先已放置盖玻片的 24 孔板每孔内加入 2 mL 细胞悬液,37℃、5% CO₂-95% 空气中培养。细胞贴壁后,吸出旧的细胞培养液,无菌 PBS 冲洗 2 次,每孔加入 1 mL 菌液(含菌体 1×10^8 cfu/mL)与 1 mL 1640 细胞培养液的混合液 37℃、5% CO₂-95% 空气中培养 2h。无菌 PBS 冲 3 次,10% 甲醛固定 2h。革兰氏染色,镜检,随机挑选 20 个视野,计数 50 个细胞上黏附的细菌数,再计算平均每个细胞所黏附的细菌数。

1.3.3 耐胃酸试验^[3]:以 pH7.4 的 PBS 缓冲液为基础,再用 37% 的盐酸将其分别调至 pH2.0 和 3.0, 1×10^5 Pa、15min 灭菌后按 10% 的接种量接入已活化的 TTF、Z2、TZ5、J-1 液体菌种,37℃ 厌氧条件下分别作用 0、30min、60min、90min、120min 后取样测定活菌数。

1.3.4 耐胆盐试验^[4]:将活化好的 4 株受试双歧杆菌菌株的液体培养物按 2% 接种量接入含不同胆盐浓度的改良 MRS 液体培养基中(培养基中分别加 0.1%、0.2%、0.3%、0.5%、2.0% 胆盐),同时以不含胆盐的改良 MRS 作为对照。在 37℃ 恒温条件下培养 24h 后取样测定活菌数。

1.3.5 活菌计数的方法^[5]: 采用 Hungate 厌氧滚管培养后计数。

2 结果与分析

2.1 24 株双歧杆菌对 HT-29 细胞的黏附

被测试的 24 株双歧杆菌均来自于世界第 4 长寿区—广西巴马百岁以上长寿老人粪便, 除其中的一株长双歧杆菌 B1 外, 其他 23 株均未定种。24 株双歧杆菌对 HT-29 细胞体外黏附的结果见表 1。

表 1 24 株双歧杆菌对 HT-29 细胞的黏附

菌种	菌株	来源	黏附菌数/细胞
长双歧杆菌 B1	<i>Bifidobacterium longum</i> B1	长寿老人	8.5 ± 1.8
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> Z1	长寿老人	7.6 ± 2.1
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> Z2	长寿老人	18.4 ± 2.7
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> Z5	长寿老人	10.0 ± 1.8
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> Z6	长寿老人	9.8 ± 0.9
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> TTF	长寿老人	16.7 ± 1.2
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> TZ1	长寿老人	7.6 ± 2.0
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> TZT	长寿老人	8.2 ± 1.2
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> TZ3	长寿老人	8.7 ± 1.1
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> TZ4	长寿老人	10.7 ± 1.8
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> TZ5	长寿老人	12.8 ± 0.9
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> TZS	长寿老人	5.8 ± 1.8
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> TZ7	长寿老人	8.8 ± 1.0
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> 4Z6	长寿老人	7.4 ± 0.8
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> 5Z6	长寿老人	10.0 ± 2.1
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> J-1	长寿老人	12.4 ± 1.2
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> J-2	长寿老人	9.0 ± 1.0
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> J-3	长寿老人	11.5 ± 2.2
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> 11-4	长寿老人	10.9 ± 2.4
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> 7-6	长寿老人	10.3 ± 1.8
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> 18-4	长寿老人	6.8 ± 1.6
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> 18-5	长寿老人	5.5 ± 1.1
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> XZ3	长寿老人	11.3 ± 2.0
双歧杆菌属 (未定种)	<i>Bifidobacterium</i> XZA	长寿老人	5.4 ± 1.7

由上表可以看出, 双歧杆菌均有一定的黏附能力, 被测试的 24 株双歧杆菌中, 黏附平均值在 10.0 个/细胞以上的占 45.8%; 黏附平均值在 5.0 ~ 10.0 个/细胞之间的占 54.2%, 没有黏附平均值低于 5.0 个/细胞的, 所有测试双歧杆菌的平均黏附水平为 9.75 个/细胞。

在测试的 24 株双歧杆菌中, 黏附能力高的菌株为 Z2、TTF、TZ5 和 J-1。它们的黏附平均值分别为 (18.4 ± 2.7) 个/细胞, (16.7 ± 1.2) 个/细胞, (12.8 ± 0.9) 个/细胞和 (12.4 ± 1.2) 个/细胞。故选此 4 株双歧杆菌做合成 B 族维生素能力和耐胃酸、胆汁酸能力的进一步研究。

2.2 4 株初筛双歧杆菌菌株合成 B 族维生素的能力

以上述试验得到的 Z2、TTF、TZ5、J-14 株黏附能力较高的双歧杆菌为试验菌，对其进行进一步进行体外合成 B 族维生素能力研究，结果见表 2。

表 2 四株初筛双歧杆菌 B 族维生素合成能力测定 (mg/100mL)

维生素	VB ₁	VB ₂	VB ₆	VB ₁₂
CK (改 MRS)	2.16	0.25	57.60	6.28
Z2 菌株	2.32	0.55	76.00	4.85
TTF 菌株	2.46	0.74	86.80	9.60
TZ5 菌株	2.88	0.04	66.13	6.40
J-1 菌株	2.32	0.34	87.60	5.82

由表 2 可以看出，4 株初筛的黏附能力较高的双歧杆菌菌株均有一定的合成 B 族维生素的能力。综合 B₁、B₂、B₆和 B₁₂ 4 种维生素的测定结果可知，双歧杆菌 TTF 菌株合成 B 族维生素的综合能力最佳。

2.3 4 株初筛双歧杆菌菌株耐胃酸、胆汁酸的能力

以 Z2、TTF、TZ5、J-1 4 株黏附能力较高的双歧杆菌为试验菌，对其进行进一步进行体外耐受胃酸、胆汁酸的能力试验，研究结果见图 1 和图 2。

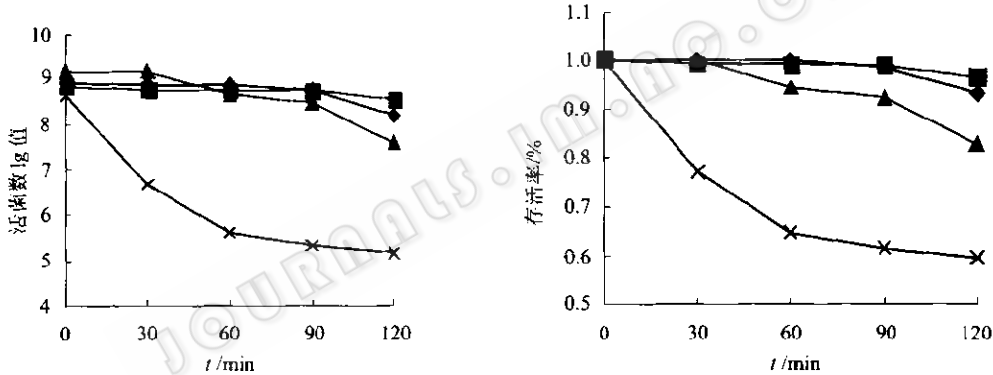


图 1 4 株受试双歧杆菌在 pH3 条件下的耐受能力

pH3 对不同菌株存活的影响

◆ TTF, ■ Z2, ▲ J-1, × TZ5

在 pH3 下作用不同时间的存活率

◆ TTF, ■ Z2, ▲ J-1, × TZ5

通常胃酸的 pH 值在 3 左右，流体食物在胃内停留时间为 1~2h。由图 1 可以看出，4 株黏附能力均好的双歧杆菌菌株对胃酸的耐受能力差异很大，表现为 Z2 > TTF > J-1 > TZ5，其中的 Z2 和 TTF 耐胃酸能力最强，在 pH 3 的酸度下处理 90min，残留活菌数的对数值分别为 8.740 和 8.761，存活率分别为 98.87% 和 98.43% 菌株，在 pH 值 3.0 下处理 120min，Z2 和 TTF 残留活菌数的对数值为 8.536 和 8.187，存活率仍可达到 96.56% 和 93.11%。而其他 2 株双歧杆菌耐胃酸的能力都较差，尤其是 TZ5 菌株，在相同条件下处理 120 min 后，残留活菌数的对数值为 5.17，存活率仅为 59.8%。说明 Z2 和 TTF 菌株有较强的耐胃酸能力，可顺利通过胃酸环境而到达肠内。

小肠中胆盐含量通常在 0.3~3.0g/kg，由图 2 可以看出，0.1% 和 0.2% 的胆盐浓度基本上对 4 株黏附能力好的双歧杆菌菌株没有抑制作用，0.3%、0.5% 和 2.0% 3 个浓度下虽表现出不同的耐受能力，但在 0.3% 和 0.5% 的浓度下处理 24h 后都有一定数量的活菌存在，具体表现为 TTF > TZ5 > J-1 > Z2。其中的 TTF 菌株耐胆盐的能力最强，

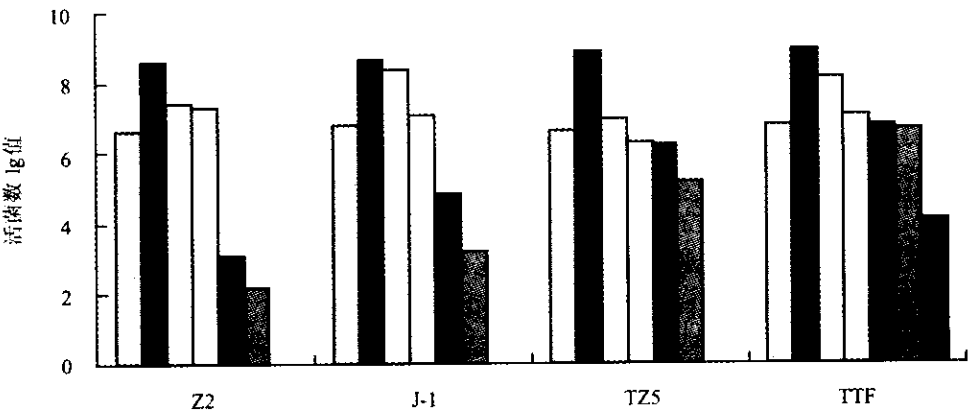


图2 不同浓度胆盐对4株双歧杆菌存活的影响

□ 0h, ■ 24h 0.0%, □ 24h 0.1%, □ 24h 0.2%, ■ 24h 0.3%, ■ 24h 0.5%, ■ 24h 2.0%

在0.5%的浓度下处理24h 仅使其活菌数略有下降, 活菌数的对数值为6.68 (CK 为6.83)。在2.0%的浓度下处理24h 还能存活, 残留活菌数的对数值为4.1, 而其他3株双歧杆菌在此浓度下已检测不到有活菌的存在。

Kumann 等^[6] 研究证明, 乳酸菌发挥生理功能特性的活菌数临界值为 10^6 cfu/mL 或 10^6 cfu/g。在小肠正常胆盐 (0.3 ~ 3.0g/kg) 情况下, 由于食物在小肠内不停留, 因此可以说, TTF 菌株具有很强的抗胆汁酸能力, 能顺利通过小肠而到达大肠。

分析 Z2、TTF、TZ5 和 J-1 4 株双歧杆菌耐胃酸、胆汁酸的试验结果可以发现, 双歧杆菌 TTF 菌株具有综合的耐胃酸、胆汁酸优势, 故选其为下一步研究用试验菌株。

3 讨论

3.1 有关黏附实验

在黏附试验中发现, 用 PBS 冲洗相同次数的情况下, 黏附能力低的双歧杆菌菌株不仅细胞上黏附的细菌少, 而且在无细胞的区域细菌也很稀少; 而像 Z2、TTF 等黏附能力高的双歧杆菌菌株除了细胞上黏附的细菌较多外, 在没有细胞的空白处双歧杆菌的残留也很多。分析其原因可能一是由于细菌发生自凝集反应造成了冲洗困难。Perez 已证明有黏附能力的人源双歧杆菌都能发生自动凝集反应和血凝集反应^[3]。二是细菌与粘液中的黏附素受体发生特异性结合, 而黏附素受体可能来自于粘液本身, 也可能是细胞消化后细胞表面的黏附素受体破碎, 分散到了培养液中, 虽经 PBS 冲洗, 仍有可能残留。

目前评定细菌黏附常用两种方法, 即计数法和视觉观测法。前者计数一定细胞上的细菌数, 然后再计算平均每个细胞黏附的菌数。后者是在显微镜下直接观察细菌对细胞的黏附趋势。两种方法各有利弊, 计数法直接用数值显示试验结果, 可定量, 有说服力, 但还没有统一的标准。视觉观察法直观, 但黏附与否的评定易受主观的影响。本试验筛选具有黏附能力双歧杆菌菌株时, 在统计黏附结果时, 采用了以计数法为主, 视觉观察法为辅的方法, 即主要计入在细胞上的细菌数。这也是目前被认为是研究细菌黏附的标准方法。当然新近有采用激光共距式细胞仪分析双歧杆菌对肠上皮 Lovo 细胞黏附的研究报道^[7], 其方法客观、准确, 值得采用和推广。

3.2 有关乳酸菌耐胃酸、胆汁酸研究

耐胃酸、胆汁酸特性是优良乳酸菌作为功能性食补因子的一个重要指标。研究证明,胃液 pH 值因饮食结构不同而波动很大,通常 pH 值为 3.0 左右,空腹或食用酸性食品时 pH 值可达 1.5,食用碱性食物 pH 值可达 4.0~5.0,食物通过时间为 1~2h。十二指肠中胆汁盐含量为 0.3~3.0g/kg,食物通过的时间相对极短。由此可见,双歧杆菌食入人体后能否顺利通过胃酸环境是决定其发挥生理功能的关键因素。已有相关研究报道了乳酸菌、双歧杆菌体外耐胃酸、胆汁酸研究^[8]。本试验采用改良 MRS 培养基,厌氧和生理温度条件下,模拟正常人体胃液低 pH 值和十二指肠高胆汁酸的状态对初选的 4 株黏附能力高的双歧杆菌菌株进行了耐胃酸、胆汁酸性能试验,研究结果与上述类似。

4 结论

(1) 本试验检测了 24 株双歧杆菌对人结肠腺癌细胞系 HT-29 细胞的黏附能力,发现双歧杆菌对 HT-29 细胞均有一定的黏附能力,但不同菌株其黏附能力不同。在受试的 24 株双歧杆菌中,双歧杆菌 Z2、TTF、TZ5 和 J-1 4 株菌株对 HT-29 细胞的黏附能力较高。

(2) Z2、TTF、TZ5 和 J-1 4 株初筛的黏附能力较高的双歧杆菌菌株均可合成 B 族维生素,但合成能力不同,其中 TTF 菌株的综合合成能力最好。

(3) Z2、TTF、TZ5 和 J-1 4 株初筛的黏附能力较高的双歧杆菌耐胃酸、胆汁酸的能力有明显的差异,其中 TTF 菌株在 pH 3.0 的条件下处理 120min 存活率达 93.11%,同时在 2% 胆盐浓度下处理 24h 后有较好的存活率,表现为较强的综合耐胃酸、胆汁酸的能力。

参 考 文 献

- [1] 康 白编. 微生物学. 大连: 大连出版社, 1988.
- [2] Dunne C, Murphy L, Flynn S, *et al.* *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999, **76**: 279~292.
- [3] Perez P F, Minnaard Y, Disalvo E A, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 21~26.
- [4] Chung H S, Kim Y B, Chun S L. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, **47**: 25~32.
- [5] 李平兰, 张 茂. 食品科学, 1999, **20** (2): 68~69.
- [6] Kumann J A, Rasic J L. *Bulletin IDF*, 1988, **227**: 101~104.
- [7] 郑跃杰, 潘令嘉, 叶桂安, 等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1997, **17** (2): 85~87.
- [8] 赵瑞香, 孙俊良, 李元端, 等. 西北农林科技大学学报, 2004, **32** (2): 57~60.