

母乳源长双歧杆菌的筛选鉴定及耐氧驯化

Screening and identification of *Bifidobacterium longum* from maternal milk and its domestication of oxygen-domestication

张 凤^{1,2,3} 侯心悦^{1,2,3} 郭丽琼^{1,2,3} 刘春花⁴ 林俊芳^{1,2,3}

ZHANG Feng^{1,2,3} HOU Xinyue^{1,2,3} GUO Liqiong^{1,2,3} LIU Chunhua⁴ LIN Junfang^{1,2,3}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510640; 2. 华南农业大学食品生物技术研究, 广东 广州 510640; 3. 广东省微生态制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510640;

4. 南方医科大学第三附属医院, 广东 广州 510630)

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510640, China;

2. Institute of Food Biotechnology, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510640, China;

3. Research Center for Micro-Ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 4. Department of Obstetrics and Gynecology, Third Affiliated Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510630, China)

摘要:目的:从母乳中筛选双歧杆菌,并提高双歧杆菌在有氧条件下的耐受性。方法:采用稀释涂布法结合 16S rDNA 鉴定法从母乳中筛选出双歧杆菌,并采用逐渐增加氧分压和有氧厌氧交替的方法进行驯化。结果:筛选得一株 MEFZ-2201 菌株,通过 16S rDNA 测序比对,其与长双歧杆菌模式菌(NCBI 登录号:ON631733.1)的同源性达到了 100%,鉴定为长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)。将长双歧杆菌 MEFZ-2201 进行驯化后,其有氧培养最高的活菌数为 8.9×10^9 CFU/mL,比未经驯化的菌株活菌数提高了一个数量级;此外,驯化前后菌株的生理生化及形态特征并未发生变异;在短链脂肪酸的产生量上,驯化后菌株在厌氧条件下产酸量也显著高于驯化前的菌株。结论:驯化后的长双歧杆菌 MEFZ-2201 在有氧条件下的活菌数明显提高,有望成为潜在的益生菌菌株进一步开发利用。

关键词:母乳;长双歧杆菌;分离鉴定;活菌数;耐氧驯化;短链脂肪酸

Abstract: Objective: To screen *Bifidobacterium* from breast milk and improve its oxygen tolerance under aerobic conditions.

基金项目:广东省重点领域研发计划项目(编号:2022B0202050002);国家自然科学基金项目(编号:32072646,32272785)

作者简介:张凤,女,华南农业大学在读硕士研究生。

通信作者:林俊芳(1962—),男,华南农业大学研究员,博士生导师,博士。E-mail:linjf@scau.edu.cn

刘春花(1990—),女,南方医科大学第三附属医院主治医师,硕士。E-mail:838240067@qq.com

收稿日期:2022-12-28 **改回日期:**2023-06-09

Methods: Dilution and spread plate methods were performed to separate and screen *Bifidobacterium* from breast milk. Their *Bifidobacterium* identifications were characterized by 16S rDNA sequencing. The oxygen tolerant domestications were conducted through gradual increase of oxygen pressure and alternation of aerobic and anaerobic cultivations. **Results:** A novel *Bifidobacterium* strain was isolated from human milk and was identified as *Bifidobacterium longum* by 16S rDNA sequencing, which was named as MEFZ-2201. The homology between MEFZ-2201 and model strain (accession number in NCBI: ON631733.1) reached 100%. After oxygen tolerant domestication, the highest viable bacteria number of *Bifidobacterium longum* MEFZ-2201d in aerobic cultivation reached 8.9×10^9 CFU/mL, which was ten times higher than that of its wild-type strain MEFZ-2201. Whereas, the morphological property and physio-biochemical characteristics of *Bifidobacterium longum* MEFZ-2201d did not change after oxygen tolerant domestication. The short-chain fatty acid production of domesticated strain *Bifidobacterium longum* MEFZ-2201d was also significantly higher than that of its wild-type strain even under anaerobic conditions. **Conclusion:** A novel *Bifidobacterium longum* strain MEFZ-2201 was isolated from breast milk. The viable bacterium number of its domesticated strain MEFZ-2201d was significantly increased under aerobic conditions, indicating that it would be a potential probiotic strain for further development and utilization.

Keywords: breast milk; *Bifidobacterium longum*; isolation and identification; cell viability; oxygen-domestication; short-chain fatty acid

母乳作为婴儿良好的营养源泉,含有大量的可以促进婴儿健康生长的活性物质,包括蛋白质、母乳寡糖、脂类、免疫因子、激素等^[1]。母乳也是婴儿肠道有益细菌的源泉,主要包括乳酸菌属和双歧杆菌属^[2]。近年来,有关母乳益生菌研究越来越多,大量研究^[3-4]表明,母乳喂养的婴儿,其肠道中的细菌来源较多,但最早来自母乳,且母乳与婴儿肠道的细菌组成极为相似,因此,母乳源的益生菌相比其他来源更加安全可靠。研究^[5]表明,双歧杆菌具有缓解腹泻和便秘、免疫调节、抑制肿瘤形成、维持肠道微生物群平衡以及产生维生素等多种益生功能。此外,双歧杆菌能够代谢产生多种短链脂肪酸(SCFA),如乙酸、丙酸、异丁酸和丁酸等^[6],然而,双歧杆菌作为一种严格厌氧菌,本身对氧十分敏感,短时间接触氧气就会大量死亡,降低了其在生产加工和实际应用等过程中的经济价值,而对双歧杆菌进行耐氧驯化则可以良好地解决这一问题。

目前,提高双歧杆菌在有氧条件下存活率的方法有逐渐增加培养基中的氧分压^[7]、有氧厌氧交替驯化、基因工程改造^[8]和微胶囊法^[9]。相比于基因工程改造和微胶囊法,逐渐增加培养基中的氧分压、有氧厌氧交替驯化更加简单高效且成本低廉。王猛等^[10]采用逐渐增加培养基中的氧分压和有氧、厌氧条件下交替培养两种方案对动物双歧杆菌进行了耐氧驯化,最终使其在有氧条件下的活菌数达到了 6.3×10^8 CFU/mL。Kawasaki 等^[11]采用液体摇床培养法探究不同 O_2 浓度对双歧杆菌生长的影响,发现在 20% 的氧浓度下双歧杆菌依然可以良好生长。目前对长双歧杆菌的耐氧驯化研究主要集中在益生特性及生长培养条件优化等,而对驯化前后长双歧杆菌生理生化特性及短链脂肪酸变化的研究鲜有报道。研究拟从母乳中筛选出长双歧杆菌,并采用有氧厌氧交替驯化及逐渐增加氧分压这两种较为温和的驯化方式驯化长双歧杆菌使其可在有氧条件下生长且具有较高的活菌数,并探究长双歧杆菌 MEFZ-2201 耐氧驯化前后形态、活菌数及短链脂肪酸产生量的变化情况,以为长双歧杆菌 MEFZ-2201 进一步的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

MRS 培养基:牛肉膏 10 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,葡萄糖 20 g/L,无水乙酸钠 5 g/L,柠檬酸氢二铵 2 g/L,七水硫酸镁 0.2 g/L,磷酸氢二钾 2 g/L,一水合硫酸锰 0.054 g/L,吐温-80 1 g/L;

MRSC 培养基:在 MRS 培养基中加入 0.5% 的 *L*-半胱氨酸盐酸盐制得;

蛋白胨、酵母浸粉、葡萄糖、无水乙酸钠、柠檬酸氢二

铵、七水硫酸镁、磷酸氢二钾、一水合硫酸锰、吐温:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

L-半胱氨酸盐酸盐:分析纯,青岛海博生物有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

厌氧培养箱:YQX-I 型,上海跃进医疗器械厂;

PCR 仪:ETC811 型,东盛龙精密技术有限公司;

超净工作台:SW-CJ-1F 型,苏州安泰空气技术有限公司;

小型水平电泳槽:HE120 型,上海天能科技有限公司;

紫外分光光度计:UV1700PC 型,上海奥析科学仪器有限公司;

显微镜:CX41RF 型,广州知镜科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 采样人群选择 采集样品的人群均为广州地区健康女性,年龄在 25~35 周岁,无家族遗传病,无乳腺炎等疾病。

1.2.2 样品采样方法 共收集 30 份顺产母亲的母乳样品。采集处理方法参考文献^[12]。

1.2.3 菌株的分离及纯化 将 1.2.2 中保存的母乳样品各取 1 mL 用 0.9% 的无菌生理盐水进行梯度稀释。选择合适的稀释度进行涂布,取 100 μ L 涂板在含有 3% 碳酸钙的 MRS 固体培养基上(3 个平行),置于厌氧培养箱(CO_2 5%, H_2 10%,高纯 N_2 85%)中,于 37 $^{\circ}C$ 培养 48 h。挑取同时具有溶钙圈和双歧杆菌形态特征的单菌落进行划线纯化,同时纯化后的单菌落用于接触酶试验,选取显示为阴性的菌株于 MRSC 液体培养基中培养,并进行革兰氏染色,筛选出染色呈紫色并具有杆状形态特征的菌液保藏,初步保藏采用 50% 的甘油作为保护剂,于 -80 $^{\circ}C$ 冰箱中冷冻保存。

1.2.4 菌株鉴定

(1) 菌株 DNA 提取:采用美基细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA。

(2) 16S rDNA 序列扩增与分析:PCR 反应程序如表 1 所示,反应体系如表 2 所示。

表 1 Phanta PCR 反应循环参数

Table 1 Phanta PCR reaction cycle parameters

步骤	温度/ $^{\circ}C$	时间/s
预变性	95	180
变性	95	30
退火	56	30(35 个循环)
延伸	72	180
彻底延伸	72	300

表 2 Phanta PCR 反应体系
Table 2 Phanta PCR reaction system

成分	体积/ μL
2 $\times$ Phanta Max Buffer	25
dDNT Mix	1
上游引物	2
下游引物	2
Phanta Max Super-Fidelity	1
模板 DNA	2
ddH ₂ O	17

双歧杆菌上游引物 Bif164-f: GGGTGGTAATGCCGGATG; 下游引物 PbiR2: GACCATGCACCACCTGTGAA)^[13]。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,根据测序结果通过 BLAST 程序与 GenBank 基因库进行比对,得出结果。

1.2.5 扫描电镜观察长双歧杆菌菌体形态 根据文献[14],修改如下:用 1.5 mL 离心管收集长双歧杆菌菌体,在 4℃条件下 4 000 r/min 离心 10 min 后,用 2.5%戊二醛进行长双歧杆菌菌体前固定,于 4℃冰箱过夜。用 0.1 mol/L pH 7.2 PBS 漂洗 3 次,每次漂洗 10 min;然后进行长双歧杆菌菌体后固定,用 1%锇酸固定 2~3 h;1 mol/L pH 7.2 PBS 漂洗 3 次每次漂洗 10 min,之后进行梯度脱水,分别采用体积分数为 30%,50%,70%,80%,90%,100%的乙醇脱水 2 次,每次脱水 10 min。最后于-20℃冰箱干燥 30 min,冻干 4 h。离子溅射镀膜仪在样品表面镀一层 10~15 nm 金属膜。场发射扫描电镜,电压 1.0 kV,放大倍率 10 000~30 000。

1.3 长双歧杆菌的耐氧驯化

1.3.1 长双歧杆菌活化 将保存的长双歧杆菌于 MRSC 平板上厌氧培养 48 h 后,挑取单菌落于 MRSC 液体培养基中厌氧培养 24 h,并按 5%的接种量于 MRSC 液体培养基厌氧条件下进行 5 次活化,得到的活化菌液备用。

1.3.2 长双歧杆菌耐氧驯化方式 根据文献[15]修改如下:通过有氧厌氧交替培养,同时不断降低培养基中的氧分压进行驯化。将 1.3.1 中得到的活化菌液以 5%的接种量,按照如下方法于 37℃培养 24 h 进行长双歧杆菌的驯化:①接种至液深 16 cm 的 MRSC 培养基中,有氧培养;②接种至液深 16 cm 的 MRS 培养基中,有氧培养;③接种到液深 13 cm 装有 MRSC 培养基的螺口试管中,并用灭菌液体石蜡封口,厌氧培养;④接种到液深 13 cm 的 MRSC 培养基中,有氧培养;⑤接种到液深 13 cm 的 MRS 培养基中,有氧培养;⑥接种到液深 10 cm 装有 MRSC 培养基的螺口试管中,并用灭菌液体石蜡封口,厌氧培养;⑦接种到液深 10 cm 的 MRSC 培养基中,有氧

培养;⑧接种到液深 10 cm 的 MRS 培养基中,有氧培养,并连续传代 5 次。以上视为一代驯化,对第一代驯化后的菌液进行划线培养,并挑单菌落活化,重复以上操作 5 次。

1.3.3 耐氧驯化前后菌株形态学特征 耐氧驯化后的长双歧杆菌在有氧培养时观察其菌落形态,挑取长双歧杆菌的单菌落至液体培养基中进行有氧培养,参照张苓花等^[16]的方法进行革兰氏染色和镜检,观察菌体形态,并与驯化前菌落及菌株形态对比。

1.3.4 耐氧驯化前后菌株在有氧条件下活菌数的测定

将驯化前后的菌株按 2%的接种量分别接种在 MRS 培养基中 37℃有氧培养 32 h,每隔 4 h 取样,稀释涂板测定活菌数,绘制生长曲线进行对比。

1.3.5 耐氧驯化前后菌株短链脂肪酸含量的测定 分别取 1 mL 驯化前后的长双歧杆菌发酵液,12 000 $\times g$ 离心 5 min,加入 2 mL 蒸馏水、2 mL 乙醚以及 20 μL 2-乙基丁酸(0.625 mg/mL)于上清液中,涡旋振荡 10 min,于 4℃、4 000 $\times g$ 离心 20 min,取上层有机相过 0.22 μm 有机滤膜后,进行气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)检测。

色谱及质谱条件分别参考陈春^[17]和黄诗铭^[18]的方法进行。

定性定量分析:试验选用的短链脂肪酸标品共 6 种,分别为乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸。取标准品各 10 μL 和乙醚 10 μL 混合得混合标准品溶液(0.143 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$),将混合标准品配制成相应的浓度梯度,并根据不同浓度标准品的 GC-MS 检测结果绘制标准曲线,制得的回归方程及回归系数如表 3 所示。根据标准曲线计算样品中短链脂肪酸含量。

表 3 短链脂肪酸标准曲线的回归方程和回归系数

Table 3 Regression equations and regression coefficients of the standard curves of different acid species

标准品	回归方程	回归系数(R^2)
乙酸	$y=0.509\ 9x-3.821\ 5$	0.999
丙酸	$y=0.6x-0.598\ 4$	0.999
异丁酸	$y=1.055\ 7x-0.356\ 6$	0.999
丁酸	$y=1.129\ 9x-1.048\ 7$	0.999
异戊酸	$y=1.334\ 2x-0.612\ 4$	1.000
戊酸	$y=1.202\ 5x-2.360\ 2$	0.999

1.4 数据分析

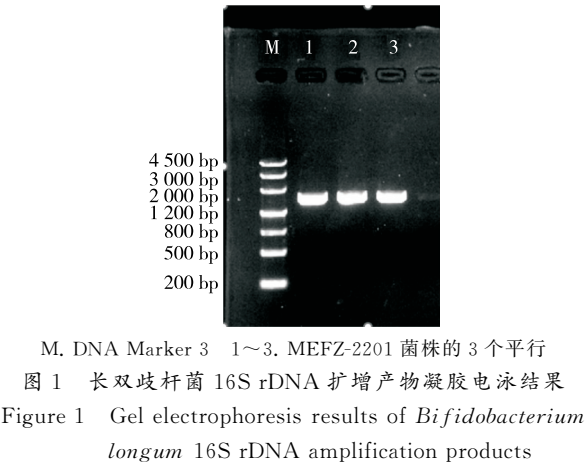
以上所有试验均重复 3 次,采用 Excel 2019 和 GraphPad Prism 8.0.1 处理数据及绘图。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

从母乳样品中分离得到 1 株 MEFZ-2201 菌株,其

16S rDNA 扩增产物在经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳之后,置于凝胶成像系统内观察可见在 1 500 bp 处有较亮的条带,并且无降解、弥散等现象,符合测序要求(图 1)。测序结果通过 NCBI 数据库进行 BLAST 同源性比对,其相似性长双歧杆菌模式菌(NCBI 登录号:ON631733.1)的同源性达到了 100%,菌株 MZFZ-2201 鉴定为长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)。



2.2 扫描电镜观察菌体形态

离株长双歧杆菌 MEFZ-2201 在场发射扫描电镜中观察结果如图 2 所示,大多数菌体呈长杆状,少数呈分叉状、单端膨大的勺状以及 L 型状等。

2.3 耐氧驯化前后菌株形态及生理生化特征比较

耐氧驯化前后的长双歧杆菌菌落形态等对比结果如表 4、图 3 所示,驯化后的菌落较驯化前小,但驯化前后的菌落均呈乳白色或者白色、表面突起、光滑、边缘完整;菌体形态特征变化如图 4 所示,驯化前的菌体呈多形态型,多为棒状杆菌,且不规则形态较多。驯化后的菌体较驯

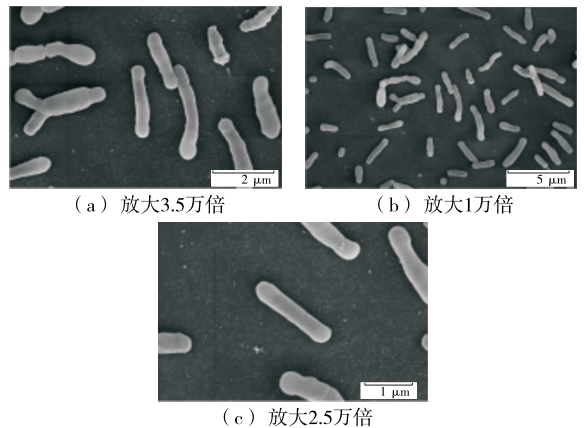


图 2 长双歧杆菌 MEFZ-2201 扫描电镜观察菌体形态

Figure 2 *Bifidobacterium longum* MEFZ-2201 scanning electron microscope observation of the morphology of the bacterium

化前相比更为规则,大多呈直杆状。对于双歧杆菌属而言,在形态学上主要分为两种形态,分叉性定义为 I 型,杆状形态为 II 型。初分离时主要为 I 型,包括 V 型、Y 型不规则形态等;经过一定的培养后,分叉状会慢慢呈现出杆状、弯杆状、棒状等向 II 型转变,且较为稳定的遗传。临床上认为, I 型向 II 型转变,是为了更好地适应环境等

表 4 耐氧驯化前后长双歧杆菌 MEFZ-2201 形态特征比较

Table 4 Comparison of morphological characteristics of *Bifidobacterium longum* MEFZ-2201 before and after oxygen tolerance domestication

生理生化特征	耐氧驯化前	耐氧驯化后
菌体	多为棒状长杆菌,菌体大多呈 Y 型、L 型和 V 型,部分呈单端膨大的不规则形状	多为棒状长杆菌,较为细长,菌体较驯化前相型,比更为规则,其余无明显变化
菌落	菌落为乳白色或白色,表面光滑、突起,边缘完整	菌落较驯化前相比较小,菌落为如乳白色或白色,表面光滑、突起、边缘完整
革兰氏染色	紫色	紫色
触酶试验	阴性	阴性

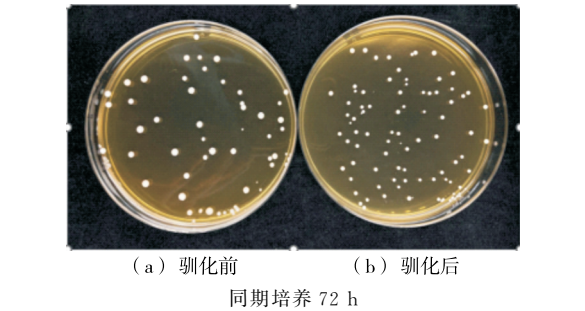


图 3 耐氧驯化前后长双歧杆菌菌落形态对比图

Figure 3 Comparison of *Bifidobacterium longum* colony morphology before and after oxygen tolerance domestication

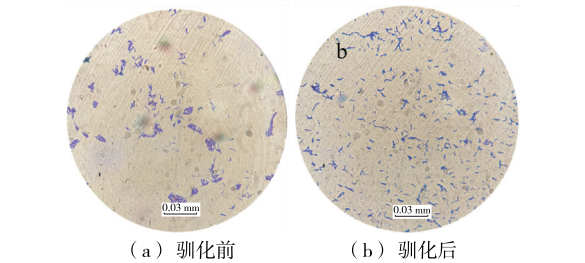


图 4 耐氧驯化前后长双歧杆菌菌体形态

Figure 4 *Bifidobacterium longum* morphology after oxygen tolerance domestication (×100)

出现的进化现象^[19]。耐氧驯化前后菌株经革兰氏染色均为紫色,接触酶试验均为阴性,通过 16S rDNA 序列比对及表 2、图 3、图 4 发现耐氧驯化前后菌株序列一致,因此菌株经过驯化后并未发生变异。

2.4 耐氧驯化前后菌株在有氧条件下活菌数对比

耐氧驯化前后的长双歧杆菌的活菌数对比结果如图 5 所示。由图 5 可以看出,耐氧驯化前后的长双歧杆菌在有氧条件下均可以生长,而驯化后的长双歧杆菌在有氧条件下的生长能力明显优于驯化前的菌株,在第 4 h 左右达到生长对数期,于第 16 h 开始稳定期,并在第 20 h 左右达到最高活菌数,为 8.9×10^9 CFU/mL;经过对比,未经驯化的菌株延滞期明显延长。对于双歧杆菌而言,与氧接触会严重抑制其生长。当双歧杆菌暴露在有氧环境中时,细胞膜的脂肪酸组分会发生改变,细胞形态变得细长,细胞表面由光滑变得粗糙,延滞期延长^[20]。未经驯化的长双歧杆菌在第 8 h 进入对数期,第 16 h 进入稳定期,并在第 24 h 左右达到最高活菌数,为 5.40×10^8 CFU/mL。

2.5 耐氧驯化前后菌株短链脂肪酸含量分析

由图 6 可以看出,长双歧杆菌可以代谢产生乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、正戊酸和异戊酸 6 种短链脂肪酸

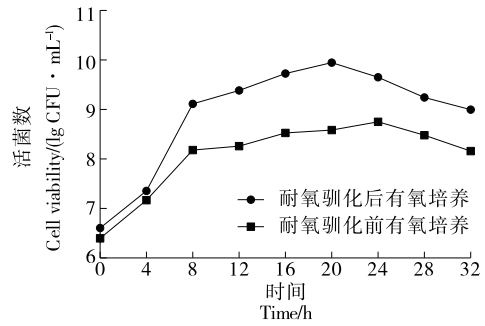
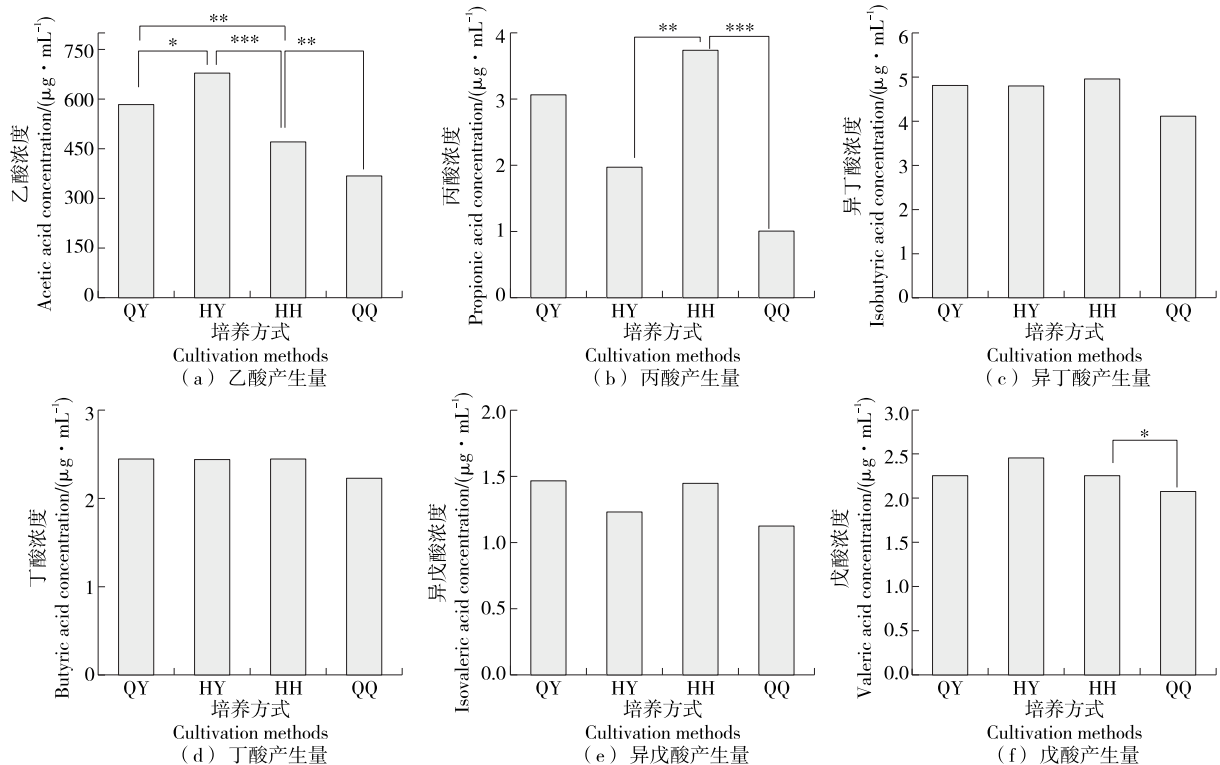


图 5 耐氧驯化前后长双歧杆菌 MEFZ-2201 的生长过程活菌数变化的比较

Figure 5 Comparison of live bacterium number between oxygen-resistant and original *Bifidobacterium longum* MEFZ-2201

(SCFA)。其中,乙酸的产生量最高,其次是异丁酸。将耐氧驯化前后的长双歧杆菌 MEFZ-2201 同时在厌氧条件下培养,在乙酸的产生量上,驯化后的菌株明显高于驯化前的菌株,而其他 5 种酸并没有显著变化。而驯化前后的菌株同时在有氧条件下培养时,未经驯化的菌株短链脂肪酸的产量均低于驯化后的菌株,其中驯化前菌株



QY, 驯化前厌氧培养;HY, 驯化后厌氧培养;HH, 驯化后有氧培养;QQ, 驯化前有氧培养;驯化前后长双歧杆菌各种有机酸含量为稀释 4 倍所得;*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$

图 6 耐氧驯化前后长双歧杆菌 MEFZ-2201 短链脂肪酸的产生量

Figure 6 Short-chain fatty acid production of *Bifidobacterium longum* MEFZ-2201 before and after oxygen tolerance domestication

丙酸产生量显著减少。有研究^[21]证明,乙酸等短链脂肪酸作为主要的抑菌物质,其作用是到达细胞质后进行解离,降低胞内的 pH 或胞内有机酸的离子积累,导致致病菌的死亡。因此,驯化后的长双歧杆菌与驯化前相比,抑菌性能可能会有所提升。

3 结论

研究通过稀释涂布法及 16S rDNA 鉴定法从母乳中筛选得到一株长双歧杆菌 MEFZ-2201,并采用逐渐增加氧分压、有氧厌氧交替驯化的方法进行驯化,驯化后的菌株较驯化前可以更好地在在有氧条件下生长,比未经驯化的菌株活菌数提高了一个数量级。通过测定驯化前后菌株的生理生化及形态特征发现菌株并未发生变异,在短链脂肪酸的产生量上驯化后菌株在厌氧条件下产酸量也显著高于驯化前的菌株,因此,耐氧驯化后的长双歧杆菌菌株较驯化前可能具有更好的性能。在今后的工作中将进一步通过全基因组测序结合生物信息学对此株菌进行安全性评估,深入研究其耐氧机制,以及相关益生菌产品的开发,以期挖掘长双歧杆菌 MEFZ-2201 的潜在价值。

参考文献

- [1] ZIMMERMANN P, CURTIS N. Factors influencing the intestinal microbiome during the first year of life [J]. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 2018, 37(12): E315-E335.
- [2] GRONLUND M M, GUEIMONDE M, LAITINEN K, et al. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease [J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 2007, 37(12): 1 764-1 772.
- [3] DAMACENO Q S, SOUZA J P, NICOLI J R, et al. Evaluation of potential probiotics isolated from human milk and colostrum [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2017, 9(4): 371-379.
- [4] KHALKHALI S, MOJGANI N. In vitro and in vivo safety analysis of *Enterococcus faecium* 2C isolated from human breast milk [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 116: 73-77.
- [5] KIM Y T, KIM C H, KWON J G, et al. In vivo Trial of *Bifidobacterium longum* revealed the complex network correlations between gut microbiota and health promotional effects [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 886934.
- [6] 文姝, 刘欣, 袁杰利, 等. 乳酸杆菌、双歧杆菌代谢产物的气相色谱分析 [J]. *中国微生物学杂志*, 2004, 16(4): 221.
- [7] 李青青. 耐氧性双歧杆菌的筛选及其生理特性与应用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010: 13-14.
- [8] LI Q Q. Studies on selection, physiological characteristics and application of an aerotolerant *Bifidobacterium* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010: 13-14.
- [8] WATTERLOT L, ROCHAT T, SOKOL H, et al. Intragastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 144(1): 35-41.
- [9] 李转羽, 宋静颐, 刘松玲, 等. 长双歧杆菌 BBMN68 菌株的耐氧驯化研究 [J]. *中国乳业*, 2015(9): 60-64.
- [10] LI Z Y, SONG J Y, LIU S L, et al. Oxytolerant domestication of *Bifidobacterium long* BBMN68 [J]. *China Dairy*, 2015(9): 60-64.
- [10] 王猛, 熊江, 张玲, 等. 动物双歧杆菌乳亚种 BZ11 的耐氧驯化及降胆固醇性能的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(3): 1-7.
- [11] WANG M, XIONG J, ZHANG L, et al. Studies on oxygen domestication and cholesterol degradation property of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BZ11 [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(3): 1-7.
- [11] KAWASAKI S, MIMURA T, SATOH T, et al. Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(10): 6 854-6 858.
- [12] SOLIS G, de LOS REYES-GAVILAN C G, FERNANDEZ N, et al. Establishment and development of lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* microbiota in breast-milk and the infant gut [J]. *Anaerobe*, 2010, 16(3): 307-310.
- [13] 郑慧娟, 白晓晔, 高旭, 等. 双歧杆菌属特异性测序引物筛选及优化 [J]. *微生物学通报*, 2019, 46(7): 1 736-1 747.
- [14] ZHENG H J, BAI X Y, GAO X, et al. Screening and optimization of *Bifidobacterium*-specific sequencing primers [J]. *Microbiology China*, 2019, 46(7): 1 736-1 747.
- [14] 关嘉琦, 梁胜男, 陈庆学, 等. 促人胎结肠上皮细胞增殖的婴儿源双歧杆菌的分离筛选及生物学性质 [J]. *食品科学*, 2021, 42(18): 86-94.
- [15] GUAN J Q, LIANG S N, CHEN Q X, et al. Screening for and biological characterization of *Bifidobacterium infantis* capable of promoting proliferation of human fetal colon epithelial cells [J]. *Food Science*, 2021, 42(18): 86-94.
- [15] 黎雁泽, 陈夏菁, 张士昂, 等. 青春双歧杆菌的耐氧驯化及不同低聚糖对其增殖效果的影响 [J]. *食品与机械*, 2019, 35(10): 227-231.
- [16] LI Y Z, CHEN X J, ZHANG S A, et al. Aerobic acclimation of *Bifidobacterium adolescentis* and the effect on its proliferation of different oligosaccharides [J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(10): 227-231.
- [16] 张苓花, 于湛, 王滨蕾, 等. 双歧杆菌厌氧培养及耐氧驯化的研究 [J]. *中国乳品工业*, 1996, 24(3): 13-15.
- [17] ZHANG L H, YU Z, WANG B L, et al. Anaerobic culture and oxytolerant training of bifidobacteria [J]. *China Dairy Industry*, 1996, 24(3): 13-15.

(下转第 26 页)

- [23] 张成江, 江艳, 陈儒嘉. 固相微萃取—气相色谱—质谱联用分析九香虫气味成分[J]. 遵义医学院学报, 2018, 41(6): 751-757.
ZHANG C J, JIANG Y, CHEN R J. Analysis on odor components of *Aspongopus chinensis* by SPME-GC-MS[J]. Journal of Zunyi Medical University, 2018, 41(6): 751-757.
- [24] 韦璐, 孙钦菊, 杨昌鹏, 等. 香蕉果醋连续固定化发酵过程中挥发性香气成分含量变化[J]. 食品与机械, 2021, 37(3): 22-28, 35.
WEI L, SUN Q J, YANG C P, et al. The change of volatile flavor substances in the processing of continuous immobilization of banana vinegar[J]. Food & Machinery, 2021, 37(3): 22-28, 35.
- [25] 李升升, 刘书杰. 冷藏对牦牛酸奶营养成分及挥发性物质的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(11): 112-117.
LI S S, LIU S J. Effect of refrigerated storage on nutritional composition and volatile substances of yak yogurt[J]. Food & Machinery, 2020, 36(11): 112-117.
- [26] 李志军, 包海鹰. 黑木耳的不同浸泡方式与其邻苯二甲酸二异丁酯含量相关性研究[J]. 菌物学报, 2018, 37(3): 389-394.
LI Z J, BAO H Y. Correlation between different soaking way and content of diisobutyl phthalate in *Auricularia heimuer* [J]. Mycosystema, 2018, 37(3): 389-394.
- [27] 单启梅, 罗瑞明, 杨波, 等. 不同贮藏期冷却滩羊肉煮制后挥发性气味物质的变化[J]. 食品科学, 2022, 43(6): 265-271.
SHAN Q M, LUO R M, YANG B, et al. Changes of volatile odor substances in chilled tan sheep meat stored for different periods and cooked[J]. Food Science, 2022, 43(6): 265-271.
- [28] 袁金梅, 罗靖, 朱琳琳, 等. 3 个桂花品种花瓣游离态和糖苷态香气成分[J]. 林业科学, 2021, 57(8): 33-42.
YUAN J M, LUO Q, ZHU L L, et al. Free and glycosylated aroma components in petals of three *Osmanthus fragrans* cultivars[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2021, 57(8): 33-42.
- [29] 王璐丰, 胡奎, 贺华良, 等. 南方水稻黑条矮缩病毒诱导的水稻挥发物及白背飞虱成虫对其组分的行为反应[J]. 昆虫学报, 2017, 60(4): 412-420.
WANG L F, HU K, HE H L, et al. Southern rice black-streaked dwarf virus-induced volatiles from rice plants and behavioral responses of adult *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae) to the components of these volatiles[J]. Acta Entomologica Sinica, 2017, 60(4): 412-420.
- [30] 庞纪伟, 殷菲彤, 刘云芬, 等. HS-SPME-GC-MS 在水果产品挥发性物质检测中的研究进展[J]. 食品与机械, 2023, 39(4): 217-224.
PANG J W, YIN F L, LIU Y F, et al. Research progress of HS-SPME-GC-MS in the detection of volatile substances in fruit products[J]. Food & Machinery, 2023, 39(4): 217-224.
- [31] 李明洁, 凌道, 李祥雨, 等. 基于气相色谱—离子迁移谱分析海鸭蛋腌制过程中蛋清挥发性风味物质的变化[J]. 食品科学, 2022, 43(18): 200-208.
LI M J, LING X, LI X Y, et al. Analysis of volatile flavor compounds in sea duck egg white during salting by gas chromatography-ion mobility spectrometry[J]. Food Science, 2022, 43(18): 200-208.
- [32] 张宜彩, 林勤保, 黄湛艳, 等. 顶空—气相色谱—质谱法结合保留指数分析食品包装用纸中挥发性气味成分[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(13): 268-273.
ZHANG Y C, LIN Q B, HUANG Z Y, et al. Determination of volatile odor compounds from food packaging paper by headspace gas chromatography-mass spectrometry coupled with retention indices[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(13): 268-273.
- [33] 郑茵. 咸蛋黄脂肪酸和挥发性成分的分析研究[D]. 广东: 华南农业大学, 2011: 40.
ZHENG Y. Analysis of fatty acids and volatile components of salted egg yolk [D]. Guangdong: South China Agricultural University, 2011: 40.
- [34] 潘柯伊, 杜方敏, 陈述文, 等. 气相离子迁移谱分析市售燕盏挥发性物质成分[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 251-255.
PAN K Y, DU F M, CHEN S W, et al. Analysis of volatile substances in bird's nest by GC-IMS technique[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 251-255.

(上接第 18 页)

- [17] 陈春. 桑葚多糖的结构鉴定、活性评价及其体外消化降解[D]. 广州: 华南理工大学, 2018: 78-80.
CHEN C. Structural identification, biological activities evaluation, digestion and fermentation in vitro of polysaccharides from *Fructus mori*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018: 78-80.
- [18] 黄诗铭. 龙须菜多糖调节脂质代谢及肠道菌群功效研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019: 29-31.
HUANG S M. Regulating lipid metabolism effect and modulation on intestinal microfloras of polysaccharide extracted from *Gracilaria lemaneiformis*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019: 29-31.
- [19] 胥振国, 蔡玉华, 刘修树, 等. 双歧杆菌研究进展及应用前景[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(2): 215-220.
XU Z G, CAI Y H, LIU X S, et al. Research progress and application prospect of *bifidobacterium* [J]. Chinese Journal of Biologics, 2017, 30(2): 215-220.
- [20] AHN J B, HWANG H J, PARK J H. Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 11: 443-451.
- [21] 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.
TIAN F, CHEN J L, HUO G C. Analysis of the main metabolites of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(6): 220-226.