

5 株双歧杆菌代谢产物及细胞中脂肪酸构成的气相色谱—质谱分析

Analysis of fatty acid profile in metabolites and cells of five *Bifidobacterium* strains by GC-MS

陈拾旻¹

刘凤英²

陈会民³

陈历俊^{4,5}

陈树兴¹

CHEN Shi-yang¹ LIU Feng-ying² CHEN Hui-min³ CHEN Li-jun^{4,5} CHEN Shu-xing¹

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2. 洛阳市种子管理站, 河南 洛阳 471002;

3. 洛阳市农产品检测安全检测中心, 河南 洛阳 471002; 4. 国家母婴乳品健康工程技术研究中心,

北京 100163; 5. 北京市乳品工程技术研究中心, 北京 100163)

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang,

Henan 471023, China; 2. Luoyang Seed Management Station, Luoyang, Henan 471002, China;

3. Luoyang Agricultural Product Safety Testing Center, Luoyang, Henan 471002, China;

4. National Maternal and Infant Healthy Dairy Research Center, Beijing 100163, China;

5. Beijing Dairy Engineering Technology Research Center, Beijing 100163, China)

摘要:采用气相色谱—质谱联用(GC-MS)技术,检测并分析比较了 5 株双歧杆菌代谢产物及细胞中脂肪酸的构成。结果表明,不同双歧杆菌脂肪酸含量在代谢产物之间差异较为明显,在细胞之间有一定的差异,同种不同源的双歧杆菌菌株之间(动物双歧杆菌 A6 和 BA-5)也存在一定的脂肪酸差异;棕榈酸($C_{16:0}$)、硬脂酸($C_{18:0}$)、二十四烷酸($C_{24:0}$)为各双歧杆菌代谢产物及细胞中的主要脂肪酸;各菌株代谢产物中, $C_{16:0}$ 在 5 组组间差异显著($P < 0.05$),且 $C_{16:0}$ 与 $C_{18:0}$ 的质量浓度比($\rho_{C_{16:0}} : \rho_{C_{18:0}}$)为 2.607~3.120,乙酸和乳酸的浓度比($C_{\text{乙酸}} : C_{\text{乳酸}}$)为 2.085~2.295。与代谢产物相比,各菌株细胞中未检测出芥酸($C_{22:1n-9}$)、二十四碳烯酸($C_{24:1n-14}$)、二十碳五烯酸($C_{20:5n-3}$)。

关键词:双歧杆菌;GC-MS;代谢产物;细胞;脂肪酸

Abstract: Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to analyze fatty acid profile in metabolites and cells of five strains of *Bifidobacterium*. The results showed that the fatty acid content of different *Bifidobacterium* was significantly different among the metabolites, and there were some differences among the cells.

Differences of fatty acid were also found among the same *Bifidobacterium* strains derived from different sources. Methyl palmitate ($C_{16:0}$), methyl lignocerate ($C_{24:0}$), and methyl stearate ($C_{18:0}$) were the main fatty acids in metabolites and cells of the five strains. Among them, the $C_{16:0}$ was significantly different ($P < 0.05$), and the content ratio of $C_{16:0}$ to $C_{18:0}$ was between 2.607 and 3.120; the content ratio of acetic acid to lactic acid was between 2.085 and 2.295. Compared with the metabolites, methyl erucate ($C_{22:1n-9}$), methyl nervonate ($C_{24:1n-14}$), methyl 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoate ($C_{20:5n-3}$) were not detected in the cells of the five strains.

Keywords: *Bifidobacterium*; GC-MS; metabolite; cell; fatty acid

人体肠道内众多的微生物菌群能够通过多种途径影响其他人体器官的功能,从而影响人体的健康状况,其变化与肥胖、糖尿病、心血管类疾病等密切相关^[1]。研究发现,不仅益生菌本身,其代谢产物的抗病毒能力^[2-3]及在食品加工中的应用^[4]也都具有较大的科学价值。作为人和动物肠道益生菌群的重要组成部分,双歧杆菌不仅具有抗肿瘤、延缓人体衰老等生理功能^[5],而且还能够抑制炎症细胞因子表达、参与抗生素的生物合成等^[6-7]。

脂肪酸是生物体的代谢产物成分之一,是其不可缺少的能量和营养物质。其中,饱和脂肪酸(SFA)对人体有提供能量、抑制肿瘤病毒生长等功能^[8-10];不饱和脂肪

基金项目:北京市科技计划项目(编号: D141100004814002, Z171100004517013)

作者简介:陈拾旻,男,河南科技大学在读硕士研究生。

通信作者:陈树兴(1965—),男,河南科技大学教授,博士。

E-mail: chenshuxing1@163.com

收稿日期:2020-11-24

酸中的单不饱和脂肪酸(MUFA)具有降血糖、调节血脂^[11]和保护心血管^[12]等作用,多不饱和脂肪酸(PUFA)具有维护神经细胞结构、预防心脑血管疾病和对抗肥胖等生理功能^[13-15]。

不同的微生物具有其独特的脂肪酸谱,研究^[16]证明,细菌脂肪酸谱分析可以作为一种快速的细菌鉴定技术。Shim 等^[17]对 9 株细菌的细胞脂肪酸进行了分析,认为通过细菌细胞脂肪酸鉴定细菌是一种可靠的方法。Ines 等^[18]通过气相色谱—真空紫外分光光度法分析测定了细胞脂肪酸构成,通过主成分分析和聚类分析后,根据其脂肪酸谱成功对 27 种细菌进行了分类。

目前,国内外对双歧杆菌的研究多集中在胞外多糖及蛋白特性^[19-20]等方面,少数研究了双歧杆菌胞内脂肪酸的构成^[21],而对其代谢产物中脂肪酸构成的研究未见报道。试验拟研究不同双歧杆菌代谢产物及细胞中脂肪酸的构成,以期为后续双歧杆菌功能和营养方面的研究及其脂肪酸指纹图谱的建立提供基础数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

假小链双歧杆菌 BP-1 (*Bifidobacterium pseudocatenulatum* BP-1)、长双歧杆菌 BL-3 (*B. longum* BL-3)、动物双歧杆菌 BA-5 (*B. animalis* BA-5)、婴儿双歧杆菌 BI-38 (*B. infantis* BI-38):实验室保存菌株;

动物双歧杆菌 A6 (*B. animalis* subsp. *Lactis* A6):中国农业大学食品科学与营养学院教育部—北京市共建功能乳品重点实验室保存菌株;

双歧杆菌 BS 培养基(不含琼脂):青岛海博生物技术有限公司;

37 种脂肪酸甲酯混标:色谱纯,美国 Sigma 公司;

正己烷:色谱纯,西陇化工股份有限公司;

乙酸、乳酸、硫酸、氢氧化钠、甲醇:分析纯,天津市德恩化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

气相色谱—质谱联用仪:TSQ9000 型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

气相色谱仪:7890A 型,安捷伦科技(中国)有限公司;

干式氮吹仪:YY-N100 型,上海允延仪器有限公司;

超净工作台:BBS-SDC 型,济南鑫贝西生物技术有限公司;

高压蒸汽灭菌锅:TYAIB 型,宁波久兴医疗器械有限公司;

真空冷冻干燥机:LGI-10D 型,北京四环科学仪器厂有限公司;

台式高速冷冻离心机:H1850R 型,湖南湘仪离心机

有限公司;

分析天平:ATY124 型,日本岛津有限公司。

1.3 双歧杆菌的代谢产物样品及细胞样品的制备

从保藏菌株的甘油管中按体积分数 2% 的接种量分别转接 5 株双歧杆菌于 200 mL 双歧杆菌 BS 液体培养基中,37 °C 厌氧培养 48 h,继代培养 3 次。将所得菌液在 4 °C 下以 8 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.45 μm 滤膜过滤去除菌体后转移至离心管中,作为代谢产物样品于 4 °C 下保存备用;在菌体沉淀中加入 5 mL 0.9% 生理盐水,用移液枪抽吸数次使菌液呈均匀浑浊状态,4 °C,8 000 r/min 离心 5 min,重复以上清洗 3 次,收集菌体后真空冷冻干燥得到各双歧杆菌菌粉,即细胞样品。

1.4 双歧杆菌的代谢产物中乙酸、乳酸含量的测定

根据许强等^[22]的方法。

1.5 双歧杆菌的代谢产物及菌体中脂肪酸的测定

1.5.1 脂肪酸甲酯化 根据徐敏等^[23]的方法,略作修改。准确量取 3 mL 代谢产物样品置于 10 mL 具塞比色管中,加入 2 mol/L 氢氧化钠甲醇溶液 2 mL,混匀后于 70 °C 水浴加热 10 min;取出比色管,冷却至室温后加入 3 mL 正己烷,混匀后萃取,静置分层后,用移液枪吸取正己烷至 10 mL 离心管中,氮气吹干后加入体积分数 10% 的硫酸甲醇溶液 2 mL 进行甲酯化处理,反应温度为 70 °C,时间为 15 min;反应结束后冷却至室温,加入 1.5 mL 正己烷混匀,静置分层后,取 1 mL 正己烷相(上层清液)经 0.22 μm 微孔滤膜过滤到进样瓶中,密封后于 -20 °C 保存备用。

同样准确称取 50 mg 各双歧杆菌细胞样品至 10 mL 具塞比色管中,进行上述相同处理得到甲酯化的细胞脂肪酸样品备用。

1.5.2 色谱和质谱条件 根据仲玉备等^[24]的方法,修改如下:

(1) 色谱条件:采用 SP-2560 毛细管柱(100 m × 0.25 mm,0.20 μm);升温程序:100 °C 保持 12 min,以 20 °C/min 升至 150 °C;以 2.5 °C/min 升至 180 °C;以 0.8 °C/min 升至 196 °C,保持 10 min;以 2 °C/min 升至 220 °C;以 10 °C/min 升至 240 °C,保持 6 min;载气(Ar)流速 1.2 mL/min,进样口温度 220 °C;进样量 1 μL;分流比 10:1。

(2) 质谱条件:电子轰击离子源;电子能量 70 eV;传输线温度 240 °C;离子源温度 280 °C;质量扫描范围 m/z 35~400。

1.5.3 37 种脂肪酸定性定量测定 将 37 种脂肪酸甲酯混标样品分别以稀释 10,20,50,80,100 倍进样 1 μL,通过计算得到各脂肪酸的标准曲线。

各个样品采用同样条件进样,定性方法采用与 37 种脂肪酸甲酯混标的保留时间比对和 NIST 谱库检索;定量

方法采用标准曲线法计算得到各样品的脂肪酸含量。

1.6 数据处理与分析

每组试验做3次平行,所有试验结果以“平均值±标准差”表示。试验数据采用DPS软件进行差异显著性分析,差异显著性水准选用0.05。

2 结果与分析

2.1 37种脂肪酸甲酯混标的GC-MS分析

图1为稀释10倍进样得到的37种脂肪酸甲酯混标总离子色谱图。由图1可知,各组分分离状况良好,已达到对脂肪酸进行定性及定量分析的要求。

2.2 5株双歧杆菌代谢产物中乙酸、乳酸的浓度

乙酸、乳酸浓度比值是否大于1,是判断其是否为双歧杆菌有机酸代谢产物的标准^[25]。5株双歧杆菌代谢产物中乙酸和乳酸的浓度如表1所示。其中乙酸浓度为28.325~29.430 mmol/L,各菌株之间差异显著($P<0.05$);乳酸浓度为12.825~13.765 mmol/L,在菌株BL-3、BI-38之间差异不显著,但均显著低于其他3组($P<0.05$)。另外,各双歧杆菌代谢产物中乙酸浓度均大于乳酸浓度,与田芬等^[26]的研究结果相一致,且乙酸和乳酸的浓度比为2.085~2.295。研究发现,植物乳杆菌产生的乙酸和乳酸,不仅是其主要抑菌代谢物^[27],而且还能够增强人体抗病毒免疫能力^[28],所以,双歧杆菌代谢产物中高浓度的乙酸和乳酸对其起抑菌能力及抗病毒免疫能

表1 5株双歧杆菌代谢产物中乙酸、乳酸的浓度[†]

Table 1 Contents of acetic acid and lactic acid in metabolites of five strains of *Bifidobacterium*

菌株	乙酸/ (mmol·L ⁻¹)	乳酸/ (mmol·L ⁻¹)	乙酸/乳酸
A6	29.280±0.042 ^b	13.765±0.120 ^a	2.130±0.014 ^c
BP-1	29.430±0.028 ^a	12.825±0.021 ^c	2.295±0.007 ^a
BL-3	28.490±0.028 ^d	13.590±0.028 ^b	2.100±0.001 ^d
BA-5	28.925±0.021 ^c	12.890±0.014 ^c	2.245±0.007 ^b
BI-38	28.325±0.035 ^e	13.560±0.028 ^b	2.085±0.007 ^d

[†] 同行上标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

力的评价或许具有重要参考作用。

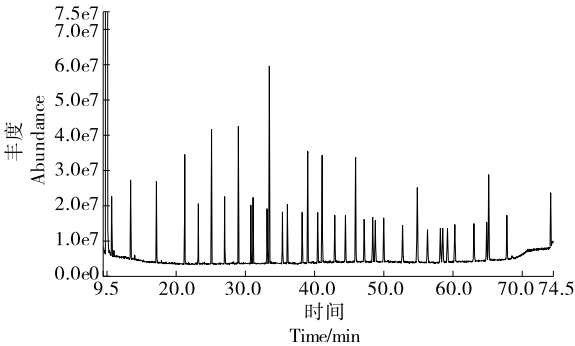
2.3 5株双歧杆菌代谢产物中的脂肪酸构成

5株双歧杆菌代谢产物中的脂肪酸检测结果如表2所示。长链饱和脂肪酸(LCSFA)中的C_{16:0}、C_{18:0}和C_{24:0}质量浓度均较高,3种脂肪酸之和占总脂肪酸质量浓度的81.67%~83.54%,为各双歧杆菌代谢产物中主要脂肪酸,且3种脂肪酸质量浓度在A6与BA-5组间差异显著($P<0.05$);另外,C_{16:0}在5组组间差异显著($P<0.05$),5组中C_{16:0}与C_{18:0}的质量浓度比值为2.607~3.120。短链饱和脂肪酸(SCSFA)中,丁酸(C_{4:0})质量浓度在各菌株代谢产物中均较高,其在人体中具有提供能量、修复肠黏膜,改善肠道消化及屏障等功能^[29-30]。中链饱和脂肪酸(MCSFA)C_{6:0}、C_{8:0}、C_{10:0}、C_{11:0}、C_{12:0}质量浓度在各组间无显著差异。各菌株代谢产物PUFA中,亚油酸(C_{18:2n-6c})质量浓度均较高,研究^[31]发现,人体膳食补充亚油酸有助于改善心衰;另外,总PUFA和总MUFA质量浓度在菌株BP-1代谢产物中均最高,且均显著高于BL-3、BA-5和BI-38($P<0.05$),而在A6中最低。此外,共有19种脂肪酸在质量浓度上均有至少2组组间差异显著($P<0.05$),且LCSFA、MUFA和PUFA总质量浓度均有3组组间差异显著($P<0.05$)。因此,不同双歧杆菌脂肪酸质量浓度在代谢产物之间差异较为明显,且同种不同源的双歧杆菌菌株之间(动物双歧杆菌A6和BA-5)也存在着一一定的脂肪酸差异。

已有学者^[32]证明,健康的代谢与家族寿命息息相关,因此,具有诸多益生作用的双歧杆菌,其代谢也与肠道的健康有着密不可分的关系。Yaron等^[33]发现,富含高β-棕榈酸酯的奶粉显著增加了婴儿肠道中双歧杆菌的数量,从而对婴儿肠道微生物区系产生有利的影响。试验中各双歧杆菌代谢产物中棕榈酸质量浓度都比较高,有可能作为其调节肠道微生物区系功能的评价指标之一。

2.4 5株双歧杆菌细胞中的脂肪酸构成

5株双歧杆菌细胞中的脂肪酸检测结果如表3所示。



37种脂肪酸甲酯混标按出峰先后顺序,其名称分别为:C_{4:0}(10.68)、C_{6:0}(13.42)、C_{8:0}(17.15)、C_{10:0}(21.24)、C_{11:0}(23.21)、C_{12:0}(25.11)、C_{13:0}(27.01)、C_{14:0}(28.99)、C_{14:1n-5}(30.80)、C_{15:0}(31.03)、C_{15:1n-9}(33.14)、C_{16:0}(33.46)、C_{16:1n-7}(35.36)、C_{17:0}(36.07)、C_{17:1n-9}(38.11)、C_{18:0}(39.02)、C_{18:1n-9t}(40.45)、C_{18:1n-9c}(41.40)、C_{18:2n-6t}(42.93)、C_{18:2n-6c}(44.46)、C_{20:0}(45.94)、C_{18:3n-6}(47.16)、C_{20:1n-10}(48.41)、C_{18:3n-3}(48.78)、C_{21:0}(49.99)、C_{20:2n-6}(52.72)、C_{22:0}(54.84)、C_{20:3n-6}(56.18)、C_{22:1n-9}(58.19)、C_{20:3n-3}(58.41)、C_{23:0}(59.21)、C_{20:4n-6}(60.27)、C_{22:2n-6}(62.92)、C_{24:0}(64.87)、C_{20:5n-3}(65.16)、C_{24:1n-14}(67.79)、C_{22:6n-3}(74.00)

图1 37种脂肪酸甲酯混标GC-MS总离子流色谱图
Figure 1 GC-MS total ion chromatogram of mixed standard of 37 fatty acid methyl esters

表 2 5 株双歧杆菌代谢产物中脂肪酸测定结果[†]

Table 2 Fatty acid composition in metabolites of five strains of <i>Bifidobacterium</i>								μg/mL
菌株	丁酸 (C _{4:0})	己酸 (C _{6:0})	辛酸 (C _{8:0})	癸酸 (C _{10:0})	十一烷酸 (C _{11:0})	月桂酸 (C _{12:0})	十三烷酸 (C _{13:0})	肉豆蔻酸 (C _{14:0})
A6	20.778±1.583 ^a	1.362±0.944 ^a	2.479±1.054 ^a	3.394±1.370 ^a	1.171±0.018 ^a	4.314±0.638 ^a	1.693±0.050 ^a	13.714±1.201 ^b
BP-1	12.806±0.681 ^b	0.556±0.001 ^a	1.957±0.135 ^a	2.676±0.155 ^a	1.260±0.001 ^a	5.080±0.327 ^a	1.790±0.003 ^a	27.250±0.393 ^a
BL-3	7.538±0.701 ^c	0.383±0.015 ^a	1.476±0.034 ^a	2.182±0.016 ^a	1.154±0.023 ^a	3.714±0.272 ^a	1.681±0.036 ^a	9.525±0.038 ^c
BA-5	11.975±0.061 ^b	0.885±0.500 ^a	2.103±0.505 ^a	2.606±0.395 ^a	1.206±0.031 ^a	4.664±0.774 ^a	1.726±0.023 ^a	13.024±0.674 ^b
BI-38	11.988±0.530 ^b	0.697±0.219 ^a	2.001±0.154 ^a	2.824±0.208 ^a	1.203±0.012 ^a	4.503±0.063 ^a	1.739±0.020 ^a	15.939±1.138 ^b
菌株	十五烷酸 (C _{15:0})	棕榈酸 (C _{16:0})	十七烷酸 (C _{17:0})	硬脂酸 (C _{18:0})	花生酸 (C _{20:0})	二十一烷酸 (C _{21:0})	二十二烷酸 (C _{22:0})	二十四烷酸 (C _{24:0})
A6	3.347±0.654 ^a	152.364±0.264 ^b	3.049±0.302 ^a	57.272±1.518 ^b	6.380±0.308 ^b	— — —	5.949±0.296 ^b	318.484±1.039 ^b
BP-1	4.108±1.516 ^a	311.701±1.325 ^a	4.984±1.566 ^a	112.799±0.672 ^a	8.724±0.797 ^a	3.772±0.148 ^a	7.537±0.496 ^a	272.274±1.982 ^c
BL-3	3.034±0.341 ^a	85.879±0.887 ^c	2.794±0.168 ^a	27.529±0.552 ^d	5.829±0.265 ^b	3.223±0.001 ^b	5.766±0.124 ^b	336.211±0.888 ^a
BA-5	3.521±0.278 ^a	145.039±1.661 ^c	3.079±0.163 ^a	50.972±0.663 ^c	6.294±0.181 ^b	3.181±0.040 ^b	6.029±0.024 ^b	333.819±1.476 ^a
BI-38	3.585±0.177 ^a	136.913±1.227 ^d	3.098±0.126 ^a	52.514±0.822 ^c	6.430±0.086 ^b	3.227±0.019 ^b	6.063±0.004 ^b	336.252±0.902 ^a
菌株	十五碳烯酸 (C _{15:1n-9})	棕榈油酸 (C _{16:1n-7})	十七碳烯酸 (C _{17:1n-9})	反油酸 (C _{18:1n-9t})	二十碳烯酸 (C _{20:1n-10})	芥酸 (C _{22:1n-9})	二十四碳烯酸 (C _{24:1n-14})	亚油酸 (C _{18:2n-6c})
A6	1.822±0.012 ^a	5.650±0.422 ^b	3.695±1.356 ^a	3.311±1.369 ^a	— — —	— — —	— — —	4.488±0.114 ^{ab}
BP-1	— — —	13.821±1.962 ^a	4.059±0.147 ^a	4.599±0.397 ^a	1.312±0.009 ^a	1.347±0.986 ^b	5.690±1.269 ^a	5.349±0.088 ^a
BL-3	1.884±0.074 ^a	7.730±0.879 ^b	3.814±1.240 ^a	2.974±0.753 ^a	— — —	— — —	2.149±1.958 ^a	4.718±0.472 ^{ab}
BA-5	1.839±0.061 ^a	7.048±0.020 ^b	4.027±0.193 ^a	5.430±0.619 ^a	1.124±0.023 ^b	3.914±0.292 ^{ab}	— — —	4.850±0.725 ^{ab}
BI-38	1.709±0.076 ^a	6.879±0.250 ^b	2.904±0.853 ^a	3.697±0.674 ^a	— — —	4.491±0.054 ^a	— — —	3.461±0.610 ^b
菌株	反亚油酸 (C _{18:2n-6t})	α-亚麻酸 (C _{18:3n-3})	γ-亚油酸 (C _{18:3n-6})	二十碳二烯酸 (C _{20:2n-6})	二十碳三烯酸 (C _{20:3n-3})	γ-花生三烯酸 (C _{20:3n-6})	花生四烯酸 (C _{20:4n-6})	二十碳五烯酸 (C _{20:5n-3})
A6	3.357±0.446 ^b	4.503±0.893 ^a	2.030±0.095 ^d	3.801±0.194 ^b	2.422±0.027 ^d	1.026±0.054 ^c	0.302±0.087 ^c	— — —
BP-1	6.366±0.693 ^a	4.039±0.587 ^a	3.625±0.071 ^a	5.651±0.489 ^a	3.205±0.018 ^a	2.459±0.094 ^a	2.230±0.172 ^a	— — —
BL-3	4.252±0.481 ^b	3.535±0.090 ^a	3.139±0.031 ^b	4.703±0.131 ^b	2.821±0.014 ^c	2.027±0.321 ^{ab}	1.204±0.060 ^b	— — —
BA-5	4.290±0.006 ^b	3.810±0.351 ^a	2.830±0.162 ^b	4.319±0.004 ^b	2.951±0.036 ^b	1.691±0.121 ^b	0.816±0.084 ^{bc}	0.142±0.074
BI-38	4.487±0.003 ^b	3.968±0.043 ^a	2.392±0.081 ^c	4.321±0.137 ^b	2.832±0.055 ^{bc}	1.431±0.116 ^{bc}	0.619±0.233 ^c	— — —
菌株	二十二碳二烯酸 (C _{22:2n-6})	ΣMCSFA	ΣLCSFA	ΣMUFA	ΣPUFA			
A6	— — —	12.720±4.025 ^a	562.252±2.595 ^b	14.477±0.447 ^d	21.930±1.856 ^c			
BP-1	8.774±0.408 ^a	11.530±0.304 ^a	754.939±4.175 ^a	30.829±1.710 ^a	41.698±2.408 ^a			
BL-3	7.649±0.130 ^b	8.909±0.329 ^a	481.472±0.249 ^c	18.551±0.971 ^{cd}	34.047±0.797 ^b			
BA-5	6.075±0.089 ^c	11.464±2.205 ^a	569.738±1.091 ^b	23.383±1.167 ^b	31.774±0.691 ^b			
BI-38	5.586±0.028 ^c	11.228±0.631 ^a	565.762±1.034 ^b	19.680±1.755 ^{bc}	28.697±0.748 ^b			

† MCSFA:短链饱和脂肪酸;LCSFA:长链饱和脂肪酸;MUFA:单不饱和脂肪酸;PUFA:多不饱和脂肪酸;同列上标字母不同表示差异显著(P<0.05);— — —表示未检测到。

LCSFA 是各菌株细胞中主要脂肪酸,其中又以 C_{16:0}、C_{18:0}、C_{24:0} 占比较大,为各菌株细胞主要脂肪酸,与 Veer-kamp^[21] 研究结果相似。SCSFA 中 C_{4:0} 含量在各组间无显著差异。MCSFA 如 C_{12:0} 与食用植物精油联用可消除食源性病原体,从而可显著提高食品的微生物安全性^[34],试验发现 C_{12:0} 在长双歧杆菌 BL-3 细胞中含量最高,且显

著高于菌株 A6、BP-1,因此,长双歧杆菌 BL-3 在提高食品安全性方面具有一定的参考价值。MUFA 在菌株 BL-3 中的总含量与 BA-5、A6、BP-1 无显著差异,但显著高于 BI-38(P<0.05)。总 PUFA 含量在各组间无显著差异。与代谢产物相比,各菌株细胞中未检测到芥酸(C_{22:1n-9})、二十四碳烯酸(C_{24:1n-14})、二十碳五烯酸(C_{20:5n-3})。另

表 3 5株双歧杆菌细胞中脂肪酸测定结果[†]
Table 3 Fatty acid composition in cells of five strains of *Bifidobacterium* $\mu\text{g}/100\ \mu\text{g}$ 菌粉

菌株	丁酸 (C _{4:0})	己酸 (C _{6:0})	辛酸 (C _{8:0})	癸酸 (C _{10:0})	十一烷酸 (C _{11:0})	月桂酸 (C _{12:0})	十三烷酸 (C _{13:0})	肉豆蔻酸 (C _{14:0})
A6	0.855±0.001 ^a	0.019±0.001 ^{ab}	0.096±0.002 ^a	0.127±0.001 ^a	0.173±0.001 ^a	0.227±0.001 ^b	0.099±0.001 ^a	0.665±0.006 ^{ab}
BP-1	0.859±0.012 ^a	0.018±0.002 ^{ab}	0.087±0.003 ^a	0.124±0.002 ^a	0.173±0.001 ^a	0.225±0.005 ^b	0.099±0.001 ^{ab}	0.658±0.077 ^{ab}
BL-3	0.782±0.051 ^a	0.024±0.002 ^a	0.098±0.006 ^a	0.138±0.008 ^a	0.173±0.001 ^a	0.250±0.008 ^a	0.099±0.001 ^{ab}	0.970±0.115 ^{ab}
BA-5	0.759±0.017 ^a	0.016±0.001 ^b	0.086±0.001 ^a	0.127±0.004 ^a	0.172±0.001 ^a	0.239±0.007 ^{ab}	0.098±0.001 ^b	0.641±0.171 ^b
BI-38	0.873±0.121 ^a	0.020±0.004 ^{ab}	0.089±0.006 ^a	0.128±0.004 ^a	0.172±0.001 ^a	0.228±0.006 ^{ab}	0.098±0.001 ^{ab}	0.481±0.027 ^{ab}
菌株	十五烷酸 (C _{15:0})	棕榈酸 (C _{16:0})	十七烷酸 (C _{17:0})	硬脂酸 (C _{18:0})	花生酸 (C _{20:0})	二十一烷酸 (C _{21:0})	二十二烷酸 (C _{22:0})	二十四烷酸 (C _{24:0})
A6	0.175±0.003 ^a	9.975±0.567 ^a	0.176±0.001 ^a	4.398±0.245 ^a	0.391±0.003 ^a	— — —	0.345±0.004 ^a	20.050±0.171 ^a
BP-1	0.167±0.002 ^a	6.517±0.694 ^{ab}	0.171±0.003 ^{ab}	2.678±0.244 ^b	0.360±0.005 ^c	— — —	0.337±0.001 ^{ab}	20.944±0.116 ^a
BL-3	0.169±0.002 ^a	9.559±0.787 ^a	0.175±0.002 ^{ab}	3.970±0.050 ^a	0.388±0.001 ^{ab}	0.190±0.001 ^a	0.343±0.002 ^a	20.922±0.041 ^a
BA-5	0.163±0.002 ^a	6.922±0.675 ^{ab}	0.170±0.002 ^{ab}	3.206±0.213 ^{ab}	0.371±0.005 ^{bc}	0.190±0.001 ^a	0.338±0.003 ^{ab}	20.274±0.841 ^a
BI-38	0.163±0.004 ^a	5.627±1.639 ^b	0.168±0.003 ^b	2.427±0.653 ^b	0.359±0.010 ^c	0.189±0.001 ^a	0.333±0.001 ^b	21.183±0.088 ^a
菌株	十五碳烯酸 (C _{15:1n-9})	棕榈油酸 (C _{16:1n-7})	十七碳烯酸 (C _{17:1n-9})	反油酸 (C _{18:1n-9t})	二十碳烯酸 (C _{20:1n-10})	芥酸 (C _{22:1n-9})	二十四碳烯酸 (C _{24:1n-14})	亚油酸 (C _{18:2n-6c})
A6	0.108±0.002 ^a	0.222±0.009 ^a	0.168±0.002 ^a	0.210±0.017 ^{ab}	— — —	— — —	— — —	0.161±0.035 ^a
BP-1	0.106±0.003 ^a	0.219±0.011 ^a	0.157±0.005 ^b	0.143±0.024 ^{ab}	— — —	— — —	— — —	0.166±0.022 ^a
BL-3	0.103±0.003 ^a	0.200±0.009 ^a	0.154±0.001 ^b	0.280±0.039 ^a	— — —	— — —	— — —	0.156±0.023 ^a
BA-5	0.107±0.002 ^a	0.343±0.028 ^a	0.150±0.001 ^b	0.168±0.119 ^{ab}	0.065±0.001	— — —	— — —	0.153±0.031 ^a
BI-38	0.104±0.001 ^a	0.233±0.011 ^a	0.156±0.002 ^b	0.036±0.017 ^b	— — —	— — —	— — —	0.172±0.012 ^a
菌株	反亚油酸 (C _{18:2n-6t})	α -亚麻酸 (C _{18:3n-3})	γ -亚麻酸 (C _{18:3n-6})	二十碳二烯酸 (C _{20:2n-6})	二十碳三烯酸 (C _{20:3n-3})	γ -花生三烯酸 (C _{20:3n-6})	花生四烯酸 (C _{20:4n-6})	二十碳五烯酸 (C _{20:5n-3})
A6	0.181±0.006 ^a	0.214±0.006 ^a	0.113±0.001 ^a	0.211±0.007 ^a	0.143±0.007 ^a	0.064±0.004 ^a	0.008±0.001 ^a	— — —
BP-1	0.175±0.003 ^a	0.210±0.003 ^a	0.118±0.006 ^a	0.212±0.001 ^a	0.148±0.002 ^a	0.058±0.006 ^{ab}	0.012±0.005 ^a	— — —
BL-3	0.187±0.001 ^a	0.217±0.002 ^a	0.115±0.001 ^a	0.211±0.006 ^a	0.134±0.002 ^a	0.051±0.001 ^b	— — —	— — —
BA-5	0.166±0.015 ^a	0.213±0.005 ^a	0.120±0.003 ^a	0.202±0.003 ^a	0.141±0.006 ^a	0.048±0.001 ^b	0.005±0.001 ^a	— — —
BI-38	0.148±0.022 ^a	0.206±0.001 ^a	0.112±0.001 ^a	0.201±0.004 ^a	0.135±0.004 ^a	0.057±0.002 ^{ab}	— — —	— — —
菌株	二十二碳二烯酸 (C _{22:2n-6})	Σ MCSFA	Σ LCSFA	Σ MUFA	Σ PUFA			
A6	0.201±0.083 ^a	0.643±0.004 ^a	36.274±0.993 ^a	0.709±0.026 ^{ab}	1.085±0.127 ^a			
BP-1	0.252±0.008 ^a	0.628±0.013 ^a	31.931±0.909 ^a	0.625±0.043 ^{ab}	1.141±0.034 ^a			
BL-3	0.247±0.005 ^a	0.683±0.024 ^a	36.786±0.917 ^{ab}	0.736±0.045 ^a	1.107±0.028 ^a			
BA-5	0.239±0.004 ^a	0.640±0.014 ^a	32.443±1.912 ^{ab}	0.734±0.095 ^a	1.085±0.034 ^a			
BI-38	0.262±0.014 ^a	0.636±0.021 ^a	31.028±2.194 ^{ab}	0.528±0.010 ^b	1.091±0.054 ^a			

[†] MCSFA:短链饱和脂肪酸;LCSFA:长链饱和脂肪酸;MUFA:单不饱和脂肪酸;PUFA:多不饱和脂肪酸;同列上标字母不同表示差异显著(P<0.05);— — —表示未检测到。

外,在各菌株细胞中,共有 11 种脂肪酸在含量上均有至少 2 组组间差异显著(P<0.05),且仅有 MUFA 在 BL-3、BA-5 中的总含量显著高于 BI-38(P<0.05)。因此,细胞之间不同双歧杆菌脂肪酸含量有一定差异,相比较于代谢产物中的脂肪酸含量,各菌株细胞内的脂肪酸含量更低,其间的差异更小。

细菌细胞内脂肪酸主要存在于细胞壁上,其脂肪酸

种类和含量比例具有细菌种属遗传稳定性,可作为鉴定细菌种类的特征标记^[35]。双歧杆菌细胞脂肪酸的构成不仅与其抗冻性有关^[36],而且还能提高其在有机发酵乳中的存活率^[37]。通常情况下,细菌的生长条件也会影响其脂肪酸的构成,所以使用完全相同的培养条件来培养生物体有时甚至更为重要^[38]。因此,要想通过分析细菌细胞脂肪酸以达到对其进行分类鉴定的目的,除了在保持

完全相同的生长条件下及参考脂肪酸种类和含量上的比例之外,还应从多角度和多方向上对其进行多元统计分析,最终才能形成更为科学的理论支撑。

3 结论

研究发现不同双歧杆菌脂肪酸含量在代谢产物之间差异较为明显,在细胞之间有一定的差异,同种不同源的双歧杆菌菌株之间(动物双歧杆菌 A6 和 BA-5)也存在着一定的脂肪酸差异,且各双歧杆菌细胞内的脂肪酸含量比代谢产物中更低,其间的差异更小。棕榈酸($C_{16:0}$)、硬脂酸($C_{18:0}$)、二十四烷酸($C_{24:0}$)为 5 株双歧杆菌代谢产物及细胞中的主要脂肪酸;各菌株代谢产物中, $C_{16:0}$ 在 5 组组间差异显著($P < 0.05$), $C_{16:0}$ 与 $C_{18:0}$ 的质量浓度比($\rho_{C_{16:0}} : \rho_{C_{18:0}}$)为 2.607~3.120、乙酸和乳酸的浓度比($C_{\text{乙酸}} : C_{\text{乳酸}}$)为 2.085~2.295。另外,与代谢产物相比,各菌株细胞中未检测出芥酸($C_{22:1n-9}$)、二十四碳烯酸($C_{24:1n-14}$)、二十碳五烯酸($C_{20:5n-3}$)。后续可对双歧杆菌脂肪酸指纹图谱的构建作进一步研究。

参考文献

- [1] LU Nong-hua, NIE Yong-zhan, XU Wen-ting, et al. The crosstalk between gut microbiota and obesity and related metabolic disorders[J]. Future Microbiology, 2016, 11(6): 825-836.
- [2] KASSAA I A. The antiviral activity of probiotic metabolites[M]. California: Springer, Cham, 2017: 84-94.
- [3] FIROZ A, HISHBAM A N, FAHAD AA, et al. Antiviral effects of probiotic metabolites on COVID-19 [J/OL]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. [2020-11-05]. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1775123>.
- [4] 附俊杰, 李丽, 刘军, 等. 丁酸梭菌及其代谢产物在食品加工中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(13): 293-298.
- [5] 吕锡斌, 何腊平, 张汝娇, 等. 双歧杆菌生理功能研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(16): 353-358.
- [6] WANG Huan, GONG Jing, WANG Wen-feng, et al. Are there any different effects of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* on intestinal sensation, barrier function and intestinal immunity in PI-IBS mouse model[J]. PloS one, 2014, 9(3): e90153.
- [7] KWAK M J, KWON S K, YOON J K, et al. Evolutionary architecture of the infant-adapted group of *Bifidobacterium* species associated with the probiotic function[J]. Systematic & Applied Microbiology, 2016, 39(7): 429-439.
- [8] 陈银基, 鞠兴荣, 周光宏. 饱和脂肪酸分类与生理功能[J]. 中国油脂, 2008(3): 35-39.
- [9] LEVIL L, WANG Z, DOUD M K, et al. Saturated fatty-acids regulate retinoic acid signaling and suppress tumorigenesis by targeting fatty-acid-binding protein 5[J]. Nature Communi-

cations, 2015, 6: 8 794.

- [10] ZHANG Rui-nan, QIN Pan, ZHANG Zheng, et al. Saturated fatty acid inhibits viral replication in chronic hepatitis B virus infection with nonalcoholic fatty liver disease by toll-like receptor 4-mediated innate immune response[J]. Hepatitis Monthly, 2015, 15(5): e27909.
- [11] 王炜, 张伟敏. 单不饱和脂肪酸的功能特性[J]. 中国食物与营养, 2005(4): 44-46.
- [12] 刘跟生, 徐贵发. 单不饱和脂肪酸对心血管的保护作用[J]. 卫生研究, 2006(3): 104-106.
- [13] LUCHTMAN D W, SONG C. Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from child-hood to old age: Findings from animal and clinical studies[J]. Neuropharmacology, 2013, 64: 550-565.
- [14] JANSSEN C I F, KILIAAN A J. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: The influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration[J]. Progress in Lipid Research, 2014, 53: 1-17.
- [15] 王萍, 张银波, 江木兰. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 中国油脂, 2008, 33(12): 42-46.
- [16] VOORHEES K J, JENSEN K R, MCALPIN C R, et al. Modified MALDI MS fatty acid profiling for bacterial identification[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2013, 48(7): 850-855.
- [17] SHIM S K, SHIN Y K, CHOI E N, et al. Analysis of cellular fatty acids in *Intestibacterium* as taxonomic markers[J]. Microbiology & Immunology, 2013, 49(4): 343-347.
- [18] INES C S, JONATHAN S, WOOSIK C, et al. Analysis of bacterial FAMES using gas chromatography-vacuum ultraviolet spectroscopy for the identification and discrimination of bacteria[J]. Talanta, 2018, 182: 536-543.
- [19] 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研究[J]. 食品科学, 2020, 41(8): 144-151.
- [20] KENTA S, KEITA N, HIROKI M, et al. Adhesion properties of a putative polymorphic fimbrial subunit protein from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* [J]. Bioscience of Microbiota, 2016, 35(1): 19-27.
- [21] VEERKAMP J H. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains [J]. Journal of Bacteriology, 1971, 108(2): 861-867.
- [22] 许强, 王郡甫, 许晓群, 等. 气相色谱法测定双歧杆菌代谢产物中乙酸和乳酸[J]. 理化检验(化学分册), 2016, 52(8): 959-961.
- [23] 徐敏, 王静, 柴子涵, 等. 海洋细菌脂肪酸的气相色谱分析[J]. 海洋科学, 2013, 37(2): 76-83.
- [24] 仲玉备, 陈历俊, 赵军英, 等. 泌乳期母乳脂肪酸变化及其多不饱和脂肪酸影响因素[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 237-243.

- [25] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验: GB 4789.34—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 9-10.
- [26] 田芬, 陈俊亮, 霍贵成. 嗜酸乳杆菌和双歧杆菌的主代谢产物分析[J]. 中国食品学报, 2013, 13(6): 220-226.
- [27] 陆春波, 毛银, 李国辉, 等. 植物乳杆菌 DY6 主要抑菌代谢物的分析和鉴定[J]. 微生物学通报, 2019, 46(9): 2 258-2 271
- [28] LEONARDO A, HISAKAZU K, HIKARU I, et al. Transcriptomic analysis of the innate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial cells: Influence of immunobiotic lactobacilli[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 57.
- [29] DONG Li, ZHONG Xiang, HE Jin-tian, et al. Supplementation of tributyrin improves the growth and intestinal digestive and barrier functions in intrauterine growth-restricted piglets[J]. *Clinical Nutrition*, 2016, 35(2): 399-407.
- [30] 岳莹雪, 王玉琦, 闫芬芬, 等. 丁酸的生产方法及在肠道中的生理功能研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(15): 339-344.
- [31] MAEKAWA S, TAKADA S, NAMBBBU H, et al. Linoleic acid improves assembly of the CII subunit and CI-III2/CIV complex of the mitochondrial oxidative phosphorylation system in heart failure[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2019, 17(1): 30-41.
- [32] MICHIEL S L, BOUDEWIJN R, NORTJE V D B, et al. Genetically determined prospect to become long-lived is associated with less abdominal fat and in particular less abdominal visceral fat in men[J]. *Age and Ageing: The Journal of the British Geriatrics Society and the British Society for Research on Ageing*, 2015, 44(4): 713-717.
- [33] YARON S, SHACHAR D, ABRAMAS L, et al. Effect of high β -palmitate content in infant formula on the intestinal microbiota of term infants[J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2013, 56(4): 376-381.
- [34] KIM S A, RHEE M S. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, β -resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Food Control*, 2016, 60: 447-454.
- [35] 刘波, 王阶平, 刘国红, 等. 芽胞杆菌脂肪酸组学[M]. 北京: 科学出版社, 2019: 1 434.
- [36] SEVERINE L, SEVERINE C R, RAPHAELLE T M, et al. Membrane fatty acid composition and fluidity are involved in the resistance to freezing of *Lactobacillus buchneri* R1102 and *Bifidobacterium longum* R0175[J]. *Microbial Biotechnology*, 2015, 8(2): 311-318.
- [37] FLORENCE A C R, OLIVEIRA M N D, DELILE A, et al. Survival of *Bifidobacterium* strains in organic fermented milk is improved as a result of membrane fatty acid composition[J]. *International Dairy Journal*, 2016, 61: 1-9.
- [38] COSTA M S, ALBUQUERQUE L, NORBE M F, et al. The identification of fatty acids in bacteria[J]. *Methods in Microbiology*, 2011, 38: 183-196.
-
- (上接第 18 页)
- [20] 吴亮亮, 罗瑞明, 孔丰, 等. 蒸煮时间对滩羊肉蒸煮损失、嫩度及水分分布的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 19-23.
- [21] WATTANCHANT S. Effect of heatment on changes in texture, structure, and properties of Thai indigenous chicken muscle[J]. *Food Chemistry*, 2005, 93: 337-348.
- [22] 韩忠, 罗曼, 唐相伟, 等. SDS-PAGE 电泳法对微波加热猪肉终点温度的鉴定及其品质特性的研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(6): 181-185, 97.
- [23] ZANONI B, PAGLIARINI E, GALLI A, et al. Shelf-life prediction of fresh blood orange juice[J]. *Journal of Food Engineering*, 2005, 70(4): 512-517.
- [24] 焦阳阳, 祝超智, 赵改名, 等. 不同牛肉部位对牛肉片品质的影响[J]. 肉类研究, 2019, 33(4): 1-6.
- [25] 甄少波, 李兴民, 邹磊, 等. 不同蒸煮温度对 CO 气调包装肉色泽稳定性和蛋白质变性程度的影响[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(12): 221-223.
- [26] 石宇, 邓力, 谢乐, 等. 西式火腿煮制过程中品质变化动力学研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(7): 45-50.
- [27] 魏心如, 韩敏义, 王鹏, 等. 热处理对鸡胸肉剪切力与蒸煮损失的影响[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(3): 629-633.
- [28] 陈洪生, 刁静静, 俞龙浩. 半干型牛肉干嫩化工艺的研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(10): 51-56.
- [29] 韦诚. 发酵过程中酸肉蛋白质的变化及其对食用品质的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2018: 8.
- [30] GARCLA-SEGOVIA P, ANDRES-BELLO A, MARTLN-EZ-MONZO J. Effect of cooking method on mechanical properties, color and structure of beef muscle (*M. pectoralis*) [J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 80(3): 813-821.
- [31] 黄明, 黄峰, 张首玉, 等. 热处理对猪肉食用品质的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 189-192.
- [32] 马纪兵, 张丽, 王妍, 等. 风干牦牛肉加工过程中水分状态变化及质构相关性分析[J]. 农业工程学报, 2018, 34(7): 294-300.
- [33] 姜秀丽, 刁小琴, 孔保华, 等. 烘干时间对牛肉干水分分布与品质变化的影响[J]. 肉类研究, 2016, 30(4): 30-34.
- [34] SERRA X, RUIZ R J, ARNAU J, et al. Texture parameters of dry-cured ham *M. biceps femoris* samples dried at different levels as a function of water activity and water content[J]. *Meat Science*, 2005, 69(2): 249-254.
- [35] 贾艳华, 杨宪时, 许钟, 等. 水分含量对软烤扇贝质构和色泽的影响[J]. 食品与机械, 2010, 26(3): 47-50.