

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(2): 210-216; 4 February 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

蒙古族儿童源益生特性双歧杆菌的筛选及鉴定

高鹏飞², 孙志宏¹, 麻士卫², 王秋实², 高杰², 邓承远², 张和平^{1*}

(¹ 内蒙古农业大学, 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 呼和浩特 010018)

(² 内蒙古轻工科学研究所, 呼和浩特 010050)

摘要 【目的】双歧杆菌在人和动物胃肠道中发挥着重要的生理作用, 然而双歧杆菌能否耐受胃酸、肠液及胆汁酸是影响活菌制剂益生效果的关键因素, 本研究旨在从蒙古族儿童粪便中分离筛选出具有良好益生特性的双歧杆菌。【方法】本文采用双歧杆菌选择性培养基对样品进行分离纯化, 并对菌株进行生理生化鉴定, 以耐受人工胃液、耐受牛胆盐为手段对各菌株的益生特性进行评价, 并且对 *B. animalis* V9 进行了 16S rDNA 分子生物学鉴定。【结果】本文从 12 位健康蒙古族儿童粪便中分离得到 11 株双歧杆菌, 经传统生理生化试验鉴定为 5 株 *B. adolescentis*: A1、H3、G4、A8、V10; 3 株 *B. longum*: C6、C7、D11; 1 株 *B. pseudocatenulatum*: B2; 1 株 *B. bifidum*: G5; 1 株 *B. animalis*: V9。 *B. animalis* V9 具有较强的耐酸性, 在 pH2.0 的人工胃液中厌氧培养 3 h 后存活率为 92.4%, 而其它 10 株双歧杆菌在此条件下的存活率均小于 31.25%; *B. animalis* V9 在 pH2.0 的人工胃液中厌氧培养 3 h 后接入 pH8.0 的人工肠液中消化 8 h, 存活率为 99.7%, 并且可以耐受 0.3% 的牛胆盐。进一步对 V9 菌株进行 16S rDNA 分子生物学鉴定, 发现与 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactic* BB12 的同源性为 99%。【结论】本研究结果显示 *B. animalis* V9 来源安全, 并且具有良好耐酸、耐胆盐益生特性, 有望在乳制品及保健类产品中得到广泛的应用。

关键词: 双歧杆菌; 分离; 益生特性; *B. animalis* V9

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)02-0210-07

双歧杆菌是自然栖居在人体肠道中的有益菌株, 在成人肠道中约占到肠道总菌数的 3% ~ 10%, 而在婴儿肠道中这一比例超过 91%^[1], 双歧杆菌在肠道内的数量是评价机体健康程度的重要指标^[2], 其主要作用在于可抑制有害菌群、维持肠道菌群平衡、保护肠粘膜屏障、代谢产生有机酸、促进肠道蠕动、腹泻便秘双重调节^[3]。作为益生产品要求菌株必须通过胃肠道后仍然能有足够数量的活菌存在(约 10⁶ ~ 10⁷ CFU/g), 这也为评价潜在益生特性的菌株提供了标尺^[1]。

本文从健康蒙古族儿童粪便中分离得到 11 株

双歧杆菌, 经生理生化试验鉴定并以耐受人工胃液和胆汁盐情况为评价指标来评价其益生特性, 其中 *B. animalis* V9 各项益生特性较为突出, 进一步通过分子生物学手段 16S rDNA 对 *B. animalis* V9 进行鉴定, 发现该菌株与 *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactic* BB12 的同源性为 99%, 有望在乳制品及微生态类产品中得到广泛应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 12 名健康蒙古族儿童, 男性 7 名、

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863 计划”(2007AA10Z353)

* 通信作者。Tel: +86-471-4319940; Fax: +86-471-4305357; E-mail: zhepingdd@vip.sina.com

作者简介: 高鹏飞(1981-), 男, 内蒙古包头人, 工学硕士, 主要从事乳品微生物和发酵工程研究。E-mail: gaopengfei234@163.com

收稿日期: 2008-09-24; 修回日期: 2008-10-20

女性5名,年龄为3~6岁,均无胃肠病史,采样前两周内未服用过任何抗菌类药物。

1.1.2 主要试剂和仪器:胃蛋白酶(pepsin, sigma);胰蛋白酶(Trypsin, sigma);牛胆盐(北京双旋微生物培养基制品厂);厌氧罐(BBL Gas park);OLYMPUS BX50型光学显微镜及OLYMPUS PM-20型摄像系统;HITACHI U-2000型紫外可见分光光度计;Eppendorf TGL-168高速台式离心机;PTC-200梯度PCR扩增仪;ABI 3730测序仪。

1.2 样品的采集与保存

用无菌玻璃棒挑取自然排出的新鲜粪便5~10g,置入无菌平皿中,迅速放入厌氧罐中,带回实验室进行分离。

1.3 稀释液 PBS 和双歧杆菌选择性培养基的配制

稀释液 PBS:磷酸氢二钠 6g,磷酸二氢钾 4.5g,吐温-80 0.5g, L-cys-HCl 0.5g,蒸馏水 1000 mL, pH 自然, 121℃ 15 min 灭菌备用。

选择性 TPY 培养基:TPY 培养基 + 2g/L LiCl + 1.5% 琼脂粉

1.4 供试菌液的配制

将各菌株用 TPY 传代培养 2 次,选取生长至稳定期的菌体离心(3000 × g, 7 min 4℃)收集,用 1.3 所述 PBS 洗涤 2 次^[4-5],重新悬浮于 10 mL PBS 中,然后用灭菌 PBS 梯度稀释至一定倍数,采用 TPY 琼脂培养基平板倾注法(下同),37℃ 培养 48 h 后计菌落总数,同时测定相应稀释度菌体在 600 nm 处 OD 值,制作 OD 值与所对应的近似菌落数(CFU/mL)的线性关系曲线。

根据上述各稀释度 OD 值与所对应的近似菌落数(CFU/mL)的线性关系^[6],通过调整各菌体在 600 nm 处的 OD 值,使各供试菌体最终浓度为 5×10^8 CFU/mL^[7]。

1.5 人工胃肠液和含胆盐培养基的配制

具体方法参照 Charteris、Usman 等提供的方法^[8-9]。

1.6 菌株的分离纯化与保存^[10-12]

取厌氧冻存的样品 3 g 加入有玻璃珠的三角瓶中,加入 30 mL PBS 稀释液摇床振荡(250 r/min) 15 min,然后吸取 1 mL 便液加入一支装有 9 mL PBS 稀释液的试管中,漩涡混匀,作为 10^{-2} 稀释液,同样方法稀释至 10^{-4} 。

取在厌氧罐中充分预厌氧的 TPY 固体平板,将粪便原液、 10^{-2} 稀释液、 10^{-3} 稀释液、 10^{-4} 稀释液各取 0.1 mL,均匀涂布平板,置厌氧罐中 37℃ 厌氧培

养 24 h(先抽真空至 -0.05 MPa,然后充氮气至 0.02 MPa,重复 2 次,最后通入 0.02 MPa 的混合气体(N₂ 80%, H₂ 10%, CO₂ 10%))。

在选择性 TPY 培养基上,双歧杆菌的菌落特征较为典型,易与其它菌落区分开来。双歧杆菌的菌落一般为光滑,凸圆,边缘完整,颜色呈乳褐色或乳白色,菌落直径在 0.6 mm ~ 1.8 mm 之间,具有这些形态特征的菌落被认为是双歧杆菌可疑菌落,通过进一步分离纯化得到双歧杆菌纯菌株。

将双歧杆菌纯菌株扩培后用 PBS 离心洗涤 2 遍后,悬于保护剂(12% 脱脂乳 + 0.1% 谷氨酸钠)中,真空冷冻干燥 -18℃ 保存。

1.7 生理生化鉴定

具体方法参照文献^[15]。

1.8 耐受人工胃肠液和胆盐试验^[9]

取 1.0 mL 各供试菌液加入到 9.0 mL 人工胃液(pH 2.0、2.5、3.0)中,37℃ 厌氧消化 3 h 后分别取样,用平板计数法测定活菌数并计算存活率。同时,吸取 1.0 mL 消化 3 h 后的 pH 2.0 的人工含菌胃液,加入到 9.0 mL 人工胰液中,继续于 37℃ 厌氧培养,分别于 0、2、4、8 h 取样用 TPY 平板计数法测定活菌数并计算存活率。

以 1% 接种量将各供试菌液接种至含胆盐(0.2%、0.3%、0.5%、0.8%、1.0%, W/V)和不含胆盐的 TPY 液体中,37℃ 厌氧培养,不定时取样测定吸光值 OD₆₂₀,直到吸光值增加至 0.3 个单位停止培养,记录各菌株在含胆盐和不含胆盐的 TPY 培养基中生长时 OD 值增加 0.3 个单位所需的时间,以含胆盐组与不含胆盐组 OD 值增加 0.3 个单位所需的时间之差(LT 延迟时间)来判断菌株对胆盐的耐受性。

1.9 菌株存活率计算

$$\text{菌株存活率}(\%) = \frac{\log \text{cfu} N_1}{\log \text{cfu} N_0} \times 100\%$$

N_1 —菌株处理后活菌数; N_0 —菌株初始活菌数。

1.10 分子生物学 16S rDNA 鉴定方法

用冻融-CTAB 法提取菌株基因组 DNA^[13]。16S rDNA 扩增引物采用通用引物^[13],即 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1541R(5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')。扩增产物经 ABI 3730 测序仪测序,并用 MEGA 4.0 软件构建该菌株的系统发育树。

1.11 数据统计分析

试验数据采用 SAS 8.02 ANOVA 程序处理。

2 结果

2.1 分离至蒙古族儿童粪便中的双歧杆菌的鉴定结果

由 12 名健康蒙古族儿童粪便中分离得到 11 株双歧杆菌,对其进行生理生化试验和糖发酵试验。

对照菌株为:*Lactobacillus dellbrueckii* subsp. bulgaricus ATCC 1.2278 (同表 1 中的 BZ1) 及 *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 (同表 1 中的 BZ2),由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供,实验结果如表 1 所示。

表 1 分离自蒙古族儿童粪便中双歧杆菌生理生化实验结果

Table 1 The physiological biochemical test result of *Bifidobacterium* isolated from droppings of healthy Mongolian children

Test items	<i>Bifidobacterium</i>											Control strain	
	A1	B2	H3	G4	G5	C6	C7	A8	V9	V10	D11	BZ1	BZ2
Gram staining	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spore	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aerobic growth	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Anaerobic growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F6PPK	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Arabinose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+	d	-	-
Ribose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	d	+	+	d	-	d	d	d	+	d	d	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	d	+	d	d	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Cellobiose	+	d	+	+	-	+	+	+	d	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	d	d	d	d	-	d	d	d	d	d	d	+	-
Melibiose	+	+	+	+	d	+	+	+	+	d	+	+	-
Raffinose	+	+	+	+	-	+	+	d	+	+	+	+	-
Melezitose	+	-	+	+	-	+	+	+	d	+	+	-	-
Starch	+	+	+	+	-	d	d	+	+	+	-	+	-
Inulin	d	-	d	d	-	-	-	d	-	d	-	+	-
Mannitol	d	-	d	d	-	-	-	d	-	d	-	-	-
Sorbitol	d	d	d	d	-	-	-	d	-	d	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	-	d	d	+	+	d	+	+	-
Salicin	+	+	+	+	-	d	d	+	+	+	d	+	-
Sod - Glu	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-

" + " : Positive, " d " : Weak positive, " - " : Negative.

根据表 1 试验结果,参照文献[15],得到 5 株 *B. adolescentis* :A1、H3、G4、A8、V10 ;3 株 *B. longum* : C6、C7、D11 ;1 株 *B. pseudocatenatum* :B2 ;1 株 *B. bifidum* : G5 ;1 株 *B. animalis* : V9。BZ1 为 *Lactobacillus dellbrueckii* subsp. bulgaricus, BZ2 为 *Lactobacillus. Acidophilus*。

2.2 11 株双歧杆菌的生长特性比较

如图 1 所示,各菌株在 TPY 液体培养基中生长曲线变化基本相同,但菌体达到的最大 OD 值有明显的差异。16 h 前为对数生长期,16 h 后开始进入生长稳定期,一直持续至 24 h。*B. adolescentis* A1

在稳定期时的 OD 值最小(1.36),而 *B. adolescentis* H3 在稳定期达到的 OD 值最大(2.12),其它各菌株在稳定期 OD 值差异不大。

以下实验以此生长曲线为依据,将各菌株在 TPY 液体培养基中厌氧培养 18 h 的菌体做为供试菌,根据 OD 值与所对应的近似菌落数(CFU/mL)的线性关系(略),通过调整各菌体在 600 nm 处的 OD 值,使各供试菌体以 5×10^8 CFU/mL 的接种量接入人工胃液中。

2.3 11 株双歧杆菌的人工胃液耐受性筛选试验结果
将供试菌株接入 H2O、2.5、3.0 人工胃液中,

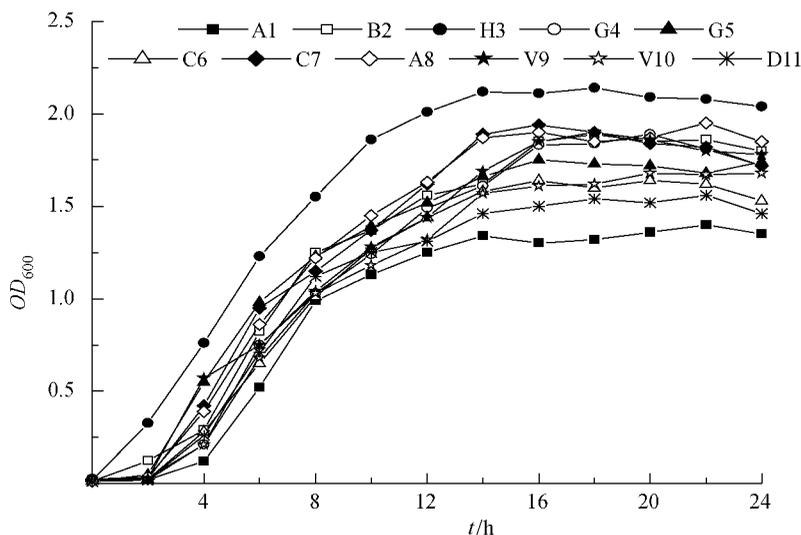


图1 各菌株在 37°C 条件下生长曲线

Fig.1 The growth curve of 11 strains at 37°C.

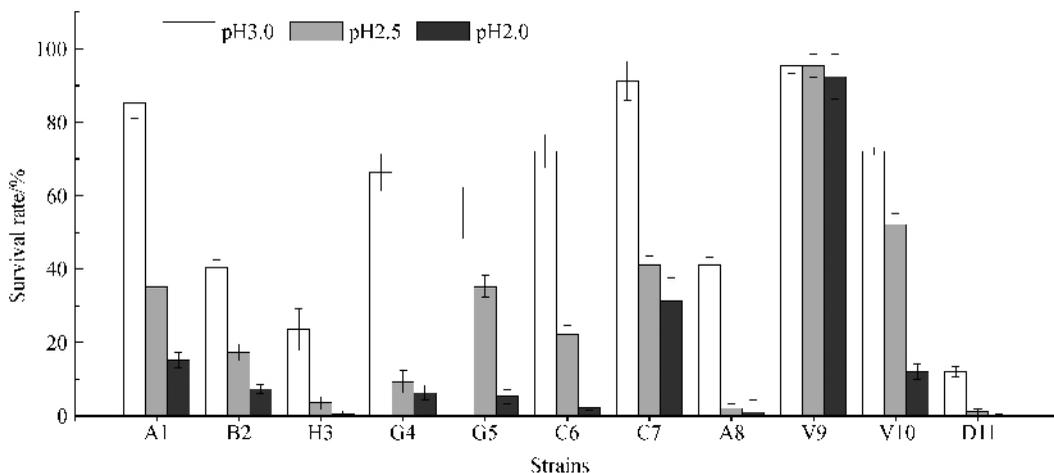


图2 供试菌株在 pH2.0、2.5、3.0 人工胃液中 37°C 厌氧保温 3 h 后存活率变化情况

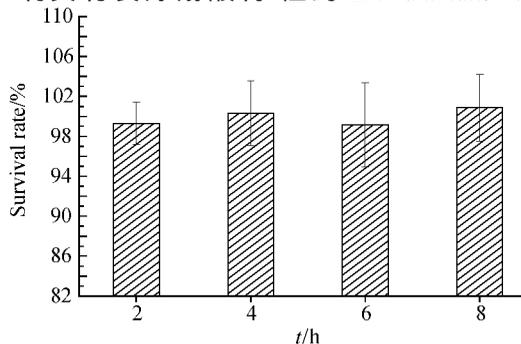
Fig.2 Survival rate of the strains tested anaerobic cultured at 37°C for 3 h in artificial gastric juice at pH2.0, 2.5 and 3.0.

37°C 厌氧培养 3 h 对其进行活菌计数, 并计算存活率, 结果见图 2。

由图 2 可以看出, 不同菌株在不同 pH 的人工胃液中耐受性有显著差异 ($p < 0.01$)。菌株对人工胃液耐受性随 pH 降低而降低, 其中 *B. animalis* V9 对人工胃液耐受性最强, 在 pH2.0 人工胃液中 37°C 厌氧保温 3 h 后存活率达到 92.4%, 而其它 10 株双歧杆菌在此条件下的存活率均小于 31.25%, 其中 *B. adolescentis* H3、*B. adolescentis* A8 和 *B. longum* D11 的存活率均未超过 1%, 说明这 10 株菌对模拟胃液特别敏感, 没有进一步筛选的价值, 所以仅选择具有良好耐酸特性的 *B. animalis* V9 作为进一步试验的对象。

2.4 *B. animalis* V9 对 pH8.0 人工肠液的耐受结果

将具有良好耐酸特性的 *B. animalis* V9 在

图3 *B. animalis* V9 在 pH8.0 的人工肠液中 37°C 厌氧培养的存活情况Fig.3 Survival rate of *B. animalis* V9 anaerobic cultured at 37°C in artificial intestinal juice at pH8.0.

pH2.0的人工胃液中厌氧消化3 h后,接入pH8.0的人工肠液中继续37℃厌氧保温消化,分别在不同时间取样计数并计算其存活率,结果如图3。

由图3可以看出,*B. animalis* V9在pH8.0的人工肠液中37℃厌氧保温8 h后,活菌数与存活率均无明显差异($p < 0.05$),该菌株具有良好的耐受肠液特性。

2.4 *B. animalis* V9对 不同浓度牛胆盐的耐受结果

由图4数据分析得知,结果按照Chateau等提出的方案进行分析,该方案根据LT将耐受胆盐的菌

株分为4组(1)对胆盐不敏感 $LT \leq 15 \text{ min}$ (2)可耐受胆盐 $15 < LT \leq 40 \text{ min}$ (3)轻微耐受胆盐 $40 < LT \leq 60 \text{ min}$ (4)对胆盐敏感 $LT > 60 \text{ min}$)^[4]。*B. animalis* V9在含有不同牛胆盐浓度的TPY培养基中耐受情况有显著差异($p < 0.01$)。与对照组相比,添加0.3%的胆盐组延迟时间LT为15 min,添加0.5%的胆盐组延迟时间LT陡然增加至17.01 h,添加0.8%、1.0%的胆盐组在24 h内OD值均未增加0.3个单位,说明*B. animalis* V9对0.3%的牛胆盐浓度不敏感。

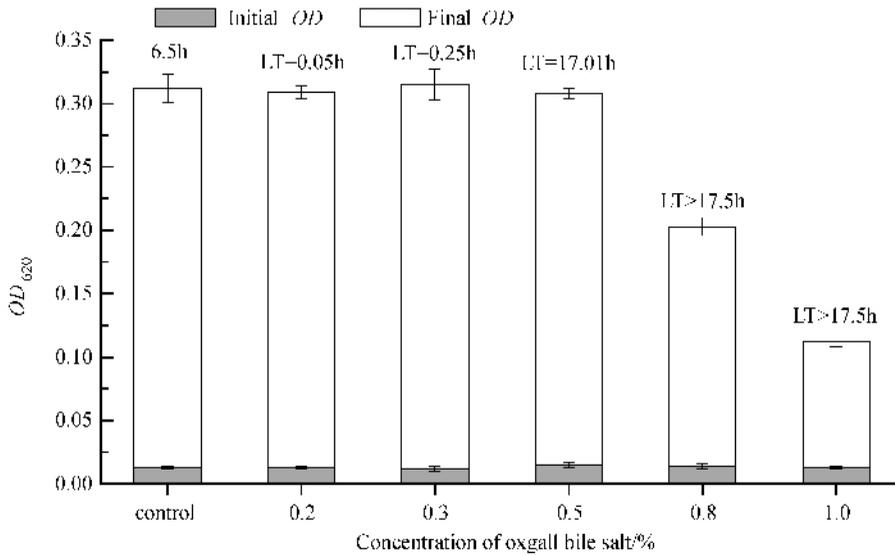


图4 *B. animalis* V9在不同牛胆盐浓度下OD值增加0.3个单位所需要的时间

Fig.4 Times needed that the OD of *B. animalis* increased 0.3 units in different concentration of oxgall bile salt.

2.5 *B. animalis* V9 16S rDNA 鉴定结果

采用分子生物学手段16S rDNA对*B. animalis* V9进行鉴定,通过PCR产物直接测序,获得长度为1433 bp的16S rDNA序列。通过NCBI BLAST比对分析,发现与*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactic*模式菌株DSM 10140和益生菌株BB12的同源性为99%。运用专业软件Mege 4.0构建*Bifidobacterium*属内31个种以及BB12和V9的系统发育树,如图5所示。

综上,*B. animalis* V9进一步鉴定为*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactic*,这与前期所做的生理生化试验结果是一致的。

3 结论

本文从12位健康蒙古族儿童粪便中分离得到11株双歧杆菌,经生理生化试验鉴定,得到5株*B. adolescentis*:A1、H3、G4、A8、V10;3株*B. longum*:C6、

C7、D11;1株*B. pseudocatenlatum*:B2;1株*B. bifidum*:G5;1株*B. animalis*:V9。其中*B. animalis* V9具有较强的人工胃肠液和胆盐耐受性。通过分子生物学手段鉴定,*B. animalis* V9为一株*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactic*。本研究证实*B. animalis* V9具有良好的益生潜力,对该益生菌制剂的开发需要深入研究。

在国内益生菌的研究和应用方面,存在一些亟待解决的问题:一是目前成功应用于发酵乳制品生产的益生菌大都来自于国外,如法国的罗地亚公司,丹麦的汉森公司,荷兰DSM公司等,国内具有自主知识产权且研究较系统的益生菌几乎没有;二是缺乏对益生菌筛选、功能特性以及安全性方面的机理研究,这是导致我国益生菌乳制品开发和推广应用落后于国外的关键所在。因此,研究和开发来源于健康中国人肠道、有相当的益生功能特性和对人体的健康有疗效作用,同时又具有安全性,能成功地应

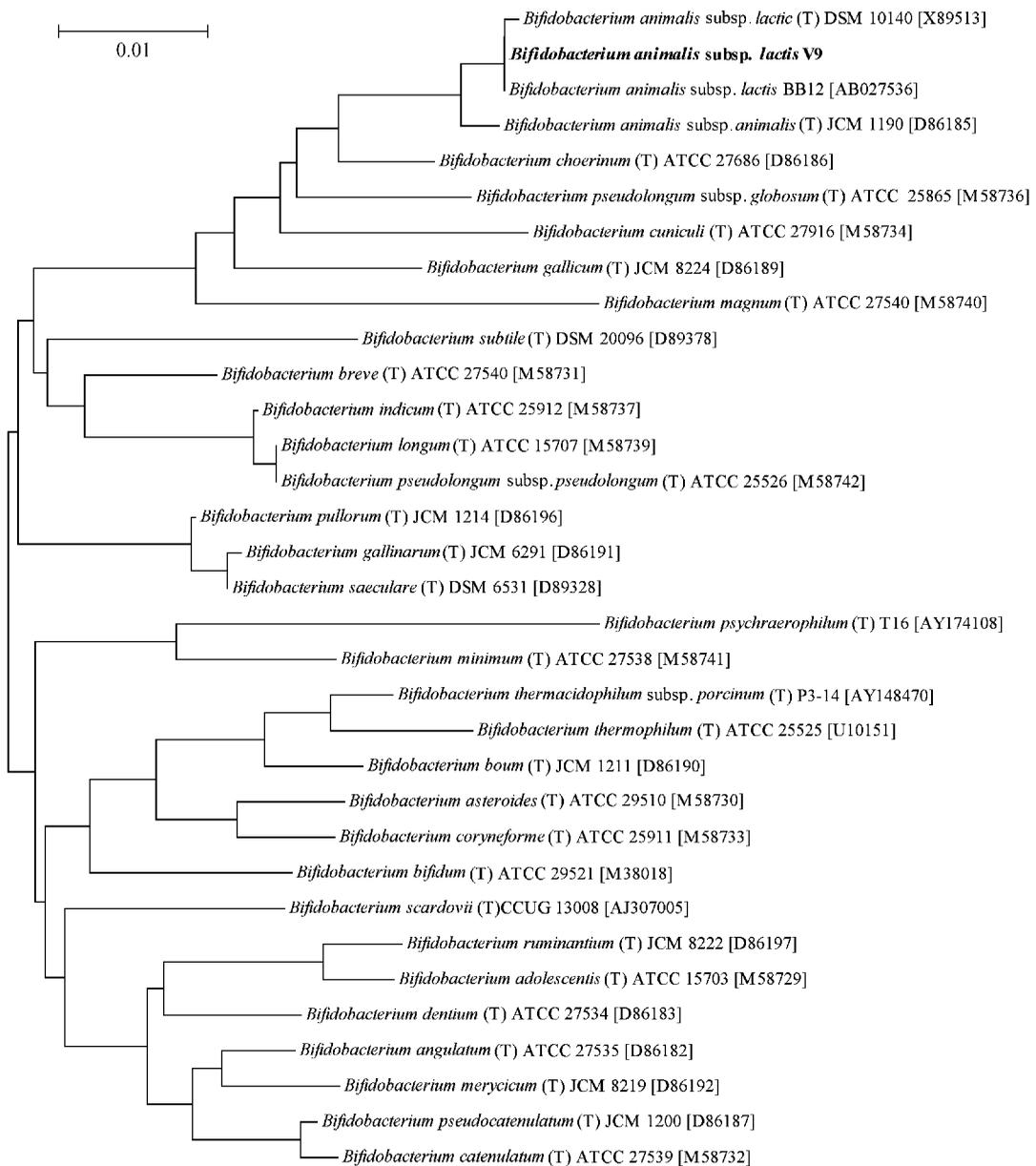


图5 *Bifidobacterium* 属 16S rDNA 系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences of *Bifidobacterium* genera, "T" represents the type strain.

用于乳制品及保健食品生产的、拥有自主知识产权的益生菌菌株已势在必行。

参考文献

- [1] M. Carmen Collado, Yolanda Sanz. Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability. *Journal of Microbiological Methods* 2006, 66(7) 560 – 563.
- [2] Apostolou E, Pelto L. Differences in the gut bacterial flora of healthy and milk-hypersensitive adults, as measured by fluorescence in situ hybridization. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2001 30 : 217 – 221.

- [3] 金红芝, 范小兵, 杭晓敏, 等. 儿童肠道双歧杆菌和乳酸杆菌种群结构分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2005, 45(4) 567 – 570.
- [4] Jaya Prasad, Harsharanjit. Selection and Characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains for Use as Probiotics. *Dairy Journal* ,1998, 993 – 1002.
- [5] Lefteris Makra. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*, 2006, 157 : 241 – 247.

- [6] Sumangala Gokavi. Oat-based symbiotic beverage fermented by *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *casei*, and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Science* 2005, 70(4) 216 – 223.
- [7] EM Tuomola. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1999, 138 (26): 137 – 142.
- [8] WP Charteris. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 84 :759 – 768.
- [9] Usman A, Hosono. Bile Tolerance, Taurocholate Deconjugation, and Binding of Cholesterol by *Lactobacillus gasseri* Strains. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82 :243 – 248.
- [10] Sullivan DJO. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Agric Food Chem*, 2001, 49(1):1751 – 1760.
- [11] Lorella Bevilacqua. Screening of *Bifidobacterium* strains isolated from human faeces for antagonistic activities against potentially bacterial. *Pathogens Microbiol Reserch*, 2003, 158 :179 – 185.
- [12] 王勇. 双歧杆菌的选择计数培养基. 国外医学临床生物化学与检验学分册(*Foreign Medical Sciences(Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Foreign Medical Sciences)*), 2005, 26(12) 899 – 900.
- [13] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [14] Chateau, N, Deschamps, AM, Hadj Sassi, A. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Letters in Applied Microbiology*, 1994, 18 :42 – 44.
- [15] RE Buchanan, NE Gibbons. 伯杰氏细菌鉴定手册, 洪俊华译. 北京: 科学出版社, 1986.

Screening and identification of probiotic *bifidobacterium* from Mongolian children

Pengfei Gao², Zhihong Sun¹, Shiwei Ma², Qiushi Wang², Jie Gao², Cengyuan Deng², Heping Zhang^{1*}

(¹ Key Lab of Dairy Biotechnology and Bioengineer, Education Ministry of China, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

(² Inner Mongolia Light Industrial Institute of Research, Huhhot 010050, China)

Abstract [Objective] *Bifidobacterium* has important physiological activity in gastrointestinal tract of human and animals, and the tolerability of acid, intestinal juice and oxgall bile salt are the key factors that influence the function of living bacteria preparation. In this study, feces of 12 healthy Mongolian children were selected to isolate *Bifidobacterium* with probiotic properties. [**Methods**] *Bifidobacterium* was isolated from feces by selective medium and identified by physiological biochemical test. The tolerability of acid, intestinal juice and oxgall bile salt of 11 *Bifidobacteria* were studied and *B. animalis* V9 was identified further by molecular biological approach 16S rDNA. [**Results**] Eleven *Bifidobacteria* isolated from feces of 12 healthy Mongolian children were identified as *B. adolescentis* (A1, H3, G4, A8 and V10), *B. longum* (C6, C7 and D11), *B. pseudocatenatum* (B2), *B. bifidum* (G5), *B. animalis* (V9). *B. animalis* V9 had the best acid tolerance with the survival rate 92.4% in artificial gastric juice at pH2.0 for 3h, whereas others had lower than 31.25%. *B. animalis* V9 also had good survival rate (99.7%) in artificial intestinal juice at pH8.0 for 8h after anaerobic cultured 3h in artificial gastric juice at pH2.0, and tolerated oxgall bile salt at concentration of 0.3%. *B. animalis* V9 was identified further by molecular biological approach 16S rDNA and result showed the homologies of *B. animalis* V9 was 99% with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactic* BB12. [**Conclusion**] *B. animalis* V9 had good probiotic properties to be potentially used in dairy products and health products.

Keywords : *Bifidobacterium*; screening; probiotic; *B. animalis* V9

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA10Z353)

*Corresponding author. Tel : + 86-471-4319940 ; Fax : + 86-471-4300122 ; E-mail : hepingdd@vip.sina.com

Received : 24 September 2008 / Revised : 21 October 2008