



多糖类益生元的筛选及凝结芽孢杆菌体外发酵特性

余静¹, 刘波^{2*}, 孙存鑫², 周群兰², 郑肖川², 蒋立¹, 李正中³, 王亚超¹, 程开敏⁴, 王凯周⁴

1 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621000

2 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214000

3 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200120

4 广东粤海饲料集团股份有限公司, 广东 湛江 524017

余静, 刘波, 孙存鑫, 周群兰, 郑肖川, 蒋立, 李正中, 王亚超, 程开敏, 王凯周. 多糖类益生元的筛选及凝结芽孢杆菌体外发酵特性[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2743-2762.

YU Jing, LIU Bo, SUN Cunxin, ZHOU Qunlan, ZHENG Xiaochuan, JIANG Li, LI Zhengzhong, WANG Yachao, CHENG Kaimin, WANG Kaizhou. Screening of polysaccharide-based prebiotics and *in vitro* fermentation characteristics of *Bacillus coagulans*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2743-2762.

摘要: 【目的】探究 9 种多糖对凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)的增殖、产酶特性的影响。

【方法】将凝结芽孢杆菌分别添加至菊粉多糖(inulin polysaccharide)、刺五加多糖(*Eleutherococcus senticosus* polysaccharide)、壳寡糖(chitosan oligosaccharide)、防风多糖(*Saposhnikovia divaricata* polysaccharide)、低聚木糖(xylo-oligosaccharide)、黄芪多糖(*Astragalus* polysaccharide)、甘露糖(D-mannose)、白术多糖(*Atractylodes macrocephala* Koidz polysaccharide)和玉屏风多糖(Yu Ping Feng polysaccharide)为唯一碳源的培养基中, 通过菌株生长、酶活性及其体外厌氧发酵等作为指标, 筛选出最优益生元。【结果】凝结芽孢杆菌能很好地利用防风多糖、黄芪多糖、白术多糖和玉屏风多糖; 添加量为 4%的防风多糖和白术多糖, pH 差值差异最大, 蛋白酶活性差异显著($P<0.05$)。体外发酵乳酸活性和总蛋白酶活性均提高, 4%白术多糖的乳酸和总蛋白酶活性差异显

资助项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(2022XT0401, 2020TD59); 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-48); 江苏现代农业产业技术体系建设专项资金(JATS[2022]514)

This work was supported by the Chinese Academy of Fishery Sciences Basal Research Fund (2022XT0401, 2020TD59), the National Modern Agricultural Industry Technology System Special Project (CARS-48), and the Jiangsu Modern Agricultural Industry Technology System (JATS[2022]514).

*Corresponding author. Tel: +86-510-85556566, E-mail: liub@ffrc.cn

Received: 2022-10-24; Accepted: 2023-02-08; Published online: 2023-02-22

著($P<0.05$); 肠道内容物发酵液 16S rRNA 基因高通量测序结果表明, 与对照组比较, 添加黄芪多糖、防风多糖、甘露糖 3 种益生元发酵凝结芽孢杆菌显著降低了气单胞菌(*Aeromonas*)、 α -变形菌(α -*Proteobacteria*)、链球菌(*Streptococcus*)、志贺氏杆菌属(*Shigella*)等致病菌的相对丰度, 提高了乳杆菌(*Lactobacillus*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、产酸杆菌(*Acidobacteria*)的相对丰度。【结论】凝结芽孢杆菌发酵 4%白术多糖具有较好的产酶性能与益生特性, 二者协同发酵添加至饲料中具有较好的发展潜力。

关键词: 凝结芽孢杆菌; 益生元; 多糖; 体外发酵; 肠道菌群

Screening of polysaccharide-based prebiotics and *in vitro* fermentation characteristics of *Bacillus coagulans*

YU Jing¹, LIU Bo^{2*}, SUN Cunxin², ZHOU Qunlan², ZHENG Xiaochuan², JIANG Li¹, LI Zhengzhong³, WANG Yachao¹, CHENG Kaimin⁴, WANG Kaizhou⁴

1 School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, Sichuan, China

2 Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214000, Jiangsu, China

3 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200120, China

4 Guangdong Yuehai Feed Group Co., Ltd., Zhanjiang 524017, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects of nine polysaccharides on the proliferation and enzyme production characteristics of *Bacillus coagulans*. **[Methods]** *B. coagulans* was co-fermented with inulin polysaccharide, *Eleutherococcus senticosus* polysaccharide, chitosan oligosaccharide, *Saposhnikovia divaricata* polysaccharide, xylo-oligosaccharide, *Astragalus* polysaccharide, D-mannose, *Atractylodes macrocephala* Koidz polysaccharide, and Yu Ping Feng polysaccharide as the only carbon source in the medium, respectively. The optimal polysaccharides were screened based on the strain growth, enzyme activities, and *in vitro* anaerobic fermentation performance. **[Results]** *B. coagulans* could well utilize the polysaccharides of *Astragalus*, *S. divaricata*, *A. macrocephala*, and Yu Ping Feng. The significant differences in pH and protease activity ($P<0.05$) after fermentation were found between 4% *A. macrocephala* polysaccharide and 4% *S. divaricata* polysaccharide. After *in vitro* fermentation, the lactic acid content and total protease activity increased, which were the highest in the 4% *A. macrocephala* polysaccharide group ($P<0.05$). The results of 16S rRNA gene sequencing of intestinal contents fermentation liquid showed that *B. coagulans* fermented with *Astragalus* polysaccharide, *S. divaricata* polysaccharide, and D-mannose significantly reduced the relative abundance of pathogenic bacteria such as *Aeromonas*, α -*Proteobacteria*, *Streptococcus*, and *Shigella* and improved that of *Lactobacillus*, *Firmicutes*, *Lactococcus lactis*, and *Acidobacteria* compared with the control group. **[Conclusion]** *B. coagulans* fermented with 4% *A. macrocephala* polysaccharide has good enzyme production and probiotic

properties, which has a good potential for application in aquatic feed.

Keywords: *Bacillus coagulans*; prebiotics; polysaccharides; fermentation *in vitro*; intestinal flora

益生元对动物机体具有很多有益作用,近年来越来越多地应用在功能性食品开发和饲料添加剂中^[1]。在禁抗减抗的大背景下,在水产养殖中需要不断寻找新的绿色添加剂,益生元成为替抗的研究热点^[2]。益生元具有提高动物机体健康和免疫应答^[3]、改善动物肠道微生物菌群的丰度^[4]以及刺激某些肠道微生物产生代谢物质等作用^[5]。目前菊粉、甘露寡糖、玉屏风多糖、低聚木糖等益生元可被添加到水产饲料中使用^[6]。

益生元最开始被定义为活的非致病性生物以及它们对宿主的有益影响^[7]。后来益生元被定义为一类不能被机体消化的物质,但能促进肠道里某一类菌群的活性或产生代谢物质^[3],更广泛的食物成分具有益生菌活性,包括抗性淀粉和膳食纤维^[8-9]。菊粉是一种膳食纤维,能降低血糖血脂,刺激免疫保护结肠黏膜^[10]。白术多糖可以提高免疫增强活性,提高免疫增强力^[11-12]。益生菌对机体的有益作用被更多关注,凝结芽孢杆菌属(*Bacillus coagulans*)于兼性厌氧革兰氏阳性菌,具有耐高温产芽孢的特性,被应用于制药、食品、饲料添加剂等,近年对其研究热度逐渐引起大家重视^[13]。在水产养殖中,乳酸芽孢杆菌能提高鱼类和甲壳动物生长性能、免疫反应和抗病力^[14-16]。凝结芽孢杆菌具有显著提高白虾生长性能、血清抗氧化等作用^[17]。养殖水体中添加凝结芽孢杆菌可改善日本沼虾肠道微生物群落,提高非特异性免疫力和抗病力^[18]。凝结芽孢杆菌 XY2 上调 *sod1*、*gstp1* 和 *cat* 基因转录水平和相关的酶活性,保护斑马鱼幼体应对硫酸铜诱导的氧化应激^[19]。在畜禽养殖中,凝结芽孢杆菌可改善肉鸡的生长性能,增强肠道先天免疫力,改善肠道微生物群落^[20]。断奶仔猪饲料中添加

凝结芽孢杆菌,可改变粪便微生物组成,提高生长性能,改善仔猪腹泻^[21]。益生元可为益生菌提供营养物质,益生菌可通过益生元发酵继而增殖^[22]。据报道,某些细菌可特定发酵对应的益生元,如放线杆菌、类杆菌可发酵果寡糖、低聚木糖、双歧杆菌发酵淀粉和果寡糖等^[23-26]。本项目组前期分离并鉴定出 1 株凝结芽孢杆菌 JSSW-LA-07-1,通过冷冻菌种活化和菌粉制备,可作为饲料添加剂或水质改良剂^[27],当添加量为 0.3%时,能较好的促进异育银鲫生长,提高免疫力^[28]。因此,本研究利用 9 种多糖替代 LB 培养基中的碳源,探索凝结芽孢杆菌 JSSW-LA-07-1 的生长和产酶特性,并通过体外模拟发酵,探讨不同的多糖对肠道微生物和凝结芽孢杆菌生长的影响,为在饲料中添加益生元和凝结芽孢杆菌提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要的益生元及试剂

葡萄糖、蛋白胨(上海麦克林生化科技有限公司)、酵母粉(北京索莱宝科技有限公司)、MgSO₄(国药集团化学试剂有限公司)、琼脂粉(北京信捷创辉科技有限公司)、菊粉多糖、刺五加多糖(扶风斯诺特生物技术有限公司)、壳寡糖(青岛和海生物科技有限公司)、防风多糖、黄芪多糖、白术多糖、玉屏风多糖(保定冀中生物科技有限公司)、低聚木糖(北京瑞达恒辉科技发展有限公司)、甘露糖(D-mannose, 购自 Biofrox); α -淀粉酶测试盒、乳酸含量测试盒、脂肪酶测试盒、中性蛋白酶测试盒、酸性蛋白酶测试盒、碱性蛋白酶测试盒(购自苏州科铭生物技术有限公司)。

9 种多糖：菊粉多糖(inulin polysaccharide)、刺五加多糖 (*Eleutherococcus senticosus* polysaccharide)、壳寡糖(chitosan oligosaccharide)、防风多糖 (*Saposhnikovia divaricata* polysaccharide)、低聚木糖(xylo-oligosaccharide)、黄芪多糖(*Astragalus* polysaccharide)、甘露糖(D-mannose)、白术多糖(*Atractylodes macrocephala* Koidz polysaccharide)、玉屏风多糖(Yu Ping Feng polysaccharide)。

1.2 菌株及培养条件

凝结芽孢杆菌菌株 JSSW-LA-07-1 来自淡水渔业研究中心与江苏苏微微生物研究公司，该菌株已保藏于中国微生物菌种库。将斜面接种的凝结芽孢杆菌接种于灭菌 LB 中；35 °C 下培养 48 h，并将菌种放入-80 °C 超低温冰箱保存，用于后续试验。基础 LB 培养略有修改：葡萄糖 15.80 g/L，蛋白胨 15.90 g/L，酵母粉 11.00 g/L，MgSO₄ 4.60 g/L。

1.3 多糖含量的测定

菊粉多糖、刺五加多糖、壳寡糖、防风多糖、低聚木糖、黄芪多糖、甘露糖、玉屏风多糖等多糖的含量参照 NY/T 1676—2008 食用菌中粗多糖含量的测定，白术按照 Q/BYG 企业标准测定多糖含量。

1.4 多糖接种凝结芽孢杆菌试验

在 LB 肉汤去糖基础上等量添加 2% 的 9 种物质配成的基础培养基，经 121 °C 灭菌 20 min 后备用。将培养好的菌液调节浓度为 1×10^8 CFU/mL，将该浓度的菌液按照 1% 的体积接种到 100 mL 基础培养基中，且培养基中的终浓度为 1×10^6 CFU/mL，以 LB 培养基和 LB 去糖培养基作为阳性对照和阴性对照组。将培养基放入 35 °C、180 r/min 摇床中培养 24 h，并在 0、9、12、15、18、21、24 h 取 200 μ L 菌液测定 OD₆₀₀ 吸光值，并绘制生长曲线；在 0、6、9、15、18、21、24 h 取 2 mL 菌液测定 pH 值^[29]。

1.5 多糖最适比例的筛选

根据以上 9 种多糖对凝结芽孢杆菌增殖的生长曲线和菌液 pH 差值结果，与阳性对照组相比，多糖对凝结芽孢杆菌增殖效果较好及 pH 差值变化较小，选择白术多糖、防风多糖、黄芪多糖、甘露糖、玉屏风多糖 5 种多糖，设置 0%、1%、2%、3%、4% 的浓度替代 LB 培养基中的葡萄糖，配置好的基础培养基经 121 °C 灭菌 20 min 后备用。将培养好的菌液调节浓度为 1×10^8 CFU/mL，并以该浓度的菌液按照 1% 的体积接种到 100 mL 基础培养基中，且培养基中的终浓度为 1×10^6 CFU/mL，以 0% 培养基作为对照组。培养基放入 35 °C、180 r/min 摇床中培养 24 h，并在 0、9、12、15、18、21、24 h 取 200 μ L 菌液测定 OD₆₀₀ 吸光值，绘制生长曲线；在 0、6、9、15、18、21、24 h 取 2 mL 菌液测定 pH 值。在无菌超净台内取发酵 24 h 的菌液 1.5 mL，于 2 mL 无菌离心管中，4 °C、8 000 r/min 离心 10 min。离心结束后取上清液用于测定 α -淀粉酶、脂肪酶、中性蛋白酶和乳酸的含量。

1.6 虾肠道内容物与凝结芽孢杆菌共发酵

1.6.1 肠道粪菌制作

选择投喂商品饲料粗蛋白质 42%、粗脂肪 6% 的罗氏沼虾(15–20 g)，用酒精对体表擦拭消毒，取下整根肠道及其内容物，多只混合 1 g 左右于灭菌离心管，加入 9 倍体积的 0.1 mol/L PBS (pH 7.0–7.4) 溶液，高通量组织研磨器高速匀浆 2 min，静置 2 h 后取上清液，即 10% 粪菌液。

1.6.2 发酵培养基配制

发酵培养基成分参照石梦玄等^[30]的方法，磷酸氢二钾 0.4 g/L、磷酸二氢钾 0.4 g/L、蛋白胨 2 g/L、酵母浸粉 2 g/L、碳酸氢钠 2 g/L、氯化钠 0.1 g/L、七水硫酸镁 0.1 g/L、氯化钙 0.1 g/L、吐温 80 2 mL/L、半胱氨酸盐酸盐 0.5 g/L、胆汁盐 0.5 g/L、维生素 K1 溶液 10 μ L/L、氯化血红

素 0.05 g/L 和硫代乙醇酸钠 3 g/L 配制模拟发酵液。分别添加防风多糖、白术多糖(4%)、甘露糖、黄芪多糖、玉屏风多糖(1%)到培养基中,以不添加凝结芽孢杆菌的培养基为阳性对照,只添加凝结芽孢杆菌的培养基为阴性对照。培养基经过 121 °C 高温灭菌 15 min,加入过滤除菌的维生素 K1 混匀。硫代乙醇酸钠在培养基中作为除氧剂,使其保持无氧环境。

1.6.3 多糖微生物共培养

实验设计 7 个处理组,每个处理 3 个重复,分别为对照组(CT)、凝结芽孢杆菌组(N)、凝结芽孢杆菌白术多糖组(NB)、凝结芽孢杆菌防风多糖组(NF)、凝结芽孢杆菌黄芪多糖组(NH)、凝结芽孢杆菌甘露糖组(NG)、凝结芽孢杆菌玉屏风多糖组(NP);发酵体系为发酵培养基 5 mL,接种 10%粪菌(即 0.5 mL);在 15 mL 厌氧发酵管中进行,用无菌封口膜封口保持厌氧。35 °C、180 r/min 发酵 24 h。

1.6.4 发酵液测定 pH

在粪菌发酵的 0、5、12、24 h 分别用一次性无菌针筒取 1 mL 发酵液,采用微量 pH 计测定其 pH 值。

1.6.5 发酵液酶活测定

取 2 mL 发酵液,4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,取其上清液测定蛋白酶、 α -淀粉酶、脂肪酶、乳酸活性。中性蛋白酶测定:中性蛋白酶催化酪蛋白水解产生酪氨酸;在碱性条件下,酪氨酸还原磷钼酸化合物生成钨蓝;在 680 nm 处测定中性蛋白酶含量。 α -淀粉酶测定: α -AL 随机催化淀粉中 α -1,4-糖苷键水解,生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖,同时使淀粉的黏度降低。淀粉水解酶催化淀粉水解生成还原糖,还原糖还原 3,5-二硝基水杨酸生成棕红色物质,在 540 nm 处测定淀粉酶活性。脂肪酶测定:脂肪酶催化油脂水解成脂肪酸,利用铜皂法测定

脂肪酸生成速率,在 710 nm 处测定脂肪酶含量。乳酸测定:乳酸在乳酸脱氢酶的作用下生成丙酮酸,同时使 NAD^+ 还原生成 NADH 和 H^+ , H^+ 传递给 PMS 生成的 PMSH_2 还原 INT 生成红色物质,在 530 nm 处测定乳酸含量。以上试剂盒均购自苏州科铭生物技术有限公司,具体方法参考试剂盒说明书。

1.6.6 微生物 16S rRNA 基因高通量测序

将 5 mL 菌液 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,离心后的菌体沉淀用于 16S rRNA 基因高通量测序,每个处理 3 个重复,样品干冰保存送至南京集思慧远生物科技有限公司。使用 E.Z.N.A[®] Soil (Omega Bio-Tek, Norcross, GA) 试剂盒提取 DNA,在 16S rRNA V3-V4 区设计引物扩增,得到 420 bp 左右片段,通过 Illumina NovaSeq 6000 平台测序,得到 2×250 bp 的 paired-end 数据,通过拼接,可以得到较长序列。对于 16S rRNA 基因,默认选择 silva 16S rRNA 数据库 (<http://www.arb-silva.de/>)^[31],通过扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASV)序列比对 silva 细菌数据库,得到每个 ASV 对应的物种分类信息,并从中挑选出丰度最高的一条序列,作为该 ASV 的代表序列。使用 QIIME2 的 classify-consensus-vsearch 算法(<https://github.com/QIIME2/q2-feature-classifier>),对于每个 ASVs 的特征序列,在 QIIME2 软件中使用默认参数进行物种注释。通过 PCoA 降维分析展示,探究不同样本或组别间群落结构的差异。

1.7 数据统计与分析

数据采用“平均值±标准误”表示,采用 Graphpad Prism 8.0.1 软件作图,通过 SPSS 26.0 统计软件进行单因素方差分析(one way analysis of variance, one way-ANOVA),测序数据使用和非参数检验;显著性水平为 $P < 0.05$,用不同小写字母上标表示。

2 结果与分析

2.1 益生元多糖含量

9 种益生元多糖含量见表 1, 多糖含量为 69%–99%, 低聚木糖和甘露糖为高纯度单体。后续益生元替代培养基的碳源, 按照表 1 中碳源的含量等比替换加入。

2.2 多糖益生元接种凝结芽孢杆菌生长特性的影响

根据图 1 生长曲线所示, 凝结芽孢杆菌在

表 1 九种益生元的多糖含量

Table 1 Polysaccharide content of the nine prebiotics

Category	Content (%)
Yu Ping Feng polysaccharide	69.88±0.85
Xylo-oligosaccharide	99.00±0.26
D-mannose	99.00±0.71
<i>Eleutherococcus senticosus</i> polysaccharide	82.83±2.06
Inulin polysaccharide	95.00±0.33
Chitosan oligosaccharide	94.10±0.31
<i>Astragalus</i> polysaccharide	79.77±2.37
<i>Saposhnikovia divaricata</i> polysaccharide	73.44±1.20
<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz polysaccharide	70.38±0.92

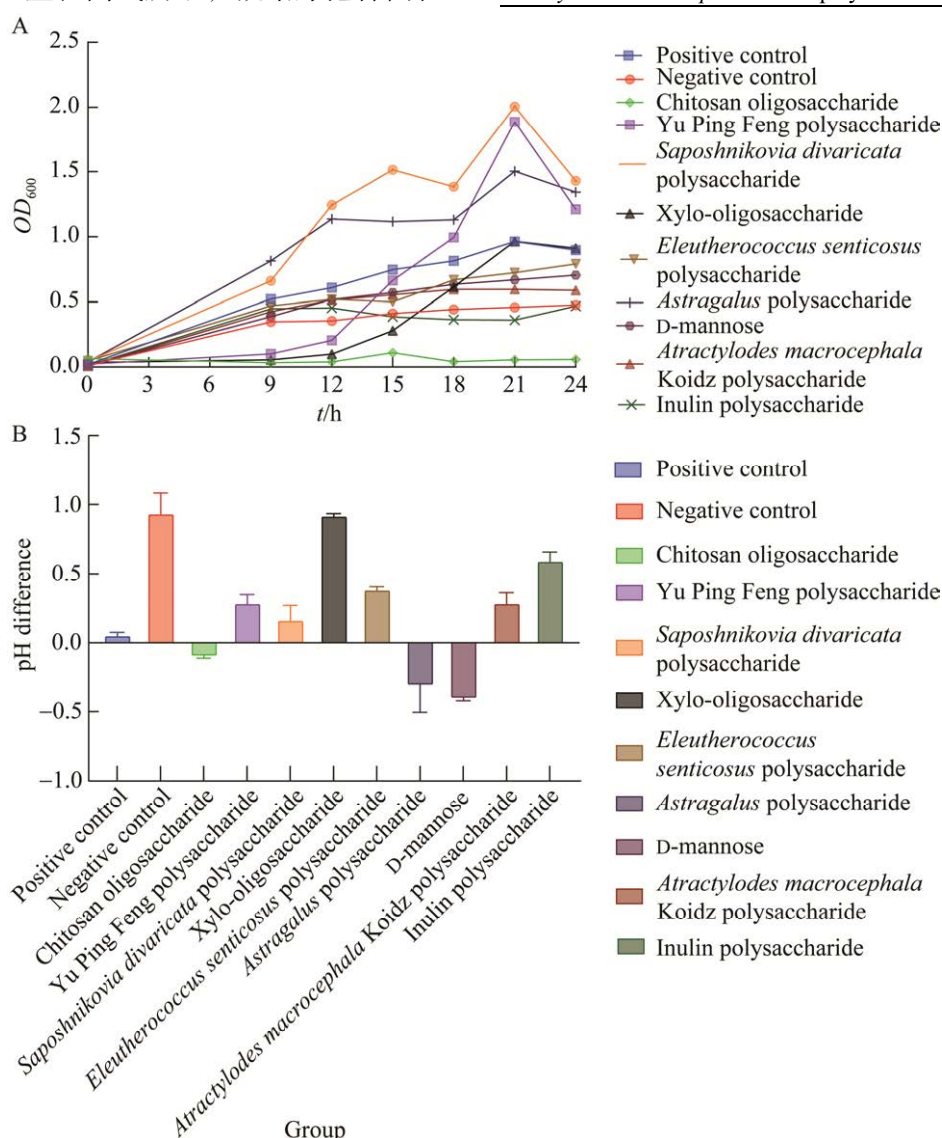


图 1 九种益生元发酵凝结芽孢杆菌对生长曲线(OD_{600})和 pH 差值的影响

Figure 1 Effect of nine prebiotics on the growth curve (OD_{600}) of *Bacillus coagulans* and pH difference of fermentation broth. A: Growth curve of *B. coagulans*. B: pH difference of fermentation broth. The error bar represents the standard deviation ($n=3$).

18–21 h 处于对数期, pH 差值为 24 h pH 值减去 0 h pH 值。在 21 h 时, 防风多糖 OD_{600} 值为 2.0, 玉屏风多糖 OD_{600} 值为 1.89, 黄芪多糖 OD_{600} 值为 1.50, 阳性对照 OD_{600} 值为 0.96。根据图 1 凝结芽孢杆菌生长 pH 差值所示, 甘露糖 pH 差值为 -0.415, 黄芪多糖 pH 差值为 -0.315, 壳寡糖 pH 差值为 -0.105, 防风多糖 pH 差值为 0.290, 白术多糖 pH 差值为 0.390。

2.3 不同的多糖添加比例对凝结芽孢杆菌的影响

根据 9 种益生元对凝结芽孢杆菌增殖的生长曲线和菌液 pH 差值的结果, 选择黄芪多糖、

白术多糖、防风多糖、甘露糖、玉屏风多糖 5 种多糖作为碳源, 进行适宜添加比例探索。具体结果如图 2 所示。与对照组相比, 在 21 h 时 1% 黄芪多糖组 OD_{600} 值为 0.443, 生长 pH 差值显著降低 ($P < 0.05$), 添加 1% 的黄芪多糖促进凝结芽孢杆菌生长且提高蛋白酶活性。

白术多糖组结果如图 3 所示。与对照组相比, 在 21 h 时 4% 白术多糖组 OD_{600} 值为 0.830, 生长 pH 差值显著降低, 1% 和 4% 白术多糖组的蛋白酶活性显著升高 ($P < 0.05$), 添加 4% 的白术多糖能较好地促进凝结芽孢杆菌生长且提高蛋白酶活性。

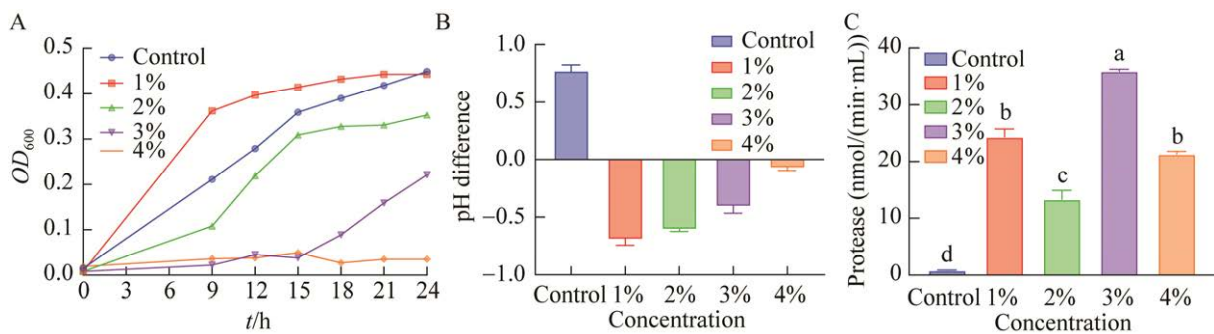


图 2 凝结芽孢杆菌与不同浓度黄芪多糖共发酵对生长曲线(OD_{600})、pH 差值和蛋白酶活性的影响

Figure 2 Effects of *Bacillus coagulans* fermented with *Astragalus* polysaccharide on the growth curves (OD_{600}), pH difference and protease activity. A: Growth curve of *B. coagulans*. B: pH difference. C: Protease activity of fermentation broth. The error bar represents the standard deviation ($n=3$).

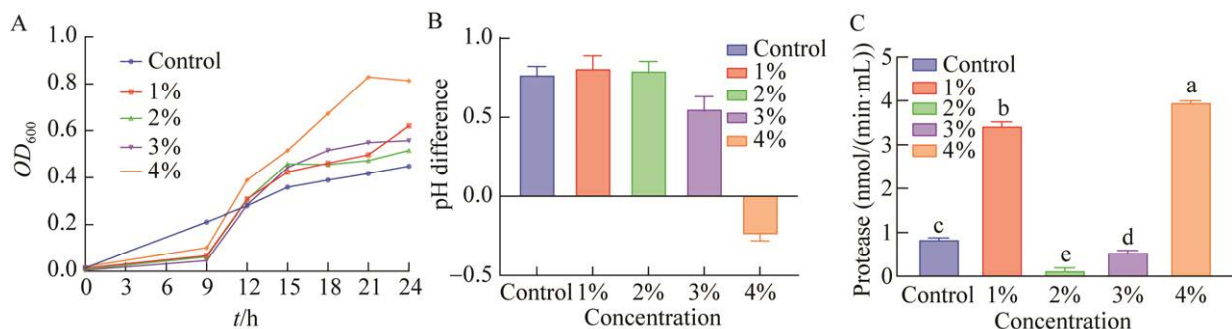


图 3 凝结芽孢杆菌与不同浓度白术多糖共发酵对生长曲线(OD_{600})、生长 pH 差值和蛋白酶活性的影响

Figure 3 Effects of *Bacillus coagulans* fermented with *Atractylodes macrocephala* Koidz polysaccharide on the growth curves (OD_{600}), pH difference and protease activity. A: Growth curve of *B. coagulans*. B: pH difference. C: Protease activity of fermentation broth. The error bar represents the standard deviation ($n=3$).

防风多糖组结果如图 4 所示。与对照组相比,在 21 h 时 4%防风多糖组 OD_{600} 值为 0.724, 生长 pH 差值显著降低, 3%–4%防风多糖组蛋白酶活性显著升高($P<0.05$), 添加 4%的防风多糖能促进凝结芽孢杆菌生长且提高蛋白酶活性。

甘露糖组结果如图 5 所示。与对照组相比,在 21 h 时 1%甘露糖组 OD_{600} 值为 0.579, 生长 pH 差值降低, 1%–4%甘露糖组蛋白酶活性显著

升高($P<0.05$), 添加 1%的甘露糖促进凝结芽孢杆菌生长且提高蛋白酶活性。

玉屏风多糖组结果如图 6 所示。与对照组相比,在 21 h 时 1%玉屏风多糖组 OD_{600} 值为 0.541, 生长 pH 差值显著降低; 1%–4%玉屏风多糖组蛋白酶活性显著升高($P<0.05$), 添加 1%的玉屏风多糖, 较好地促进凝结芽孢杆菌生长且提高蛋白酶活性。

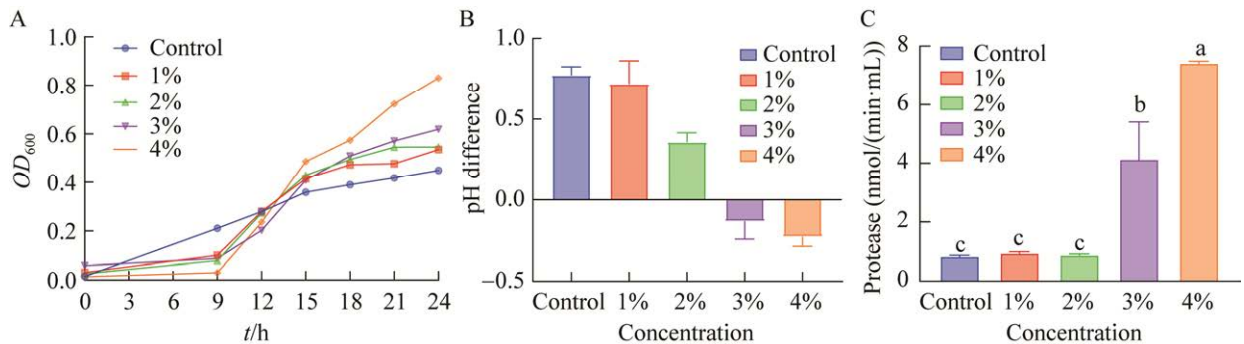


图 4 凝结芽孢杆菌与不同浓度防风多糖共发酵对生长曲线(OD_{600})、生长 pH 差值和蛋白酶活性的影响
Figure 4 Effects of *Bacillus coagulans* fermented with *Saposhnikovia radices* polysaccharide on the growth curves (OD_{600}), pH difference and protease activity. A: Growth curve of *B. coagulans*. B: pH difference. C: Protease activity of fermentation broth. The error bar represents the standard deviation ($n=3$).

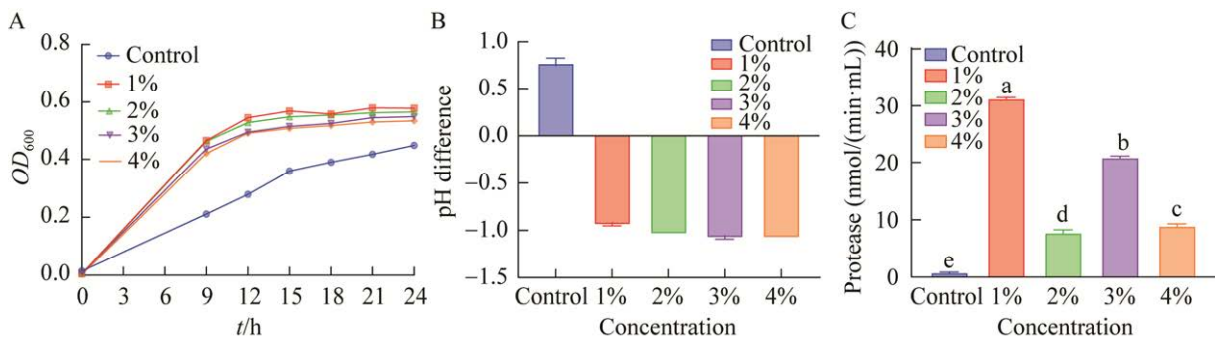


图 5 凝结芽孢杆菌与不同浓度甘露糖共发酵对生长曲线(OD_{600})、生长 pH 差值和蛋白酶活性的影响
Figure 5 Effects of *Bacillus coagulans* fermented with mannose on the growth curves (OD_{600}), pH difference and protease activity. A: Growth curve of *B. coagulans*. B: pH difference. C: Protease activity of fermentation broth. The error bar represents the standard deviation ($n=3$).

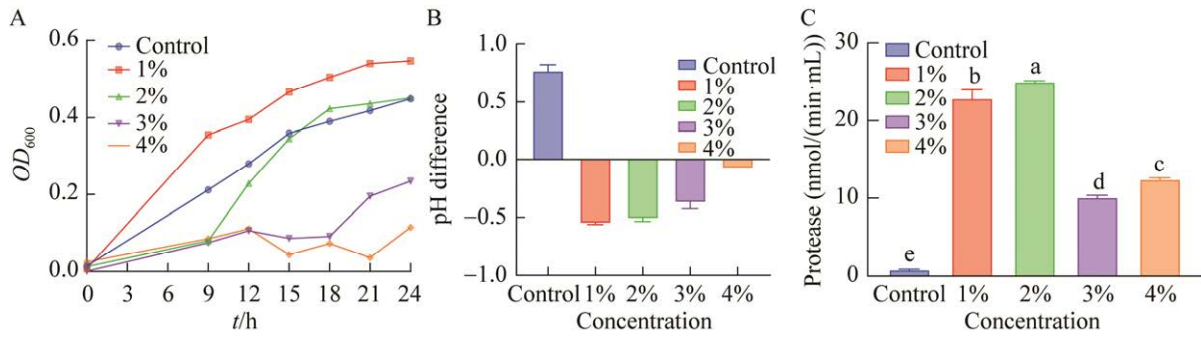


图 6 凝结芽孢杆菌与不同浓度玉屏风多糖共发酵对生长曲线(OD_{600})、生长 pH 差值和蛋白酶活性的影响
 Figure 6 Effects of *Bacillus coagulans* fermented with Yu Ping Feng polysaccharide on the growth curves (OD_{600}), pH difference and protease activity. A: Growth curve of *B. coagulans*. B: pH difference. C: Protease activity of fermentation broth. The error bar represents the standard deviation ($n=3$).

2.4 多糖微生物共培养对 pH 和酶活的影响

将凝结芽孢杆菌、肠道微生物、1%甘露糖、黄芪多糖、玉屏风多糖与 4%防风多糖、白术多糖共发酵，在发酵结束后测定 pH 值、 α -淀粉酶、乳酸、脂肪酶、总蛋白酶活性，测定结果如图 7 所示。发酵液 pH 差值除凝结芽孢组外，其他组有

降低趋势。与对照组相比，白术多糖组乳酸含量显著升高($P<0.05$)，乳酸含量均升高；玉屏风多糖组 α -淀粉酶活性显著升高($P<0.05$)；凝结芽孢组和防风多糖组脂肪酶活性显著升高($P<0.05$)；白术多糖组总蛋白酶活性显著升高($P<0.05$)，所有组蛋白酶活性均升高。

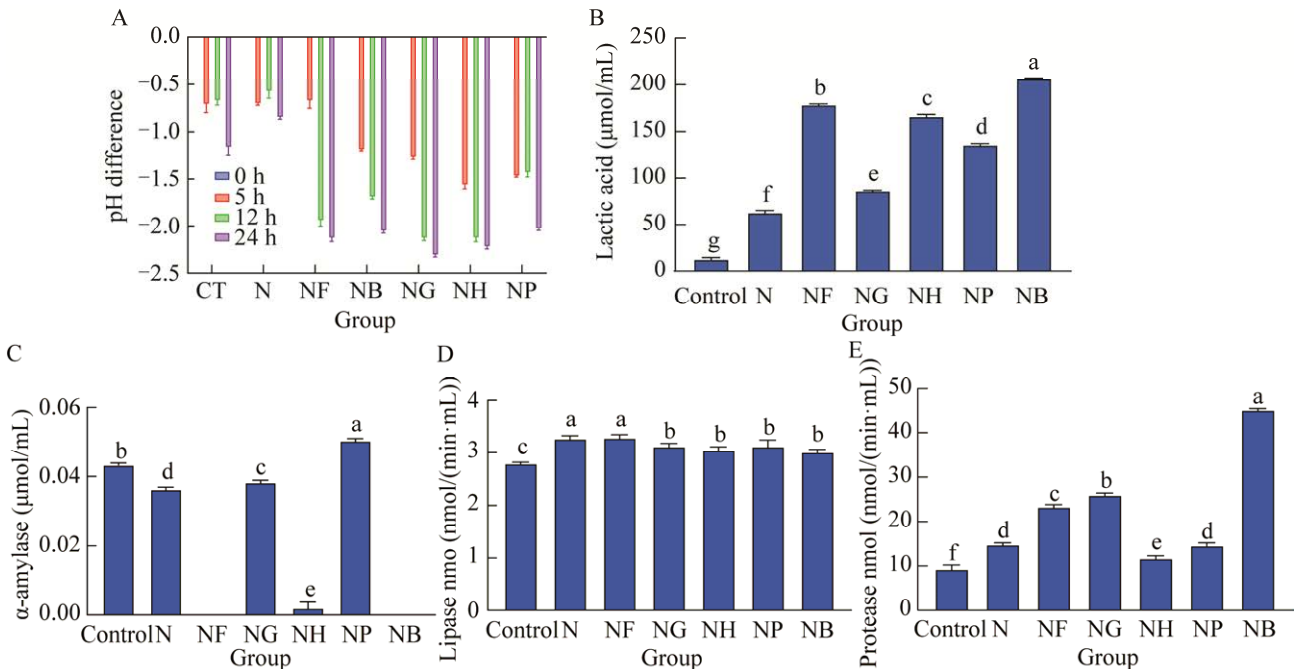


图 7 凝结芽孢杆菌体外发酵后发酵液 pH 差值、乳酸、 α -淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶含量
 Figure 7 *In vitro* fermentation growth of pH difference, lactic acid, α -amylase, lipase and protease level in the fermentation broth of *Bacillus coagulans*. A: Growth curve of *B. coagulans*. B: pH difference of fermentation broth. C: α -amylase level of fermentation broth. D: Lipase level of fermentation broth. E: Protease level of fermentation broth. The error bar represents the standard deviation ($n=3$).

2.5 多糖微生物共培养对细菌多样性的影响

2.5.1 体外发酵液细菌 α 和 β 多样性分析

对所有样本进行测序, 去除低质量数据, 剩余有效数据进行分析。每组物种统计分类情况进行差异性分析, 结果见表 2。 α 多样性指数见表 3, 其中对照组 Observed features、Shannon 指数

及 Chao1 指数差异显著高于其他组($P<0.05$), CT、N、NB、NF、NG 组 Simpson 指数差异显著高于 NH、NP 组($P<0.05$)。

对于肠道内容物发酵液样品, PCoA 分析结果表明 2 个主坐标 36.8% 的差异, PC1 和 PC2 分别解释了 26.78% 和 10.02% 的差异(图 8)。

表 2 不同组不同水平的分类统计

Table 2 Classification statistics of different groups at different levels

Group	Phylum	Class	Order	Family	Genus
CT	20.67±2.6	45.67±7.4	102.67±14.2	133.33±22.9	169.00±34.5
N	19.00±1.0	44.33±4.7	81.33±8.8	96.00±9.5	109.67±9.4
NB	22.67±2.4	53.67±4.1	99.33±6.3	122.33±8.9 ^b	134.00±10.5 ^b
NF	21.33±0.6	50.67±3.9	97.67±6.3	124.67±9.2 ^b	146.33±12.9 ^b
NG	11.33±1.6	22.00±3.7	35.00±6.4	39.67±6.2	41.00±5.0
NH	4.00±0.0	5.00±0.0	8.67±1.4	12.00±1.7	13.00±1.7
NP	5.00±0.5	6.00±0.5	8.33±0.3	11.00±0.0	12.33±0.3

Different lower case letters indicate that there are significant differences between groups ($P<0.05$). The control group is represented by CT; *B. coagulans* group is represented by N; The combination of *B. coagulans* and *A. macrocephala* Koidz polysaccharide group is represented by NB; The combination of *B. coagulans* and *Saposhnikovia divaricate* polysaccharide group is represented by NF; The combination of *B. coagulans* and D-mannose group is expressed as NG; The combination of *B. coagulans* and *Astragalus* polysaccharide group is expressed with NH; The combination of *B. coagulans* and Yu Ping Feng polysaccharide group is expressed as NP.

表 3 α 多样性指数统计表

Table 3 Alpha diversity index statistics

Group	Observed features	Shannon	Simpson	Chao1
CT	546.33±149.0	7.48±0.5	0.99±0.00	570.67±165.1
N	334.33±38.1 ^c	6.58±0.2	0.98±0.00	343.50±37.8 ^c
NB	418.33±45.9 ^b	6.92±0.1 ^b	0.98±0.00	427.11±43.0 ^b
NF	456.00±43.7 ^b	6.97±0.1 ^b	0.98±0.00	468.06±44.7 ^b
NG	159.67±4.4 ^d	6.29±0.0	0.98±0.00	162.70±4.0 ^d
NH	51.67±1.6	4.96±0.0	0.96±0.00	51.67±1.6
NP	60.67±6.7	5.15±0.2	0.96±0.00	60.78±6.6

Different lower case letters indicate that there are significant differences between groups ($P<0.05$). The control group is represented by CT; *B. coagulans* group is represented by N; The combination of *B. coagulans* and *A. macrocephala* Koidz polysaccharide group is represented by NB; The combination of *B. coagulans* and *Saposhnikovia divaricate* polysaccharide group is represented by NF; The combination of *B. coagulans* and D-mannose group is expressed as NG; The combination of *B. coagulans* and *Astragalus* polysaccharide group is expressed with NH; The combination of *B. coagulans* and Yu Ping Feng polysaccharide group is expressed as NP.

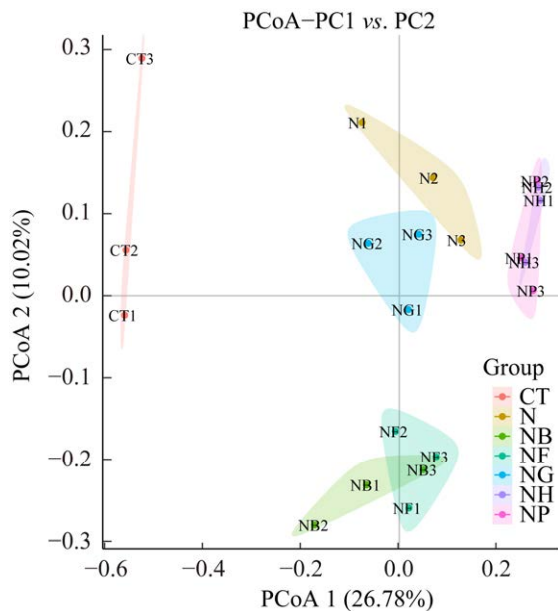


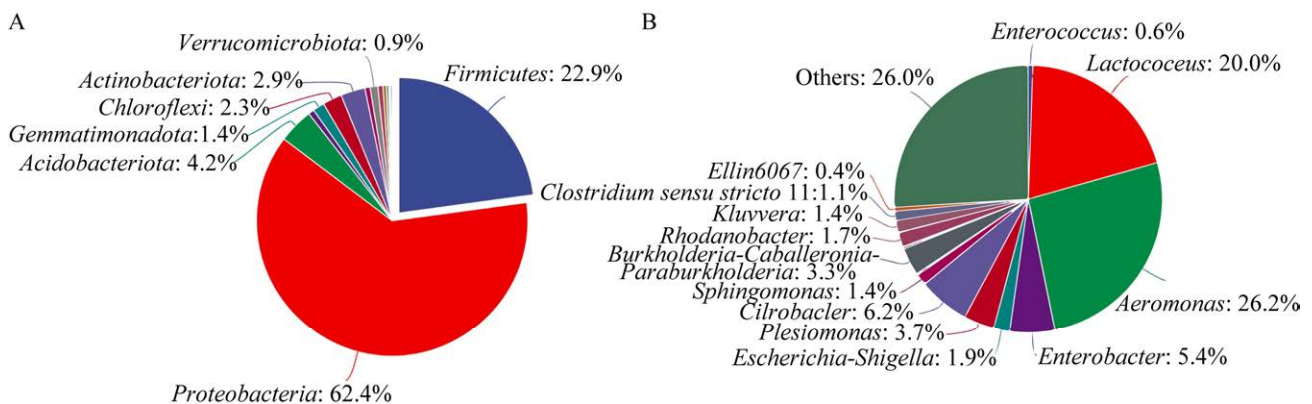
图8 肠道内容物发酵液细菌多样性的PCoA分析
Figure 8 PCoA analysis of bacterial diversity in fermentation broth of intestinal contents. The 95% confidence interval is plotted, the smaller the value the smaller the area of the ellipse and the more concentrated the points covered.

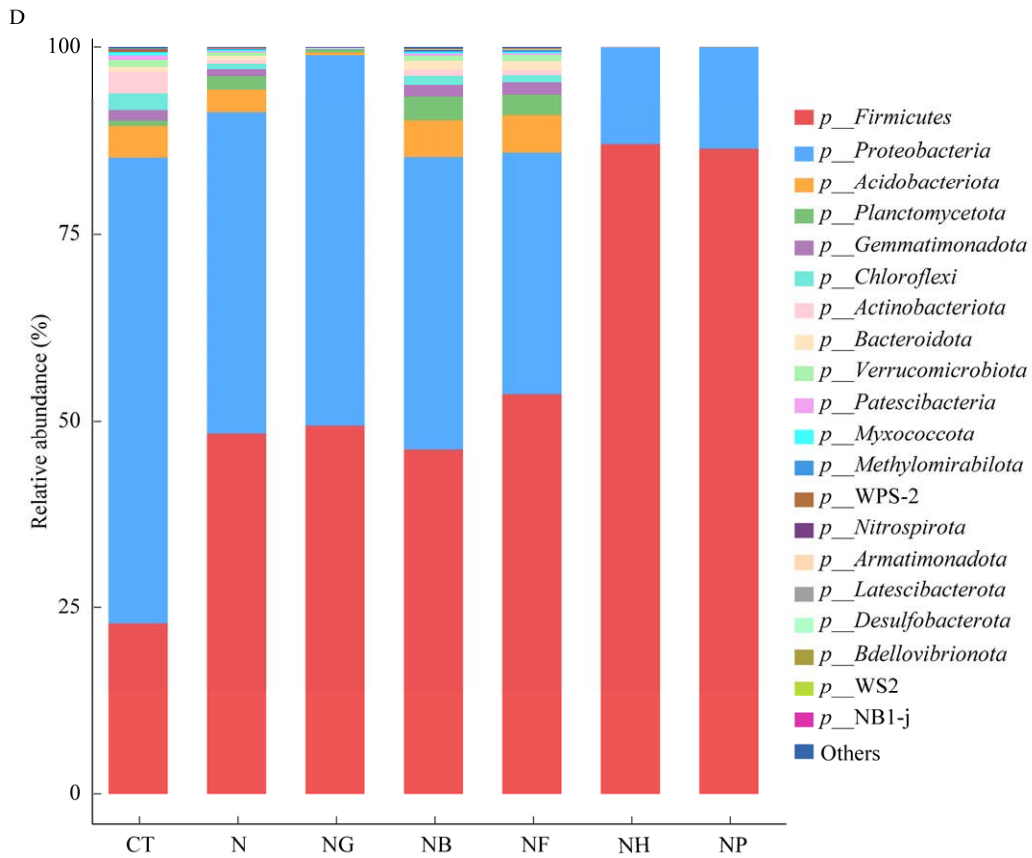
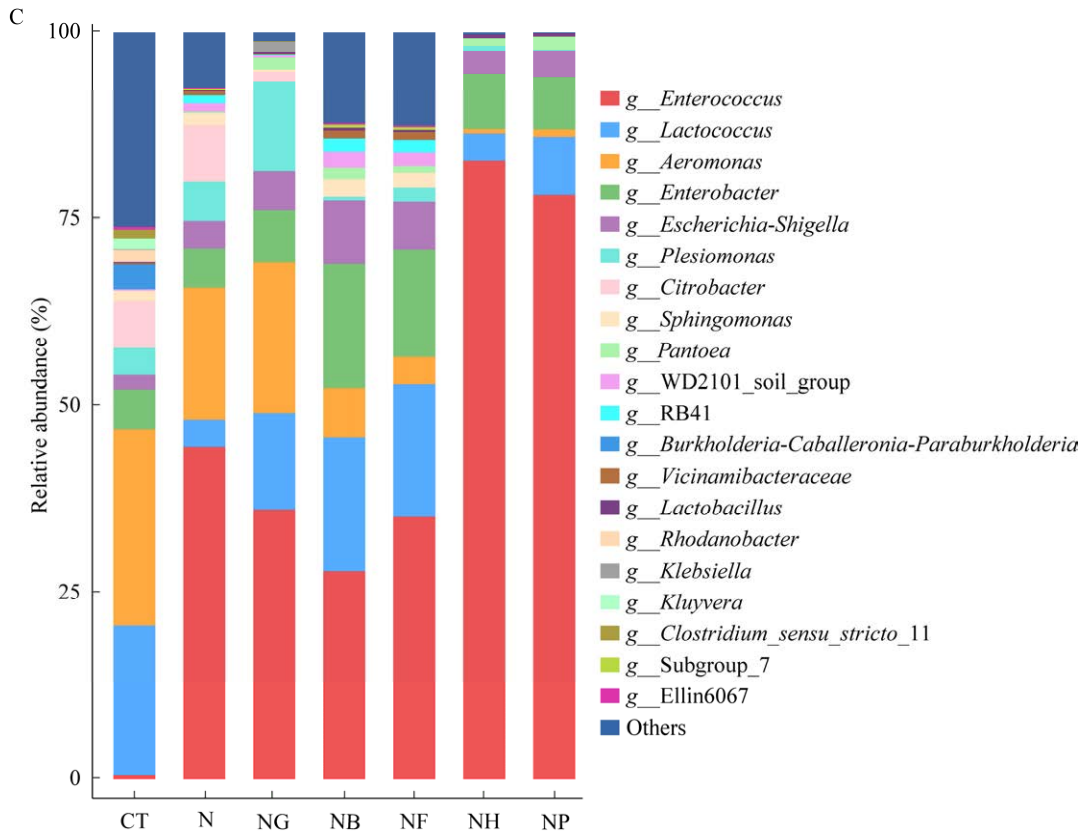
2.5.2 体外发酵液细菌多样性及组成的影响

肠道内容物发酵液中 共有 35 个细菌门和 499 个细菌属, 在门水平上的优势菌分别为变形菌门 (*Proteobacteria*, 62.4%) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*, 22.9%) (图 9A)。在属水平上的优势菌属, 分别为气单胞菌属 (*Aeromonas*, 26.2%)、乳球菌属 (*Lactococcus*, 20%)、柠檬酸杆菌属

(*Citrobacter*, 6.2%) 和肠球菌属 (*Enterococcus*, 5.4%) (图 9B)。在门分类学水平上, CT 组的优势菌群为变形菌门, 厚壁菌门也占有一定的比例; 其余组的优势菌群为厚壁菌门, 变形菌门占比逐渐减少(图 9C)。在属分类学水平上, CT 组的优势菌属为乳球菌属和气单胞菌属, N 和 NF 组的优势菌群为肠球菌属、乳球菌属和气单胞菌属; NH 和 NP 组的优势菌属为肠球菌属(图 9D)。

进一步对 6 个组进行线性判别 [line discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe] 分析, CT 组与其他组间分类群差异较大, 且气单胞菌丰度增加(图 10A)。发现的细菌生物标志物可能具有潜在价值, 筛选标准设置为 LDA>4 且 $P<0.05$ (图 10B)。添加 1% 黄芪多糖和甘露糖后优势菌分别为乳杆菌、厚壁菌门和乳酸乳球菌; 添加 4% 防风多糖后优势菌为产酸杆菌。以上 3 个类群属于有益菌, 而对照组中有显著差异菌数量较多, 分别为有益菌和致病菌。与对照组相比 (图 9E、9F), 添加黄芪多糖、甘露糖、防风多糖、白术多糖、玉屏风多糖后, 门水平上降低了变形菌门、放线菌门的丰度, 提高了厚壁菌门和产酸杆菌门的丰度; 属水平上降低了气单胞菌和伯克霍尔德里亚菌的丰度, 提高了乳球菌、肠杆菌属和乳杆菌的丰度。





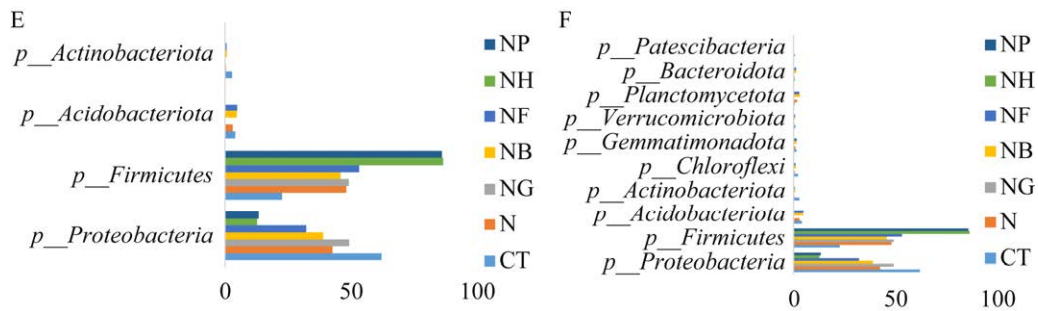


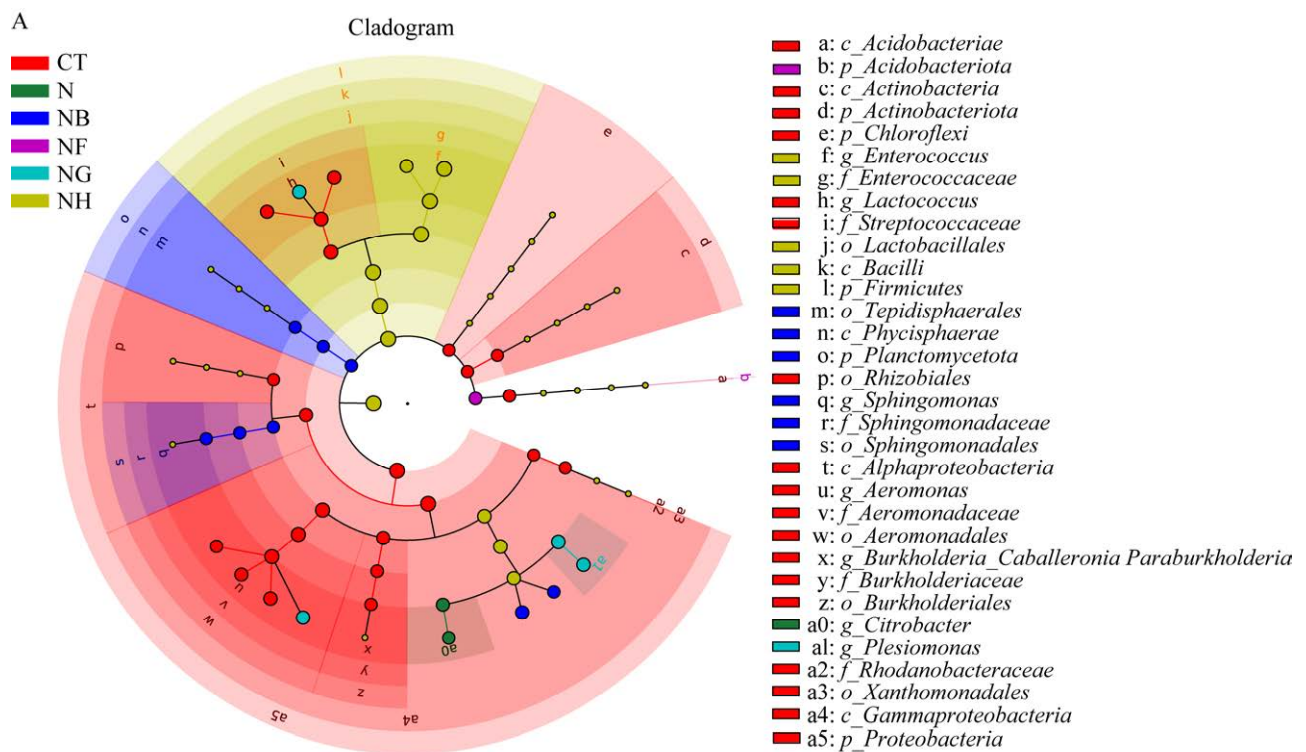
图 9 肠道体外发酵液细菌多样性组成

Figure 9 Bacterial diversity composition of intestinal *in vitro* fermentation broth. A: Percentage of all groups of intestinal bacteria at the phylum level. B: Percentage of all groups of intestinal bacteria at the genus level. C: Abundance of species at the phylum level. D: Abundance of species at the genus level. E: Top four percent of bacteria with differences at the phylum level. F: Top ten percent of bacteria with differences at the genus level.

2.5.3 体外发酵液细菌群落功能预测

对体外发酵样品进行 KEGG 通路富集，细菌群落的生物代谢功能分析表明，共获得 42 种生物代谢，主要包括细胞过程 (cellular processes)、遗传信息处理 (genetic information processing)、代谢 (metabolism)、环境信息处理 (environment information processing)、人类

疾病 (human diseases)、有机系统 (organismal systems) (图 11A)。细菌群落功能主要富集在代谢上，其次是遗传信息处理和环境信息处理通路上。富集前五的通路分别为碳水化合物代谢、氨基酸代谢、膜转运、能量代谢和核苷酸代谢 (图 11B)，由此可知体外发酵液细菌可能主要影响物质代谢。



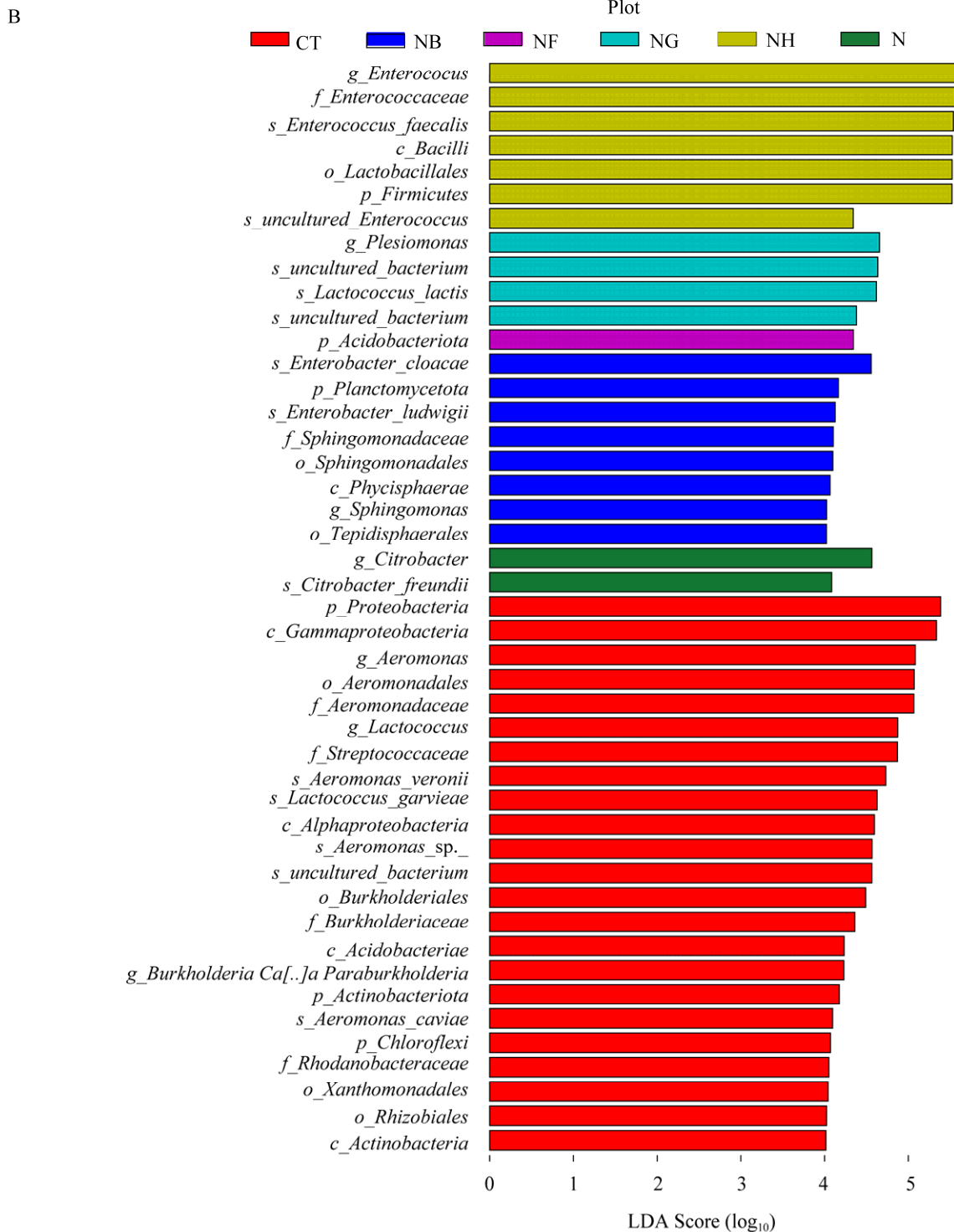


图 10 组间 LEfSe 分析

Figure 10 LEfSe analysis between groups. A: Branching evolution diagram of intestinal bacteria between groups, center point represents the community (bacteria), each ring represents a taxonomic level. P: Phylum; C: Class; O: Order; F: Family; G: Genus. B: The LDA score histogram of different abundance differences between groups. The LDA score represents the influence size and ranking of each different-rich taxon.

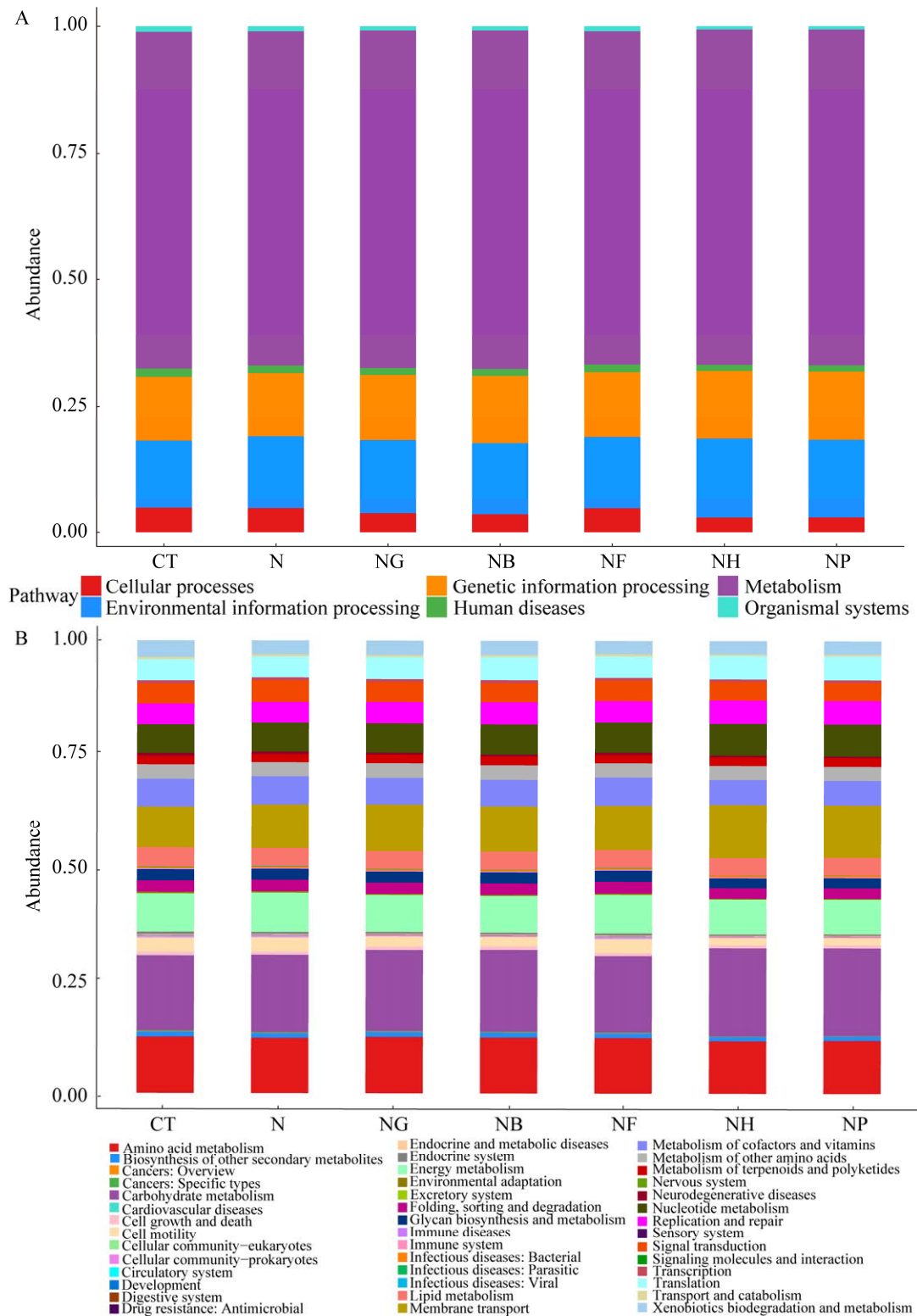


图 11 肠道体外发酵液 KEGG 富集分析

Figure 11 Enrichment analysis of KEGG in intestinal fermentation broth *in vitro*. A: Annotation results of primary access. B: The secondary pathway annotation result.

3 讨论

3.1 不同益生元多糖对凝结芽孢杆菌生长的影响

益生元中含有多糖、低聚糖类、黄酮类、多种微量元素等物质,可促进益生菌生长,并能选择性地促进特定益生菌的增殖,因此可通过体外培养实验进行评价。白术为菊科植物,含有挥发油、内酯、氨基酸、多糖等成分^[32],具有抗氧化、抗过敏、抗炎、抗病毒、免疫调节等特性^[33-34]。Wang 等^[35]的研究发现,白术总多糖促进细胞周期和淋巴细胞增殖效果显著,且增强细胞和体液免疫能力,可作为免疫增强剂的佐剂^[12]。曹俊敏等^[36]的研究发现白术可改善小鼠肠道菌群失调,使肠道 pH 值降低,创造适宜益生菌生长的 pH 环境,促进益生菌在肠道内定殖。本研究结果发现,在肠道内添加 4%白术多糖与凝结芽孢杆菌共培养,降低了培养液的 pH 值,与以上研究结果一致。

多个研究表明,凝结芽孢杆菌能产芽胞耐胃酸等进入肠道定殖^[37]。舒国伟等^[38]的研究发现,黄芪、阿胶、蒺藜、五味子等对益生菌有较好的促增殖效果。益生元被益生菌自身分泌的酶分解利用,从而促进益生菌增殖^[39]。本研究通过 9 种益生元多糖对凝结芽孢杆菌的增殖效果进行筛选,结果发现防风多糖、玉屏风多糖、黄芪多糖、白术多糖、甘露糖这 5 种益生元对凝结芽孢杆菌有较好的促生长作用。

3.2 不同浓度益生元对凝结芽孢杆菌消化酶的影响

细菌通过新陈代谢不断合成菌体成分,如多糖、脂肪、蛋白质以及各种辅酶。淀粉酶是水解淀粉和糖原的酶, α -淀粉酶大量存在于动物、植物和微生物中^[39];蛋白酶由酸性、中性和碱性蛋白酶构成,可水解饲料中蛋白质^[40]。脂肪酶是动物体内重要的消化酶,将脂肪分解为小分子

物质。乳酸是部分细菌增殖过程中产生的有机酸,属于代谢物^[41],通过降低 pH 来抑制某些微生物的生长。Wang 等^[42]的研究表明车前素 E/F 联合乳酸,可抑制嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶是由消化腺和消化系统所分泌起消化作用的酶,具有酶的全部特征^[43],其活性反映鱼体机体的消化能力^[44]。根据益生元不同浓度筛选,其对酶活性的影响发现,4%白术多糖组产乳酸和蛋白酶效果最优,说明白术多糖对凝结芽孢杆菌的增殖发挥重要作用。其中,白术多糖乳酸和总蛋白酶活性显著提高。4%防风多糖组乳酸和脂肪酶活性差异显著($P < 0.05$),这说明防风多糖中某些物质成分能被细菌利用,并提高了乳酸和脂肪酶活性。从防风多糖中分离的物质有 1 000 多种,包括多糖、挥发油、有机酸等,多糖具有抗肿瘤、调节免疫和抗病毒等功效^[45-47]。巩丽虹等^[48]的研究发现防风多糖乙酰化修饰可提高其抗氧化能力。因此,白术多糖和防风多糖组消化酶活性的提高,可能是其中多糖或其他物质成分被凝结芽孢杆菌所利用,并产生了胞外酶促进凝结芽孢杆菌的增殖,其对益生菌的增殖具体作用机制,有待进一步深入研究。

3.3 多糖体外发酵对细菌多样性的影响

凝结芽孢杆菌与肠道内容体外厌氧发酵,是为了模拟在动物体内的环境,因此根据体外发酵来反映其对微生物菌群的影响。本研究发现,凝结芽孢杆菌与虾肠道内容物共发酵,添加黄芪多糖、防风多糖、甘露糖后,从而影响肠道微生物菌群。与对照组相比,分别降低了变形菌门、放线菌门、气单胞菌和伯克霍尔德里亚菌的丰度,提高了厚壁菌门、产酸杆菌门、乳球菌、肠杆菌属和乳杆菌的丰度。

气单胞菌属包括维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)、嗜

水气单胞菌等, 主要引起鱼类运动性气单胞菌败血症的病原之一^[49]。也可通过食物和饮水等方式对人类产生危害, 导致人感染增加^[50]。郭雅萌^[51]的研究发现单味黄芪对嗜水气单胞菌的 MIC 为 2.5 g/mL, 且 25%浓度的黄芪能抑制嗜水气单胞菌生物被膜。李钰^[52]的研究发现, 添加 0.01%的黄芪多糖至饲料中, 斑马鱼体重和肠道厚壁菌门和梭杆菌门的丰度被提高, 且降低了饵料系数。体外模型结果表明凝结芽孢杆菌 GBI-30 促进蛋白质和碳水化合物分解, 且增加可消化乳蛋白^[53-54]。

在水产养殖中, 气单胞菌、变形菌、梭菌属等致病菌导致疾病的发生, 造成经济损失, 危害水生动物的机体健康。在本研究结果中也发现, 防风多糖、黄芪多糖、甘露糖、白术多糖、玉屏风多糖的添加增加了肠道内益生菌乳杆菌、乳酸菌和厚壁菌门等益生菌的丰度; 降低了气单胞菌、变形菌门、伯克霍尔德里亚菌的丰度, 改变了肠道菌群结构。

4 结论

综上所述, 凝结芽孢杆菌能很好地利用白术多糖、黄芪多糖、防风多糖和甘露糖。其中 4%白术多糖作为碳源显著提高了凝结芽孢杆菌的增殖, 4%白术多糖凝结芽孢杆菌与肠道内容物共发酵, 降低发酵液的 pH, 显著提高了乳酸、 α -淀粉酶、总蛋白酶活性。而 1%黄芪多糖、4%防风多糖、1%甘露糖在体外厌氧发酵中, 改善了肠道菌群结构。凝结芽孢杆菌发酵 4%白术多糖具有较好的产酶性能与益生特性, 二者协同作用机制有待下一步深入研究。

参考文献

- [1] 孙冬岩, 孙笑非, 王文娟, 潘宝海. 益生元在消化道健康中的应用研究进展[J]. 饲料研究, 2020, 43(4): 120-122.
- [2] SUN DY, SUN XF, WANG WJ, PAN BH. Research progress on the application of prebiotics in digestive tract health[J]. Feed Research, 2020, 43(4): 120-122 (in Chinese).
- [3] 吴越. 三种益生元对珍珠龙胆石斑鱼和卵形鲳鲷生长及免疫的影响[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2019.
- [4] WU Y. Effects of three prebiotic on growth and immunity of hybrid grouper (*♀Epinephelus fuscoguttatus* × *♂ Epinephelus lanceolatu*) and *Trachinotus ovatus*[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2019 (in Chinese).
- [5] GIBSON GR, ROBERFROID MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics[J]. The Journal of Nutrition, 1995, 125(6): 1401-1412.
- [6] CARLSON JL, ERICKSON JM, HESS JM, GOULD TJ, SLAVIN JL. Prebiotic dietary fiber and gut health: comparing the *in vitro* fermentations of beta-glucan, inulin and xylooligosaccharide[J]. Nutrients, 2017, 9(12): 1361.
- [7] 王辉. 益生元应用研究进展[J]. 食品安全导刊, 2016(3): 87-88.
- [8] WANG H. Research progress on application of prebiotics[J]. China Food Safety Magazine, 2016(3): 87-88 (in Chinese).
- [9] PANDEY KR, NAIK SR, VAKIL BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(12): 7577-7587.
- [10] BIRD AR, CONLON MA, CHRISTOPHERSEN CT, TOPPING DL. Resistant starch, large bowel fermentation and a broader perspective of prebiotics and probiotics[J]. Beneficial Microbes, 2010, 1(4): 423-431.
- [11] MARTÍNEZ I, KIM J, DUFFY PR, SCHLEGEL VL, WALTER J. Resistant starches types 2 and 4 have differential effects on the composition of the fecal microbiota in human subjects[J]. PLoS One, 2010, 5(11): e15046.
- [12] TEFERRA TF. Possible actions of inulin as prebiotic polysaccharide: a review[J]. Food Frontiers, 2021, 2(4): 407-416.
- [13] ZHAO XN, SUN WJ, ZHANG SJ, MENG GJ, QI CH, FAN WT, WANG YG, LIU JZ. The immune adjuvant response of polysaccharides from *Atractylodes macrocephalae* Koidz in chickens vaccinated against Newcastle disease (ND)[J]. Carbohydrate Polymers,

- 2016, 141: 190-196.
- [11] SUN WJ, MENG K, QI CH, YANG XY, WANG YG, FAN WT, YAN ZG, ZHAO XN, LIU JZ. Immune-enhancing activity of polysaccharides isolated from *Atractylodes macrocephalae* Koidz[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 126: 91-96.
- [12] FLINT JF, GARNER MR. Feeding beneficial bacteria: a natural solution for increasing efficiency and decreasing pathogens in animal agriculture[J]. *Journal of Applied Poultry Research*, 2009, 18(2): 367-378.
- [13] KUEBUTORNYE FKA, DELWIN ABARIKE E, LU YS. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 820-828.
- [14] KUEBUTORNYE FKA, ABARIKE ED, LU YS, HLORDZI V, SAKYI ME, AFRIYIE G, WANG ZW, LI Y, XIE CX. Mechanisms and the role of probiotic *Bacillus* in mitigating fish pathogens in aquaculture[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, 46(3): 819-841.
- [15] SOLTANI M, GHOSH K, HOSEINIFAR SH, KUMAR V, LYMBERY AJ, ROY S, RINGØ E. Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish[J]. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 2019, 27(3): 331-379.
- [16] 王俊, 张娴静, 林旭吟. 凝结芽孢杆菌对小白虾生长性能、血清抗氧化及非特异性免疫指标的影响[J]. *饲料研究*, 2022, 45(14): 50-53.
WANG J, ZHANG XJ, LIN XY. Effects of *Bacillus coagulans* on growth performance, serum antioxidant and nonspecific immune indexes of white shrimp[J]. *Feed Research*, 2022, 45(14): 50-53 (in Chinese).
- [17] 单金峰, 吴春, 丁辰龙. 凝结芽孢杆菌对养殖水质及青虾肠道菌群、非特异性免疫指标和抗病力的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2019, 34(5): 629-635.
SHAN JF, WU C, DING CL. Effects of *Bacillus coagulans* on water quality, intestinal microflora, non-specific immunity and disease resistance of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(5): 629-635 (in Chinese).
- [18] AI F, HUANG XD, WU YL, JI C, GAO YF, YU T, YAN FJ. Alleviative effects of a novel strain *Bacillus coagulans* XY2 on copper-induced toxicity in zebrafish larvae[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2023, 125: 750-760.
- [19] LIU CR, RADEBE SM, ZHANG H, JIA JP, XIE S, SHI ML, YU QH. Effect of *Bacillus coagulans* on maintaining the integrity intestinal mucosal barrier in broilers[J]. *Veterinary Microbiology*, 2022, 266: 109357.
- [20] FU RQ, CHEN DW, TIAN G, ZHENG P, MAO XB, YU J, HE J, HUANG ZQ, LUO YH, YU B. Effect of dietary supplementation of *Bacillus coagulans* or yeast hydrolysates on growth performance, antioxidant activity, cytokines and intestinal microflora of growing-finishing pigs[J]. *Animal Nutrition*, 2019, 5(4): 366-372.
- [21] 李雅丽, 王默涵, 赵雯, 段素芳, 刘伟贤, 陈萌, 刘义凤, 段盛林, 洪维鍊. 益生菌与益生元组合的筛选及体外发酵特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(7): 50-57.
LI YL, WANG MH, ZHAO W, DUAN SF, LIU WX, CHEN M, LIU YF, DUAN SL, HONG WL. *In vitro* fermentation characteristics by different combination of probiotics and prebiotics[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(7): 50-57 (in Chinese).
- [22] SCOTT KP, GRATZ SW, SHERIDAN PO, FLINT HJ, DUNCAN SH. The influence of diet on the gut microbiota[J]. *Pharmacological Research*, 2013, 69(1): 52-60.
- [23] BELENGUER A, DUNCAN SH, CALDER AG, HOLTROP G, LOUIS P, LOBLEY GE, FLINT HJ. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3593-3599.
- [24] RYAN SM, FITZGERALD GF, van SINDEREN D. Screening for and identification of starch-, amylopectin, and pullulan-degrading activities in bifidobacterial strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5289-5296.
- [25] ROSSI M, CORRADINI C, AMARETTI A, NICOLINI M, POMPEI A, ZANONI S, MATTEUZZI D. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by *Bifidobacteria*: a comparative study of pure and fecal cultures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(10): 6150-6158.
- [26] 孙梅, 陈秋红, 张维娜, 夏飞, 高亮, 施大林, 匡群, 张宪中, 邹三元. 一种具有水产病原菌拮抗特性的凝结芽孢杆菌及其应用: CN10552485[P]. 2019-03-12.
SUN M, CHEN QH, ZHANG WN, XIA F, GAO L, SHI DL, KUANG Q, ZHANG XZ, ZOU SY. *Bacillus coagulans* having aquatic pathogen antagonistic

- characteristic and application of *Bacillus coagulans*: CN10552485[P]. 2019-03-12 (in Chinese).
- [27] 张维娜, 夏飞, 谢骏, 高亮, 孙梅, 陈秋红, 匡群, 邹苏艳, 张宪中. 凝结芽孢杆菌 JSSW-07 对异育银鲫生长及免疫功能的影响[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 630-637.
ZHANG WN, XIA F, XIE J, GAO L, SUN M, CHEN QH, KUANG Q, ZOU SY, ZHANG XZ. Growth and immunity of *Carassius gibelio* in response to *Bacillus coagulans* JSSW-07[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2015, 31(3): 630-637 (in Chinese).
- [28] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 85-89.
SHEN P, CHEN XD. Microbiological Experiment[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2007: 85-89 (in Chinese).
- [29] 石梦玄, 张璐, 田美玲, 陈芳. 基于体外模拟肠道微生物体系比较不同果蔬全粉的益生元功效[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 87-94.
SHI MX, ZHANG L, TIAN ML, CHEN F. The comparison of prebiotic roles of different vegetable and fruit powders using *in vitro* simulation intestinal microecology system[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(2): 87-94 (in Chinese).
- [30] EDGAR RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [31] RICHARDS LE, JOLLIFFE IT. Principal component analysis[J]. Journal of Marketing Research, 1988, 25(4): 410.
- [32] CAI H, XU ZW, LUO SC, ZHANG WW, CAO G, LIU X, LOU YJ, MA XQ, QIN KM, CAI BC. Study on chemical fingerprinting of crude and processed *Atractylodes macrocephala* from different locations in Zhejiang Province by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with hierarchical cluster analysis[J]. Pharmacognosy Magazine, 2012, 8(32): 300-307.
- [33] LI RL, SAKWIWATKUL K, LI YT, HU SH. Enhancement of the immune responses to vaccination against foot-and-mouth disease in mice by oral administration of an extract made from *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* (RAM)[J]. Vaccine, 2009, 27(15): 2094-2098.
- [34] WANG CC, LIN SY, CHENG HC, HOU WC. Pro-oxidant and cytotoxic activities of atractylenolide I in human promyeloleukemic HL-60 cells[J]. Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2006, 44(8): 1308-1315.
- [35] WANG CH, DUAN HJ, HE LC. Inhibitory effect of atractylenolide I on angiogenesis in chronic inflammation *in vivo* and *in vitro*[J]. European Journal of Pharmacology, 2009, 612(1/2/3): 143-152.
- [36] 曹俊敏, 杨雪静, 张伟珍. 茯苓等 4 种中药扶植实验小鼠肠道正常菌群生长及其机理的初步研究[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(2): 393-395.
CAO JM, YANG XJ, ZHANG WZ. Study on the effect and mechanism of Chinese herbs on intestinal normal flora of mice[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2012, 30(2): 393-395 (in Chinese).
- [37] LIN SM, MAO SH, GUAN Y, LUO L, LUO L, PAN Y. Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*)[J]. Aquaculture, 2012, 342/343: 36-41.
- [38] 舒国伟, 吕嘉栎, 陈合, 郑艳. 中药提取物等益生菌增菌物质研究进展[J]. 食品科技, 2009, 34(10): 162-165.
SHU GW, LV JL, CHEN H, ZHENG Y. Research development of extract of traditional Chinese medicine as growth-promoting factor of probiotics[J]. Food Science and Technology, 2009, 34(10): 162-165 (in Chinese).
- [39] 孙佑赫, 周开艳, 熊智. 一株产 α -淀粉酶细菌的分离、鉴定及酶学性质初步研究[J]. 华北农学报, 2012, 27(S1): 250-253.
SUN YH, ZHOU KY, XIONG Z. Screening, identification and characterization of an α -amylase-producing *Bacillus subtilis* 02[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2012, 27(S1): 250-253 (in Chinese).
- [40] 李雪, 蔡丹, 沈月, 何音华, 盛悦. 微生物来源蛋白酶的研究进展[J]. 食品科技, 2019, 44(1): 32-36.
LI X, CAI D, SHEN Y, HE YH, SHENG Y. Research progress on microbial-derived proteases[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(1): 32-36 (in Chinese).
- [41] 喻江南, 宋铃榆, 杨红, 冉苏叶, 刘琦. 肠道菌群代谢产物琥珀酸对非酒精性脂肪性肝病小鼠的影响[J]. 疑难病杂志, 2022, 21(9): 976-980.
YU JN, SONG LY, YANG H, RAN SY, LIU Q. Effects of gut microbiota metabolite succinate on nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. Chinese Journal of Difficult and Complicated Cases, 2022, 21(9): 976-980 (in Chinese).

- [42] WANG Y, WEI YL, SHANG N, LI PL. Synergistic inhibition of plantaricin E/F and lactic acid against *Aeromonas hydrophila* LPL-1 reveals the novel potential of class IIb bacteriocin[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 774184.
- [43] 刘敏, 张辉. 鱼类消化酶的研究进展[J]. *渔业经济研究*, 2008(6): 6-10.
LIU M, ZHANG H. Research progress on the digestive enzyme of the fish[J]. *Fisheries Economy Research*, 2008(6): 6-10 (in Chinese).
- [44] 敬庭森, 周明瑞, 李哲, 李玉林, 孙文波, 梁钧畑, 王新靓, 叶华, 成廷水, 罗辉. 大豆小肽蛋白替代鱼粉对黄颡鱼幼鱼生长性能、消化酶活性和抗氧化功能的影响[J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(5): 149-157.
JING TS, ZHOU MR, LI Z, LI YL, SUN WB, LIANG JT, WANG XL, YE H, CHENG TS, LUO H. Effects of fish meal replacement with soy peptide protein on the growth performance, digestive enzymes, and antioxidant capacity of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(5): 149-157 (in Chinese).
- [45] 宋超, 宋淑亮, 刘学红. 天然降血糖多糖的研究进展[J]. *山东医药*, 2011, 51(41): 113-114.
SONG C, SONG SL, LIU XH. Research progress of natural hypoglycemic polysaccharides[J]. *Shandong Medical Journal*, 2011, 51(41): 113-114 (in Chinese).
- [46] 李爽, 袁菱, 马双双, 杨青, 童德银. 多糖的化学结构及活性研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2017, 32(6): 818-820.
LI S, YUAN L, MA SS, YANG Q, TONG DY. Research progress on pharmacological activity and chemical structure of polysaccharide[J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2017, 32(6): 818-820 (in Chinese).
- [47] 陈圣阳, 刘旺景, 曹琪娜, 敖长金. 植物多糖的生物学活性研究进展[J]. *饲料工业*, 2016, 37(22): 60-64.
CHEN SY, LIU WJ, CAO QN, AO CJ. Research advancement in bioactivity of polysaccharides from plants[J]. *Feed Industry*, 2016, 37(22): 60-64 (in Chinese).
- [48] 巩丽虹, 徐红纳, 刘嘉祺, 李文超. 防风多糖 USPS 乙酰化修饰及其抗氧化活性[J]. *食品工业*, 2019, 40(10): 200-203.
GONG LH, XU HN, LIU JQ, LI WC. Acetylation modification and antioxidant activity of a polysaccharide USPS from *Radix saposhnikoviae*[J]. *The Food Industry*, 2019, 40(10): 200-203 (in Chinese).
- [49] AUSTIN B, AUSTIN DA. *Aeromonadaceae* representatives (*Motile Aeromonads*)[M]//*Bacterial Fish Pathogens*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012: 119-146.
- [50] 康元环, 陈亨利, 张冬星, 张海月, 安鼎杰, 田佳鑫, 贾俊鹏, 孙武文, 单晓枫, 钱爱东. 维氏气单胞菌 TH0426 株外膜蛋白 *lamB* 基因的原核表达及其免疫原性分析[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(12): 2333-2338, 2343.
KANG YH, CHEN HL, ZHANG DX, ZHANG HY, AN DJ, TIAN JX, JIA JP, SUN WW, SHAN XF, QIAN AD. Prokaryotic expression and immunogenicity detection of outer membrane protein *lamB* gene of *Aeromonas veronii* TH0426[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(12): 2333-2338, 2343 (in Chinese).
- [51] 郭雅萌. 抗嗜水气单胞菌三味中药水煎液及联用对鲫鱼免疫效果的评价[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2021.
GUO YM. Evaluation of anti-*Aeromonas hydrophila* three-flavored traditional Chinese medicine decoction and combination on the immune effect of crucian carp[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [52] 李钰. 利用斑马鱼模型研究 3 种天然多糖抗鲤春病毒血症病毒效应机制[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2021.
LI Y. Study on the mechanism of three natural polysaccharides against SVCV infection in zebrafish[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [53] KELLER D, FARMER S, McCARTNEY A, GIBSON G. *Bacillus coagulans* as a probiotic[J]. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, 2010, 7(7): 103-109.
- [54] JÄGER R, PURPURA M, FARMER S, CASH HA, KELLER D. Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 improves protein absorption and utilization[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018, 10(4): 611-615.