

低 pH 处理对两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 黏附能力的影响

王彦 孟祥晨* 王丽群 李馨

(东北农业大学 乳品科学教育部重点试验室 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 【目的】确定低 pH 处理对两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 黏附能力及其表面物理化学性质的影响。【方法】将两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 菌体在不同低 pH 的 PBS 溶液中处理一定时间后,采用平板菌落计数法和直接镜检法,测定其经历不同 pH 的酸性环境后的黏附能力,及其表面疏水性和自动聚集能力。【结果】不同 pH 的 PBS 溶液处理后的双歧杆菌菌体,其黏附能力均不同程度下降,除 pH 5.0 的处理组外,其余处理组均显著低于空白组。此外,经不同 pH 的 PBS 溶液处理后,仅 pH 3.0 和 3.5 的两处理组,双歧杆菌表面疏水性显著提高。除 pH 1.0、1.5 和 5.0 的处理组外,其余处理组的自动聚集能力均显著下降。【结论】低 pH 的酸性环境会降低两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 的黏附能力,并且双歧杆菌的自动聚集能力和表面疏水性也发生相应变化。除 pH 3.0 和 3.5 的处理组外,三者之间呈现一定的正相关性。

关键词: 两歧双歧杆菌, 黏附, pH, 疏水性, 自动聚集能力

Influence of low pH on the adhesion ability of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603

WANG Yan MENG Xiang-Chen* WANG Li-Qun LI Xin

(Key Laboratory of Dairy Science (Ministry of Education), Northeast Agricultural University,
Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] The influence of low pH on the adhesion ability and the surface prop-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31171719); 东北农业大学创新团队项目(No. CXT007-2-2)

*通讯作者: Tel: 86-451-55191813; 信箱: xchmeng@163.com

收稿日期: 2011-10-17; 接受日期: 2011-12-06

erties of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 were determined in this paper. **[Methods]** After *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 was treated by PBS of different low pH, the adhesion ability was assayed by gram staining microscopic examination and plate colony counting method. The autoaggregation ability and surface hydrophobicity of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 were also assayed. **[Results]** The adhesion abilities of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 treated by PBS with different low pH were decreased. The adhesion abilities of treatment groups were significantly lower than control group except the group of pH 5.0. The surface hydrophobicity of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 treated by PBS of pH 3.0 and 3.5 was significantly increased. Except for experimental groups of pH 1.0, 1.5 and 5.0, the autoaggregation ability of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 was significantly reduced. **[Conclusion]** The adhesion ability of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 was reduced in the low pH environment. The autoaggregation ability and surface hydrophobicity of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 were also affected. The adhesion ability was positive correlation with the autoaggregation ability and surface hydrophobicity excluding the groups of the pH 3.0 and 3.5 for *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, Adhesion, pH, Hydrophobicity, Autoaggregation

双歧杆菌是人和动物肠道最常见的革兰氏阳性有益细菌, 约占人体肠道可培养微生物的10%。双歧杆菌属的微生物是应用较多的益生菌之一, 在食品中通常通过添加于乳制品进行食用消费。研究表明, 双歧杆菌可以通过平衡肠道菌群维持机体的整体健康水平。双歧杆菌经食用进入体内, 发挥益生功能的先决条件是其肠道的黏附与定植, 例如黏附能够缩短痢疾持续时间^[1], 刺激免疫应答^[2-3], 竞争排斥病原微生物^[4]等, 因此, 黏附肠道能力是筛选益生菌的一个重要标准。

双歧杆菌被摄食后, 在未到达肠道前会经历胃的酸性环境, 而人体胃液的酸度很强, 通常的pH为3.0, 空腹或食用酸性食品时可达1.5, 食用碱性食物时可达4.0-5.0^[5], 双歧杆菌经历该酸性环境后, 其黏附作用会受何影响还不清楚。因此, 本文将主要探讨不同pH的酸性环境对双歧杆菌黏附能力的影响。由于体内实验实施困难, 体外细胞培养, 尤其是人结肠癌细胞系Caco-2细胞, 可作为模型用于分析菌株的黏附^[6-7]。

另外, 有研究表明双歧杆菌的黏附能力与细

菌表面组成及结构直接相关, 所以菌体表面的物理化学性质也可以间接反应菌体的黏附能力, 菌体细胞表面的物理化学特征主要取决于其表面疏水性和自动聚集能力, Pan等^[8]通过对23株双歧杆菌疏水性和黏附能力进行比较分析, 建立了能够反映双歧杆菌表面疏水性与黏附性之间关系的回归方程($R^2=0.78$), 疏水性越强的菌株黏附能力越强。王丽群等^[9]测定了7株双歧杆菌表面疏水性和自动聚集能力, 同时观察了双歧杆菌的黏附能力, 结果表明, 双歧杆菌的黏附能力、自动聚集能力及表面疏水性具有一定的正相关性。因此, 在评价低pH处理对菌株黏附性影响时, 本研究同时确定对菌体自动聚集能力和表面疏水性的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌种: 两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 分离自成人粪便, 由乳品科学教育部重点实验室冻干保藏。

1.1.2 供试细胞: Caco-2 (Human colon adenocarcinoma, 人结肠腺癌细胞), 其特征是能够体外模拟成熟上皮细胞的结构和功能特征, 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养: 从液氮罐中取出 Caco-2 细胞, 将冻存管迅速置于 37 °C 水浴中复苏细胞, 离心收集细胞后, 加入 4 mL 含 10% 胎牛血清(使用前 56 °C 灭活 30 min)的 DMEM 培养基, 在 37 °C、5% CO₂-95% 空气的条件下培养, 每隔一天更换培养液; 当细胞在培养瓶底长至 80% 时, 需进行传代。用于黏附测定的 Caco-2 细胞, 单层细胞培养于预先放有玻璃盖玻片的六孔培养皿, 接种量为 1×10⁵ CFU/mL, 每隔 48 h 及进行黏附试验前 24 h 更换一次培养基, 维持细胞生长。单层细胞培养 15-17 d, 后期融合后, 即可用于黏附试验。

1.2.2 菌种的活化与传代: 两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 接入 mMRS 液体培养基, 37 °C 条件下厌氧(80% N₂、10% H₂、10% CO₂, 下同)培养 48 h; 在 mMRS 固体培养基上划线, 37 °C 条件下厌氧培养 48 h, 镜检后挑取固体培养基中形态良好, 没有杂菌的菌落, 接入 mMRS 液体培养基中, 37 °C 条件下厌氧培养 48 h, 经过两代液体培养以提高菌株活力。

1.2.3 双歧杆菌经不同 pH 的 PBS 溶液处理后存活率的测定: 将生长至对数生长期后期的细菌培养物 8 000 ×g 离心 10 min, 收集菌体, 菌体经 PBS (pH 7.2)清洗两遍后重悬于 pH 为 1.0-3.0 (以 0.5 为梯度)的 PBS 中, 37 °C 分别孵育 0.5、1.0、1.5 和 2.0 h, 然后采用平板计数法测定其活菌数, 分别计为 A_n, 经 PBS 处理前的活菌数计为 A₀, 存活率(%)表示为: A_{n-1}/A₀×100。同时以 pH 为 7.0 的 PBS 处理作对照。确定存活率变化最大的时间点为处理时间。

1.2.4 不同 pH 的 PBS 溶液对双歧杆菌的处理:

将生长至对数生长期后期的细菌培养物 8 000 ×g 离心 10min, 收集菌体, 菌体经 PBS (pH 7.2)清洗两遍后重悬于 pH 为 1.0-5.0 (以 0.5 为梯度)的 PBS 中于 37 °C 处理 0.5 h, 8 000 ×g 离心 10 min, 收集菌体, 经 PBS (pH 7.2)清洗两遍后, 收集菌体, 再进行后续实验。同时以 pH 为 7.0 的 PBS 处理作对照。

1.2.5 双歧杆菌黏附性的测定: (1) 直接镜检法测定双歧杆菌的黏附能力。参考 Gopal 等^[10]的方法, 采用直接镜检法测定双歧杆菌的黏附能力, 具体步骤如下: 将菌体浓度调整为 1×10⁸ 个细胞/mL, 经 PBS 溶液处理后重悬于 DMEM 培养基, 用于黏附测定。Caco-2 细胞用 PBS (pH 7.2)清洗后, 添加 2 mL 含双歧杆菌的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂-95% 空气条件下孵育 1 h。单层细胞用无菌 PBS 缓冲液清洗 5 次, 甲醇固定 10 min, 革兰氏染色, 在显微镜油镜下观察细菌与细胞的黏附状态。黏附能力以随机选取的 20 个显微视野进行评价, 并以 100 个 Caco-2 细胞黏附的细菌数表示。(2) 平板菌落计数法测定双歧杆菌的黏附率。参考 Kos 等^[11]的方法, 采用平板菌落计数法测定双歧杆菌的黏附能力, 具体步骤如下: 将菌体浓度调整为 1×10⁸ 个细胞/mL, 经 PBS 溶液处理后重悬于 DMEM 培养基, 用于黏附测定。Caco-2 细胞用 PBS (pH 7.2)清洗后, 添加 2 mL 含双歧杆菌的 DMEM 培养基, 37 °C、5% CO₂-95% 空气条件下, 培养 1 h。单层细胞用无菌 PBS (pH 7.2)缓冲液清洗 5 次, 以除去未黏附的细菌细胞, 加入 250 μL Trypsine-EDTA (0.05% Trypsine, 0.53 mmol/L EDTA)于 37 °C 培养 15 min, 将黏附的细菌从细胞上释放下来。然后向每个孔中添加 250 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 以终止胰酶活力, 用吸管将 Caco-2 细胞层裂解下来。黏附细菌经 10 倍系列稀释后涂布于 mMRS 平板, 做平行对照, 37 °C 厌氧培养, 活菌数计为 A₁,

黏附前的活菌数计为 A_0 。黏附率(%)表示为： $A_1/A_0 \times 100$ 。

1.2.6 双歧杆菌疏水性的测定：通过实验菌株对碳氢化合物的亲和力反映菌株表面疏水性，具体参考 Rosenberg 等^[12]的方法，步骤如下：将 PBS 溶液处理后的菌体，用 PBS 缓冲液在 600 nm 处调节吸光值为 0.8–0.9 (准确读取其吸光度值，记作 A_0)。取 3 mL 该菌液，然后加入 0.6 mL 十六烷。该两相体系通过涡旋振荡彻底混合 2 min，37 °C 共孵育 1 h 后去除上清液，于 600 nm 处测定水相的吸光值(记作 A)。按如下公式计算实验菌株的疏水性 [H (%)]： $H(\%) = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$ ，这里 A_0 和 A 分别表示有机溶剂萃取前后的吸光值。进行 3 次独立的试验。

1.2.7 双歧杆菌自动聚集能力的测定：菌株的自动聚集能力以自动聚集百分比表示，具体参考 Collado 等^[13]的方法，方法如下：将 PBS 溶液处理后的菌体重悬于耗尽的 mMRS 培养基中，经漩涡振荡 2 min 后，取 1 mL 测定细菌悬浮液在 600 nm 处的吸光值作为整个细菌悬浮液的吸光值，而后 25 °C 静止放置 120 min 后，取 1 mL 上层清液至另一试管中，在 600 nm 处测其吸光值，通过以下公式计算自动聚集百分比： $1 - (\text{上层清液吸光值} / \text{整个细菌悬浮液吸光值}) \times 100$ 。

1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次，运用 SPSS Statistics V17.0 软件，采用独立样本 t 检验进行数据分析 ($P < 0.05$)，试验结果用平均值 \pm 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 的 PBS 溶液处理后双歧杆菌的存活率

两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 经不同 pH 的 PBS 溶液处理不同时间后，分别测定其存活率，结果见图 1。

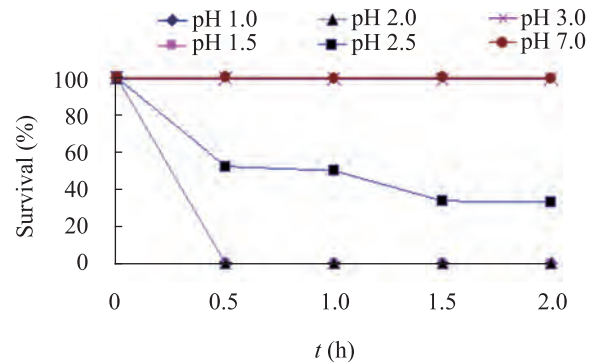


图 1 不同 pH 的 PBS 溶液处理后 KLDS2.0603 存活率的变化率

Fig. 1 The change of the survival of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 treated by PBS of different pH in the different time

由图 1 可知：两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 在 pH 为 1.0 和 1.5 的 PBS 中处理 0.5 h 后，已经无法检测到活菌；在 pH 为 2.0 的 PBS 中处理 0.5 h 后，活菌数仅为 6.85×10^4 CFU/mL，并随处理时间的延长活菌数逐渐下降，处理 1.5 h 后几乎检测不到活菌；在 pH 为 2.5 的 PBS 溶液中处理 0.5 h 后存活率为 52.35%，并随处理时间的延长活菌数逐渐下降；在 pH 3.0 的 PBS 溶液中，在处理的 2.0 h 内，活菌数并无明显变化。综合上述结果，确定两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 在不同 pH 的 PBS 溶液中的处理时间为 0.5 h 时存活率变化最大。

2.2 不同 pH 的 PBS 溶液处理对双歧杆菌黏附性的影响

2.2.1 采用直接镜检法获得的结果：采用直接镜检法测定经不同 pH 的 PBS 溶液处理后，两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 的黏附能力，结果如图 2 所示。由图 2 可知：两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 在 pH 7.0 时的黏附性为 260.90 个/100 个细胞；除 pH 5.0 的处理组外，其余各组的黏附性均显著低于对照组 ($P < 0.05$)；pH 1.5 (黏附性为 119.05 个/100 个细胞) 和 pH 2.5 (黏附性为 111.02 个/100 个细胞) 两处理组的黏附能力最低，且显著低于其余各处

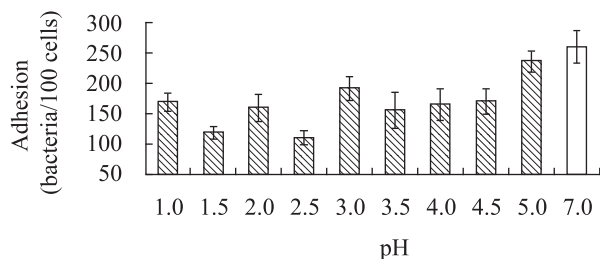


图 2 直接镜检法测定不同 pH 的 PBS 溶液对两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 黏附能力的影响

Fig. 2 Influence of PBS of different pH on adhesion ability of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 by gram staining microscopic examination

理组($P<0.05$)。由图 1 的结果可知: 在 pH 为 1.0 和 1.5 条件下处理 0.5 h 后, 已经检测不到活菌, 但此时仍有细菌黏附, 说明死菌体也具有一定的黏附能力。

2.2.2 采用平板菌落计数法获得的结果: 由于直接镜检法无法区分黏附的死菌体和活菌体, 因此采用平板菌落计数法测定黏附的活菌体数量。图 3 给出的是经不同 pH 的 PBS 溶液处理后, 两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 的黏附能力。由图 3 可知: 对照处理组(pH 7.0)的黏附率最大, 除 pH 5.0 的处理组外, 其余各处理组的黏附率均显著低于对照组($P<0.05$)。在 pH 为 1.0–2.0 的范围内未检测到活菌, 其黏附率为 0; 在 pH 为 2.5–3.5 的范围内, 随 pH 升高, 黏附率下降; 在 pH 为 4.0–5.0 的范围内, 随 pH 升高, 黏附率逐渐升高。

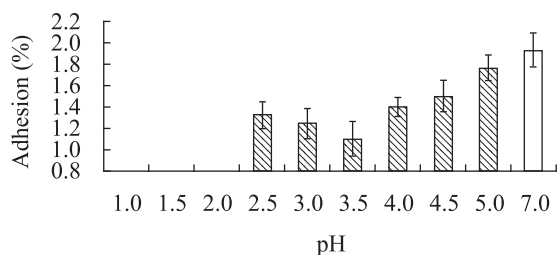


图 3 平板菌落计数法测定不同 pH 的 PBS 溶液对两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 黏附能力的影响

Fig. 3 Influence of PBS of different pH on adhesion ability of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 by flat colony counting method

2.3 不同 pH 的 PBS 溶液处理对双歧杆菌疏水性的影响

图 4 是两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 经不同 pH 的 PBS 溶液处理后的表面疏水性。由图 4 可知: 两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 在 pH 7.0 时的疏水性为 77.16%; pH 3.0 (疏水性为 88.69%)和 pH 3.5 (疏水性为 89.84%)两处理组的疏水性显著高于对照组($P<0.05$), 其余处理组与对照组无显著差异。

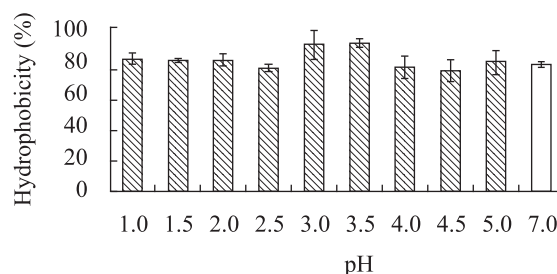


图 4 经不同 pH 的 PBS 溶液处理后两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 的疏水性

Fig. 4 Surface hydrophobicity of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 treated by PBS of different pH

2.4 不同 pH 的 PBS 溶液处理对双歧杆菌自动聚集能力的影响

图 5 是两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 经不同 pH 的 PBS 溶液处理后的自动聚集能力。由图 5 可知: 除 pH 1.0、1.5 和 5.0 处理组外, 其余各组均显著低于对照组(pH 7.0); 在 pH 为 1.0–3.0 范围内, 随 pH 的升高, 自动聚集能力逐渐降低; 在 pH 为

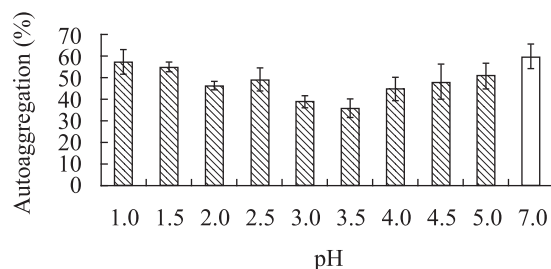


图 5 经不同 pH 的 PBS 溶液处理后两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 的自动聚集能力

Fig. 5 Autoaggregation of *Bifidobacterium bifidum* KLDS2.0603 treated by PBS of different pH

3.5–5.0 范围内, 随 pH 的升高, 自动聚集能力逐渐升高。

3 讨论

由于益生菌到达人体肠道发挥益生作用前, 会经历胃酸等酸性环境^[5], 较低的酸性环境会对益生菌的存活造成一定影响, 已有的研究表明^[14–15], 双歧杆菌的耐酸性具有种属特异性, 不同双歧杆菌的胁迫致死 pH 不同。Liu 等^[16]用 pH 2.0 的 PBS 来测定 38 株双歧杆菌的存活率, 发现处理 90 min 时几乎无存活, 由本试验可以看出当 pH 降低到 3.0 以下时, 会对双歧杆菌的存活造成显著影响(图 1)。

这些酸性环境也可能会进一步影响益生菌在人体内的定植和其益生作用的发挥。本试验以高黏附能力菌株两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 为研究对象, 针对不同 pH 的酸性环境对两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 黏附的影响进行研究, 以 Caco-2 细胞为模型, 采用平板菌落计数法和直接镜检法对双歧杆菌的黏附能力进行测定。结果表明, 经不同 pH 酸处理后的两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 黏附能力下降。经非致死的酸性条件处理后, 随 pH 的增加, 两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 黏附能力逐渐升高(图 2、3)。经致死酸性条件处理后, 黏附率有所下降, 可能由活菌数下降所导致(图 2), 同时实验证实, 酸处理的致死菌株也具有一定的黏附能力(图 3)。本研究证实酸性环境影响了实验菌株的黏附性, 这种影响是不利的。

许多报道指出, 黏附是一个复杂的多步的过程, 黏附过程分为非特异性结合阶段和特异性黏附阶段, 非特异性结合是益生菌与细胞的黏附过程中乳酸菌产生的胞外多糖(EPS)起作用^[17]; 特异性结合是黏附素与黏附素受体之间的特异性结合, 有研究表明益生菌的膜蛋白和脂磷壁酸(LTA)介导乳酸菌与肠上皮细胞的特异性黏附^[3,18–19]。益

生菌在低 pH 处理后膜脂质会发生相应变化^[20], 同时产生相应的酸应激蛋白^[21], 可能会使菌体表面的黏附素发生变化, 从而降低了菌体的黏附作用。

此外, 疏水作用被认为是影响细菌与宿主间反应的因素之一, 与多种黏附现象, 如组织表面的黏附、塑料表面的黏附、细菌间的集聚等均有关。细菌的疏水性源于菌体表面静电荷、极性和非极性残基的相对分布。双歧杆菌表面疏水性和自动聚集能力通常被认为是两个独立的、能够反映双歧杆菌黏附能力的特征^[22]。本研究同时对双歧杆菌表面疏水性和自动聚集能力进行测定, 分析酸处理后双歧杆菌表面性质和黏附能力之间的相关性。研究证实, 除 pH 为 3.5 处理组外, 两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 的表面疏水性和黏附能力呈现很好的正相关性; 除 pH 3.0 的处理组外, 两歧双歧杆菌 KLDS2.0603 的自动聚集能力和黏附能力呈现较好的正相关性。对于 pH 为 3.0 和 3.5 处理组所呈现的非正相关性, 分析原因可能在于 pH 3.0 和 3.5 是致死 pH 向非致死 pH 的过度, pH 对菌体表面静电荷的影响不同, 或不同程度上改变了菌体表面极性和非极性残基的相对分布, 但这些因素的改变是否是引起黏附能力改变的主要因素, 还有待进一步的证实。

参 考 文 献

- [1] Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 73(2): 399S–405S.
- [2] Candela M, Perna F, Carnevali P, et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(3): 286–292.
- [3] Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D, et al.

- Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4695–4702.
- [4] Collado MC, Gueimonde M, Hernández M, et al. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(12): 2672–2678.
- [5] Hunger W, Peitersen N. New technical aspects of the preparation of starter cultures[J]. Bulletin IDF, 1992, 277(4): 17–21.
- [6] Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, et al. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(12): 4121–4128.
- [7] Crociani J, Grill JP, Huppert M, et al. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison *with in vivo* study[J]. Letters in Applied Microbiology, 1995, 21(3): 146–148.
- [8] Pan WH, Li PL, Liu ZY. The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians'faeces[J]. Anaerobe, 2006, 12(3): 148–152.
- [9] 王丽群, 张佰荣, 王彦, 等. 双歧杆菌体外对 Caco-2 的黏附及其表面性质分析[J]. 微生物学报, 2010, 50(5): 606–613.
- [10] Gopal PK, Prasad J, Smart J, et al. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 67(3): 207–216.
- [11] Kos B, Šušković J, Vuković S, et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(6): 981–987.
- [12] Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity[J]. FEMS Microbiology Letters, 1980, 9(1): 29–33.
- [13] Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains[J]. European Food Research and Technology, 2008, 226(5): 1065–1073.
- [14] Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 93(1): 109–113.
- [15] Mainville I, Arcand Y, Farnworth ER. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99(3): 287–296.
- [16] Liu ZY, Jiang ZJ, Zhou K, et al. Screening of bifidobacteria with acquired tolerance to human gastrointestinal tract[J]. Anaerobe, 2007, 13(5/6): 215–219.
- [17] Yang ZN. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties[D]. Helsinki: Department of Food Technology, University of Helsinki, 2000: 26–29.
- [18] Op den Camp HJ, Oosterhof A, Veerkamp JH. Interaction of bifidobacterial lipoteichoic acid with human intestinal epithelial cells[J]. Infection and Immunity, 1985, 47(1): 332–334.
- [19] Granato D, Perotti F, Masserey I, et al. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human Enterocyte-Like Caco-2 cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 1071–1077.
- [20] Fozo EM, Kajfasz JK, Quivey RG Jr. Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 238(2): 291–295.
- [21] Guzzo J, Delmas F, Pierre F, et al. A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase[J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 24(5): 393–396.
- [22] Rahman MM, Kim WS, Kumura H, et al. Autoaggregation and surface hydrophobicity of bifidobacteria[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(8): 1593–1598.