



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113088468 B

(45) 授权公告日 2022.06.03

(21) 申请号 202110385048.9

A61P 31/04 (2006.01)

(22) 申请日 2021.04.09

C12R 1/245 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113088468 A

(56) 对比文件

CN 106497828 A, 2017.03.15

CN 108251325 A, 2018.07.06

(43) 申请公布日 2021.07.09

CN 1556853 A, 2004.12.22

(83) 生物保藏信息

CGMCC No.18922 2019.11.08

CN 104522648 A, 2015.04.22

CN 106399162 A, 2017.02.15

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

CN 109924360 A, 2019.06.25

CN 110150535 A, 2019.08.23

(72) 发明人 马曦 张钰成 姬琳堡 孙美鸽

CN 110317758 A, 2019.10.11

CN 111363698 A, 2020.07.03

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

CN 111836625 A, 2020.10.27

CN 112369500 A, 2021.02.19

专利代理师 商秀玲

李彦伸等. 霉菌毒素检测与脱毒技术研究进展.《食品安全质量检测学报》.2020,(第12期),摘要.

李平兰等. 微生态制剂中常用乳酸菌对抗生素的敏感性研究.《中国农业大学学报》.(第01期),摘要.

审查员 邵文博

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23K 10/18 (2016.01)

A23K 50/30 (2016.01)

A23K 50/60 (2016.01)

A23L 33/135 (2016.01)

A23L 5/20 (2016.01)

A23L 3/3571 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1及其应用

(57) 摘要

本发明涉及微生物技术领域,具体涉及干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1及其应用。本发明提供干酪乳杆菌(Lactobacillus casei) Ma.GLRGJ 1,该菌株保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.18922。干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1能够耐受pH 2.0以上的酸性环境并在该环境下生长,耐胆盐能力强;具有较好的抑菌和降解霉菌毒素的作用;将干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1制成菌剂后用于饲喂动物效果安全可靠,在促进营养物质消化吸收,提高饲料转化效率,促进生长方面具有积极作用。

CN 113088468 B

1. 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1, 其特征在于, 其保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为CGMCC No.18922。

2. 含有权利要求1所述的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1的菌剂。

3. 含有权利要求1所述的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1或权利要求2所述菌剂的动物饲料添加剂或动物饲料。

4. 含有权利要求1所述的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1或权利要求2所述菌剂的药物。

5. 含有权利要求1所述的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1或权利要求2所述菌剂的防腐剂。

6. 权利要求1所述的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1或权利要求2所述的菌剂或权利要求5所述的防腐剂在非治疗目的的抑菌防腐中的应用。

7. 权利要求1所述的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1或权利要求2所述的菌剂或权利要求3所述的动物饲料添加剂或动物饲料或权利要求4所述的药物或权利要求5所述的防腐剂在非治疗目的的呕吐毒素降解中的应用。

8. 权利要求1所述的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1或权利要求2所述的菌剂或权利要求3所述的动物饲料添加剂或动物饲料或权利要求4所述的药物或权利要求5所述的防腐剂在提高动物采食量、提高饲料转化效率、促进动物生长或促进动物增重中的应用。

9. 权利要求1所述的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1或权利要求2所述的菌剂在制备用于提高动物抗病力的动物饲料添加剂、动物饲料或药物中的应用。

10. 权利要求1所述的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1或权利要求2所述的菌剂在制备动物饲料添加剂、动物饲料、防腐剂或药物中的应用。

11. 含干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1菌剂的制备方法, 其特征在于, 将权利要求1所述的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1发酵培养, 得到发酵液, 分离所述发酵液的沉淀, 将所述沉淀与菌剂辅料混合。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其特征在于, 所述发酵培养所用的培养基包括如下组分: 酵母膏20g/L、葡萄糖25g/L、氯化钠2-3g/L、硫酸锌0.1-0.2g/L、硫酸锰0.6-0.7g/L、硫酸镁0.8-1.2g/L、番茄汁15-20g/L和消泡剂0.05-0.08%。

干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,具体涉及干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1及其应用。

背景技术

[0002] 微生态制剂,也称为活菌制剂,是指运用微生物生态学原理,利用对宿主有益无害的益生菌或益生菌的促生长物质,经特殊工艺制成的制剂。微生态制剂已被应用于饲料、农业、医药保健和食品等各领域。在饲料工业中广泛应用的微生物包括植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌等,在食品中广泛应用的微生物包括乳酸菌、双歧杆菌、肠球菌和酵母菌等。家禽家畜养殖业中微生态制剂已经在逐步地取代传统的添加剂。在未来,微生态制剂作为遵循生态环境自然循环法则的无公害制剂,将成为添加剂行业的一种发展趋势。

[0003] 微生态制剂理想的可直接饲用的菌种应该是:①不会使人和动物致病,不与病原微生物产生杂交种;②在体内外易于繁殖,体外繁殖速度快;③在低pH和胆汁中可以存活,并能植入肠黏膜;④在发酵过程中能产生乳酸和过氧化氢等物质;⑤能合成对大肠杆菌、沙门氏菌、葡萄球菌、梭状芽孢杆菌等肠道致病菌的抑制物而不影响自己的活性;⑥最好来自动物自身肠道中;⑦有利于促进宿主的生长发育及提高抗病能力。

[0004] 干酪乳杆菌分泌的乳酸菌素是天然肽类防腐剂的一大来源。干酪乳杆菌能够抑制和杀死食品、饲料中的许多腐败菌及致病菌,并且不影响食物、饲料性状,甚至能够改善食品、饲料特性,因此将其作为发酵剂添加到食品、饲料中能使产品更加优质,且对食品储藏过程中的防腐保鲜也能起到积极作用。干酪乳杆菌进入人和畜禽体内后可在肠道内大量存活,起到调节肠道菌群平衡、促进人体消化吸收等作用。同时,干酪乳杆菌具有高效降血压、降胆固醇,促进细胞分裂,产生抗体免疫,增强人体免疫及预防癌症和抑制肿瘤生长等功能;还具有缓解乳糖不耐症、过敏等益生保健作用。基于干酪乳杆菌对其宿主营养、免疫、防病等具有显著的益生功效,开发具有耐酸、耐胆盐、抑菌、毒素降解等性能的干酪乳杆菌具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种兼具益生性、抑菌功能和降解霉菌毒素能力的饲用干酪乳杆菌及其应用,本发明提供的干酪乳杆菌耐酸、耐胆盐、且具有优异的抑菌和降解霉菌毒素能力。

[0006] 具体地,本发明提供以下技术方案:

[0007] 第一方面,本发明提供一种干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1,该菌是从北京市某养猪实验基地的猪肠道中分离并经过紫外诱变后筛选得到的。经16S rRNA基因序列分析,菌株Ma.GLRGJ 1为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)。该菌株已于2019年11月08日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),分类命名为干酪乳杆菌*Lactobacillus casei*,保藏编号为CGMCC No.18922。

[0008] 干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的微生物学特性为:革兰氏阳性菌,细胞形态为杆状,杆末端呈圆形,无芽孢;单菌落大小 $\leq 1\text{mm}$,颜色呈乳白色,不透明,菌落表面光滑湿润,边缘整齐,有光泽。菌体可在pH值2.0以上的酸性环境生长,耐胆盐能力强。且具有一定的抑菌能力,特别是抑制嗜水气单胞菌和沙门氏菌效果明显。

[0009] 第二方面,本发明提供含有所述干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的菌剂。

[0010] 本发明所述的菌剂可以为液体菌剂或固体菌剂,可采用常规技术手段、加入微生物制剂领域允许的辅料制备得到。

[0011] 第三方面,本发明提供含有所述干酪乳杆菌或其菌剂的动物饲料添加剂或动物饲料。

[0012] 优选地,所述饲料添加剂中干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的活菌数为 $1 \times 10^6\text{CFU/g}$ - $1 \times 10^{10}\text{CFU/g}$ 。更优选地,含有的干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1饲料添加剂的活菌数为 $1 \times 10^8\text{CFU/g}$ - $1 \times 10^9\text{CFU/g}$ 。

[0013] 所述动物饲料中干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的活菌数为 $1 \times 10^5\text{CFU/kg}$ - $1 \times 10^8\text{CFU/kg}$,优选 $1 \times 10^7\text{CFU/kg}$ - $1 \times 10^8\text{CFU/kg}$ 。

[0014] 本发明通过体外法鉴定了干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的益生效果,结果表明,干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1能够耐酸、耐胆盐,能抵抗胃肠道的内环境,具备益生菌的潜力。

[0015] 第四方面,基于干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1具有突出的抑菌特性,含有干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1或其菌剂的药物,特别是抑菌类药物属于本发明的保护范围。

[0016] 基于干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1具有突出的降解霉菌毒素特性,含有干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1或其菌剂的药物,特别是降解呕吐毒素类药物属于本发明的保护范围。

[0017] 第五方面,本发明提供含有所述干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1或其菌剂的防腐剂。

[0018] 第六方面,本发明提供所述干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1或其菌剂或所述动物饲料添加剂或动物饲料或所述药物或所述防腐剂在抑菌防腐中的应用,包括非治疗目的的应用。

[0019] 以上所述的应用,所述抑菌针对的细菌优选为革兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌,包括但不限于气单胞菌属(Aeromonas)、枸橼酸杆菌属(Citrobacter)、沙门氏菌属(Salmonella)细菌、埃希氏菌属(Escherichia)细菌、葡萄球菌属(Staphylococcus)细菌,更优选为嗜水气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌、沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌。

[0020] 第七方面,本发明提供所述干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1或其菌剂或所述动物饲料添加剂或动物饲料或所述药物或所述防腐剂在微生物毒素降解中的应用。

[0021] 优选地,所述微生物毒素为霉菌毒素。更优选为呕吐毒素。

[0022] 第八方面,本发明提供所述干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1或其菌剂或所述动物饲料添加剂或动物饲料或所述药物或所述防腐剂在提高动物采食量、提高饲料转化效率、促进动物生长、促进动物增重或提高动物抗病力中的应用。

[0023] 第九方面,本发明提供所述干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1或其菌剂在制备动物饲料添加剂、动物饲料、防腐剂、食品、药物或保健品中的应用。

[0024] 第十方面,本发明提供含干酪乳杆菌(Lactobacillus casei)Ma.GLRGJ 1菌剂的制备方法,具体为:将干酪乳杆菌(Lactobacillus casei)Ma.GLRGJ 1发酵培养,得到发酵液,分离发酵液的沉淀,将所述沉淀与菌剂辅料混合。

[0025] 优选地,发酵培养所用的培养基包括如下组分:酵母膏20g/L、葡萄糖25g/L、氯化

钠2-3g/L、硫酸锌0.1-0.2g/L、硫酸锰0.6-0.7g/L、硫酸镁0.8-1.2g/L、番茄汁15-20g/L和消泡剂0.05-0.08% (V/V)。

[0026] 优选地,发酵培养的条件为:37℃,转速200rpm搅拌条件下,通入氮气和氢气体积比为9:1的混合气体,发酵培养30h。

[0027] 所述菌剂辅料包括但不限于冻干保护剂等。

[0028] 作为本发明的一种实施方式,所述菌剂的制备方法为:发酵培养干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1,发酵液离心取沉淀,得到菌泥,与冻干保护剂混合后,冷冻干燥。

[0029] 所述冻干保护剂可以是:10%脱脂奶粉+6%乳糖。菌泥与冻干保护剂的用量比例按g:mL计为3:1。

[0030] 本发明的有益效果在于:

[0031] 本发明提供的干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1能够耐受pH 2.0以上的酸性环境并在该环境下生长,耐胆盐能力强。干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1具有较好的抑菌作用,在本发明的一个具体实施方式中,显示了干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1对沙门氏菌CVCC1791、金黄色葡萄球菌CVCC1882、弗氏柠檬酸杆菌、嗜水气单胞菌bio-52500的抑菌效果十分明显,抑菌圈大小分别为2.7cm、2.2cm、2.3cm、2.0cm,对大肠杆菌K88也具有一定的抑菌效果,抑菌圈达到1.4cm。干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1具有突出的降解霉菌毒素的作用,在本发明的一个具体实施方式中,干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1对呕吐毒素的降解率为77.40%。

[0032] 干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1还具有提高动物采食量、提高饲料利用率、促进饲料中营养物质的消化吸收的作用;以及增强动物免疫功能、提高动物日增重,降低料肉比的作用;同时,干酪乳杆菌Ma.GLRGJ1具有较高的安全性。该菌作为微生态制剂具有无污染、无残留、生物环保等特点,在促进动物生长和提高动物体重方面具有显著的效果。

附图说明

[0033] 图1为本发明实施例1中干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的菌落形态图。

[0034] 图2为本发明实施例1中干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的革兰氏染色图。

[0035] 图3为本发明实施例2中干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的耐酸性检测结果。

[0036] 图4为本发明实施例2中干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的耐胆盐检测结果。

[0037] 图5为本发明实施例2中干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的抑菌试验结果。

[0038] 图6为本发明实施例3中干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的生长曲线。

具体实施方式

[0039] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0040] 以下实施例中使用的MRS培养基配制方法如下:称取蛋白胨10g,牛肉膏粉5g,酵母膏粉4g,葡萄糖20g,吐温-80 1.08g,磷酸氢二钾2g,乙酸钠5g,柠檬酸三铵2g,硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.2g,硫酸锰($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) 0.05g,琼脂15g,用蒸馏水定容至1L,调节pH至6.2。放入灭菌锅中121℃,灭菌20分钟。

[0041] 实施例1干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)Ma.GLRGJ 1的分离与鉴定

[0042] 一、菌株Ma.GLRGJ 1的分离

[0043] 1、菌株的分离培养

[0044] 取1g来自北京市海淀区中国农业大学养猪实验基地的猪的肠道食糜样品装入有9ml生理盐水的试管中,漩涡器震荡混匀,即为1:10稀释液,再取稀释液进行10倍递增稀释,然后选择3个适宜梯度的稀释液各1ml涂布于MRS培养基上。37℃培养48-72小时,观察并记录菌落形态,挑取长势良好的单菌落,进行划线分离纯化。用生理盐水配制菌悬液。

[0045] 2、菌株的紫外诱变与筛选

[0046] 将灭菌后的MRS培养基倒入培养皿中,待凝固后,取步骤1所得的菌悬液涂布于平板上,每个培养皿控制菌落在50-80个左右,培养12小时后,距离紫外灯20cm,诱变40s。

[0047] 挑取诱变后的菌株,接种于MRS液体培养基中,培养24小时,测定OD值,选取生长速度较快的菌株,取适量的菌悬液涂布于MRS平板上,在37℃恒温培养箱中培养至24小时,进行下一步革兰氏染色。

[0048] 3、菌株的革兰氏染色

[0049] 在载玻片上滴一滴经灭菌的蒸馏水,挑取一个诱变后生长速度较快的单菌落(菌落形态图见图1)在水中溶解,经刮片后,在酒精灯上烘干固定。滴加结晶紫染色液,染2min,水洗,自然晾干;滴加碘液媒染2min,水洗,自然晾干;滴加碱性品红乙醇溶液50S,水洗,自然晾干;在普通光学显微镜上观察,若菌体呈紫色为阳性,菌体呈红色为阴性,结果见图2。选取革兰氏阳性杆菌进行下一步芽孢染色实验。

[0050] 4、菌株的芽孢染色

[0051] 取经步骤2诱变后生长速度较快的菌株,在载玻片上滴一滴经灭菌的蒸馏水,挑取一个单菌落在水中溶解,经刮片后,在酒精灯上烘干固定。滴加5%孔雀石绿溶液3-5滴,在酒精灯上加热3-5min,注意不能使液体沸腾或者干枯,水洗,自然晾干;滴加蕃红溶液染色2min,水洗,自然晾干;在普通光学显微镜下观察,芽孢呈绿色,菌体呈红色。通过步骤1-4的分离筛选,最终获得一株革兰氏染色阳性,无芽孢的菌株。将该菌株编号为Ma.GLRGJ 1。

[0052] 二、菌株Ma.GLRGJ 1的鉴定

[0053] 1、形态学鉴定

[0054] 处于对数生长期且菌落大小稳定的菌株Ma.GLRGJ 1的单菌落描述如下:单菌落大小为 ≤ 1 mm,圆形,颜色呈乳白色,不透明,菌落表面湿润光滑,边缘规则。

[0055] 接着,对处于对数生长期的菌株Ma.GLRGJ 1进行染色,采用光学显微镜观察菌体形态。分离并筛选到的菌株Ma.GLRGJ 1,革兰氏染色呈阳性,细胞形态为杆状,无芽孢。

[0056] 2、16S rRNA基因序列同源性分析

[0057] 细菌总DNA的提取采用天根生化科技有限公司的细菌基因组DNA提取试剂盒提取。提取后的样品送到上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。将测定结果在GenBank数据库中进行BLAST同源性比对,确定菌种类别为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)。测序结果见SEQ ID NO:1。

[0058] 经16S rRNA基因测序,根据测序结果以及上述微生物学特征及理化特性,将该菌鉴定为干酪乳杆菌*Lactobacillus casei*。该菌株已于2019年11月08日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),分类命名为干酪乳杆菌*Lactobacillus casei*,保藏编号为CGMCC No.18922。

[0059] 实施例2干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的抗逆性检测

[0060] 1、耐酸性检测

[0061] 将约 10^8 CFU/ml干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1分别接种到pH值为2.0、3.0、4.0、5.0的MRS培养基中,分别在1h、2h、3h、4h采用平板倾注法测定其活菌数。

[0062] 当处于酸性环境即pH为5.0、4.0、3.0时,干酪乳杆菌可以正常生长,当pH为2.0时,对干酪乳杆菌的生长略有抑制作用,但活菌数仍然能维持在 $7.51g$ (cfu/ml)。说明该菌种对酸的耐受能力较强。结果显示干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1可以耐受胃酸的影响(图3)。

[0063] 2、耐胆盐检测

[0064] 将活化好的干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1用无菌生理盐水做倍比稀释,选取合适的稀释梯度并吸取200微升稀释液放于无菌培养皿里,做6个重复,然后用含不同浓度牛胆酸钠(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%)的MRS培养基倾注平板,37℃培养4小时,每隔1小时菌落计数,同时用不含牛胆酸钠的MRS培养基倾注平板,37℃培养48小时,菌落计数,作为对照组。图4结果显示,不同胆盐浓度下的活菌数随着时间的延长而下降的趋势不明显。0.1%、0.2%、0.3%的胆盐作用对干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的影响比较微弱,几乎不影响其正常生长。在0.4%的胆盐作用4小时后,活菌数略有下降,但不具有显著差异。说明干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的耐胆盐能力较强。

[0065] 3、抗生素敏感性检测

[0066] 将适宜浓度的干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1涂布于MRS培养基上,每个培养皿中均匀的贴附1个药敏纸片,培养36小时,观察抑菌圈大小(表1)。

[0067] 表1 干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1对不同抗生素敏感性结果

| [0068] | 名称 | 抑菌圈直径 (mm) | 敏感度 |
|--------|------|------------|-----|
| | 氨苄西林 | 18 | 高敏 |
| | 多西环素 | 37 | 极敏 |
| | 青霉素 | 31 | 极敏 |
| | 卡那霉素 | 9 | 低敏 |
| [0069] | 庆大霉素 | 1 | 低敏 |
| | 红霉素 | 30 | 极敏 |
| | 头孢氨苄 | 25 | 极敏 |
| | 环丙沙星 | 23 | 极敏 |
| | 氯霉素 | 30 | 极敏 |

[0070] 以上实验结果表明,干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1 CGMCC No.18922并不具有良好的耐药性,因此作为饲用益生菌使用是安全可靠的。

[0071] 4、干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1对革兰氏阴性菌的抑菌实验

[0072] 在培养皿中倒入配置好的MRS培养基,待培养基凝固后,放置牛津杯,上层倒入混有1%致病菌(大肠杆菌K88、沙门氏菌CVCC1791、金黄色葡萄球菌CVCC1882、弗氏柠檬酸杆

菌、嗜水气单胞菌bio-52500)的LB培养基,凝固后即可使用。在牛津杯中分别加入200微升的菌体,菌液和上清,小心放入37℃恒温培养箱正置培养24小时,查看抑菌圈大小。结果显示干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1对沙门氏菌CVCC1791、金黄色葡萄球菌CVCC1882、弗氏柠檬酸杆菌、嗜水气单胞菌bio-52500的抑菌效果十分明显,抑菌圈大小分别为2.7cm、2.2cm、2.3cm、2.0cm,对大肠杆菌K88也具有一定的抑菌效果,抑菌圈达到1.4cm(图5)。

[0073] 5、干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1对霉菌毒素的降解实验

[0074] 取发霉饲料若干,粉碎混匀,并用无霉饲料与其混合将其呕吐毒素的浓度调制1000 μ g/mg,将活化好的干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1菌液离心,弃上清取活菌体并用无菌蒸馏水将其浓度调制10⁸CFU/ml。取呕吐毒素浓度为1000 μ g/mg的饲料100g,按5%比例将5ml 10⁸CFU/ml干酪乳杆菌均匀喷洒于饲料上,置于37℃恒温箱,72h后测定其呕吐毒素的浓度为226 μ g/mg,即干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1对呕吐毒素的降解率为77.40%。降解率的计算方式为:(霉菌毒素添加量-霉菌毒素残留量)/霉菌毒素添加量 \times 100%。

[0075] 实施例3干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1的生长曲线测定

[0076] 生长曲线代表了细菌在新的适宜的环境中生长繁殖直至衰老死亡全过程的动态变化。将干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1按10%(v/v)的接种量,接种到MRS培养基中,37℃培养20小时,以不加菌液的MRS培养基作为空白对照,每隔2小时测定OD₆₀₀值,从而计算活菌数。实验设三次重复,结果取其平均值,记录数据并绘制生长曲线。如图6所示,在2-14小时,干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1处于对数生长阶段,繁殖速率较高。在14-20小时干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1数目趋于稳定,处于平台期。

[0077] 实施例4干酪乳杆菌制剂的制备

[0078] 1、发酵培养基配方:酵母膏20g/L、葡萄糖25g/L、氯化钠2-3g/L、硫酸锌0.1-0.2g/L、硫酸锰0.6-0.7g/L、硫酸镁0.8-1.2g/L、番茄汁15-20g/L和消泡剂0.05-0.08%(v/v),加水充分溶解制成发酵培养基。

[0079] 2、115℃高温蒸汽灭菌30min。

[0080] 3、待发酵培养基降温至37℃时,接种菌龄20小时的菌液5%(v/v)。

[0081] 4、在37℃条件下,保持转速200rpm搅拌,通入氮气和氢气的混合气体,二者混合体积比为9:1,发酵培养30小时,放罐,得到干酪乳杆菌的活菌数大于1 \times 10⁸cfu/ml的发酵液。发酵液4℃离心取沉淀,得到菌泥。

[0082] 5、向300g菌泥中加入100mL冻干保护剂,用振荡器混匀制成菌悬液。-80℃预冷1.5小时,迅速将冻结样品转移至冷冻干燥机中冻干24小时,使菌粉含水量达3%左右。冻干保护剂配方为:10%脱脂奶粉+6%乳糖。

[0083] 实施例5干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1制剂的安全性评价

[0084] 本实施例以小鼠作为实验动物,采用灌胃试验的方法,评价干酪乳杆菌的安全性,具体方法如下:

[0085] 1、取实施例4的方法制得的干酪乳杆菌菌剂的冻干粉,经平板计数测定,其干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1菌数为1 \times 10⁸cfu/g。

[0086] 2、选取8周龄左右的小鼠72只,随机分为4组(A组为对照组灌服无菌生理盐水,B组为高剂量组按照1 \times 10⁸cfu/只的量灌服菌液,C组为中剂量组按照1 \times 10⁷cfu/只的量灌服菌液,D组为低剂量组按照1 \times 10⁶cfu/只的量灌服菌液),每组3个重复,每个重复6只鼠。

[0087] 3、每天上午九点灌胃一次,连续灌服21天。

[0088] 实验鼠房控制温度湿度恒定,自然光照,小鼠自由采食、饮水,每7天清扫鼠笼一次。实验过程中,每天观察并记录小鼠的状态,存活情况,有无临床异常症状等。

[0089] 检测指标:

[0090] (1) 于实验结束当天采用心脏取血的方式,取得实验小鼠血液样品,经静止离心后获得血清,用于检测血清中白蛋白、总蛋白、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、甘油三酯、胆固醇、尿素、肿瘤细胞坏死因子等血液生化指标。

[0091] (2) 取完整的心、肝、脾、肾(双侧)称湿重,分别计算心脏指数 = (心脏湿重/体重) × 100%、肝脏指数 = (肝脏湿重/体重) × 100%、脾脏指数 = (脾脏湿重/体重) × 100%、肾脏指数 = (肾脏湿重/体重) × 100%。

[0092] 表2 不同处理组小鼠存活情况

[0093]

| | A组 | B组 | C组 | D组 |
|-----|----|----|----|----|
| 7天 | 存活 | 存活 | 存活 | 存活 |
| 14天 | 存活 | 存活 | 存活 | 存活 |
| 21天 | 存活 | 存活 | 存活 | 存活 |

[0094] 结果如表2所示,从表2可以看出,使用干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1 CGMCC No.18922给小鼠灌胃21天后,实验各处理组小鼠均存活,说明上述干酪乳杆菌对动物安全。

[0095] 表3 不同处理组小鼠的脏器系数

[0096]

| | A组 | B组 | C组 | D组 |
|----|------|------|------|------|
| 心脏 | 0.55 | 0.58 | 0.61 | 0.60 |
| 肝脏 | 5.32 | 5.46 | 5.55 | 5.48 |
| 脾脏 | 0.41 | 0.46 | 0.43 | 0.42 |
| 肾脏 | 1.27 | 1.32 | 1.35 | 1.31 |

[0097] 结果如表3所示,从表3可以看出,处理组小鼠的脏器指数与对照组相比没有明显变化,说明上述干酪乳杆菌没有造成小鼠各脏器异常。

[0098] 利用生化分析仪检测小鼠血清中白蛋白、总蛋白、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、甘油三酯、胆固醇、尿素、肿瘤细胞坏死因子等,结果均显示正常,说明本发明实施例4提供的干酪乳杆菌制剂对小鼠的各项生理指标不构成影响。

[0099] 实施例6干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1制剂的应用

[0100] 选取28日龄杜长大三元杂交断奶仔猪72头,实验期14天,按照随机区组设计分为2个组,每组6个重复,每个重复6头猪。A组为对照组(基础日粮组),B组为处理组(基础日粮中添加260g/t的实施例4制得的干酪乳杆菌制剂,有效活菌数为 1×10^8 cfu/g)。

[0101] 试验期间仔猪饲养在全封闭式保育猪舍内,温度控制在25-27℃,自由采食、饮水。基础日粮中不含任何抗生素,仔猪免疫按照常规免疫程序进行。

[0102] 测定指标:各处理组断奶仔猪的生产性能,具体包括以下指标:

[0103] 1、每天记录仔猪的采食量,试验结束后计算平均日采食量。

[0104] 2、在试验开始和结束的当天记录仔猪体重,计算平均日增重。

[0105] 3、通过A、B的试验结果计算料肉比,其计算方式为平均日采食量/平均日增重。

[0106] 4、试验期间每天早上10:00观察并记录仔猪的粪便状况,计算断奶仔猪腹泻率,腹

泻率(%) = (腹泻头数 × 腹泻天数) / (猪只数 × 试验天数) × 100%。

[0107] 表4 基础日粮中添加干酪乳杆菌制剂对断奶仔猪生产性能的影响

| [0108] | 平均日采食量 (kg) | 平均日增重 (kg) | 料肉比 | 腹泻率 |
|--------|-------------|------------|------|-------|
| A组 | 0.577 | 0.382 | 1.51 | 6.97% |
| B组 | 0.590 | 0.406 | 1.45 | 5.05% |

[0109] 结果如表4所示,从表4可以看出,处理组仔猪平均日采食量和平均日增重都显著高于对照组 ($P < 0.05$),料肉比低于对照组,说明添加干酪乳杆菌制剂的饲料效益更好。处理组与对照组相比腹泻率显著降低,说明本发明的干酪乳杆菌具有改善仔猪腹泻的作用。

[0110] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

| | | |
|--------|---|------|
| [0001] | 序列表 | |
| [0002] | <110> 中国农业大学 | |
| [0003] | <120> 干酪乳杆菌Ma.GLRGJ 1及其应用 | |
| [0004] | <130> KHP211113137.0 | |
| [0005] | <160> 1 | |
| [0006] | <170> SIPOSequenceListing 1.0 | |
| [0007] | <210> 1 | |
| [0008] | <211> 1466 | |
| [0009] | <212> DNA | |
| [0010] | <213> 人工序列(Artificial Sequence) | |
| [0011] | <400> 1 | |
| [0012] | gggtgggct gctatgatgc agtcgaacga gttctcgttg atgatcggtg cttgcaccga | 60 |
| [0013] | gattcaacat ggaacgagtg gcggacgggt gagtaacacg tgggtaacct gcccttaagt | 120 |
| [0014] | gggggataac atttggaac agatgctaata accgcataga tccaagaacc gcatggttct | 180 |
| [0015] | tggctgaaag atggcgtaag ctatcgcttt tggatggacc cgcggcgtat tagctagttg | 240 |
| [0016] | gtgaggtaat ggctcaccaa ggcatgata cgtagccgaa ctgagaggtt gatcgccac | 300 |
| [0017] | attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttccaca | 360 |
| [0018] | tggacgaag tctgatggag caacgccgcg tgagtgaaga aggctttcgg gtcgtaaac | 420 |
| [0019] | tctgttgttg gagaagaatg gtcggcagag taactgttgt cggcgtgacg gtatccaacc | 480 |
| [0020] | agaaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcgtaat acgtaggtgg caagcgttat | 540 |
| [0021] | ccgatttat tggcgtaaa gcgagcgcag gcggtttttt aagtctgatg tgaaagccct | 600 |
| [0022] | cggcttaacc gaggaagcgc atcggaaact gggaaacttg agtgcagaag aggacagtgg | 660 |
| [0023] | aactccatgt gtagcggta aatgcgtaga tatatggaag aacaccagtg gcgaaggcgg | 720 |
| [0024] | ctgtctggtc tgtaactgac gctgaggctc gaaagcatgg gtagcgaaca ggattagata | 780 |
| [0025] | ccctggtagt ccatgccgta aacgatgaat gctaggtgtt ggagggttc cgcccttcag | 840 |
| [0026] | tgccgcagct aacgcattaa gcattccgcc tggggagtac gaccgcaagg ttgaaactca | 900 |
| [0027] | aaggaattga cgggggccg cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg | 960 |
| [0028] | aagaacctta ccaggtcttg acatcttttg atcacctgag agatcaggtt tccccttcgg | 1020 |
| [0029] | gggcaaatg acaggtggtg catggttgc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggtta | 1080 |
| [0030] | gtcccgcaac gagcgaacc cttatgacta gttgccagca tttagttggg cactctagta | 1140 |
| [0031] | agactgccgg tgacaaaccg gaggaagtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat | 1200 |
| [0032] | gacctgggct acacacgtgc tacaatgat ggtacaacga gttgcgagac cgcgaggta | 1260 |
| [0033] | agctaatctc ttaaagccat tctcagttcg gactgtaggc tgcaactcgc ctacacgaag | 1320 |
| [0034] | tcggaatgc tagtaatgc ggatcagcac gcccggtga atacgttccc gggccttgta | 1380 |
| [0035] | cacaccgcc gtcacaccat gagagtttgt aacaccgaa gccggtggcg taaccctttt | 1440 |
| [0036] | aggagcgcg ccgtctaagg tatcaa | 1466 |

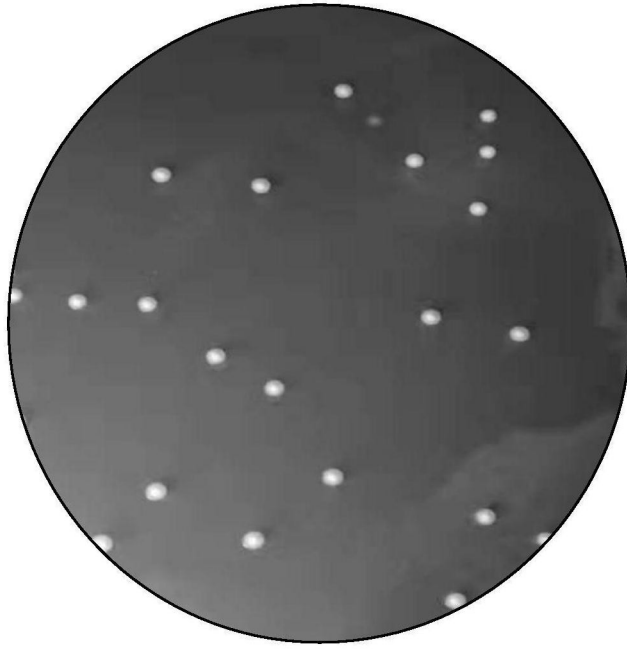


图1

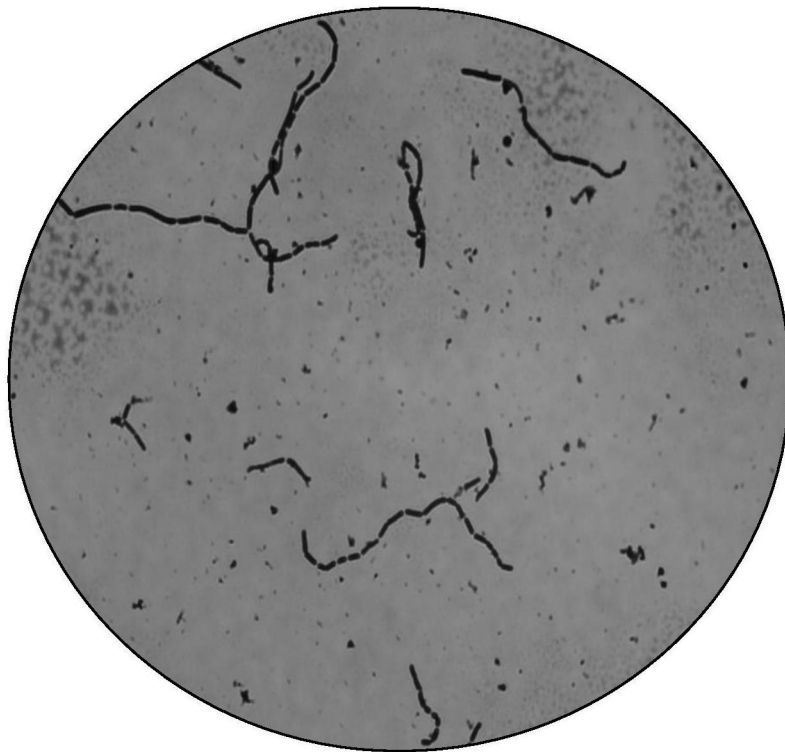


图2

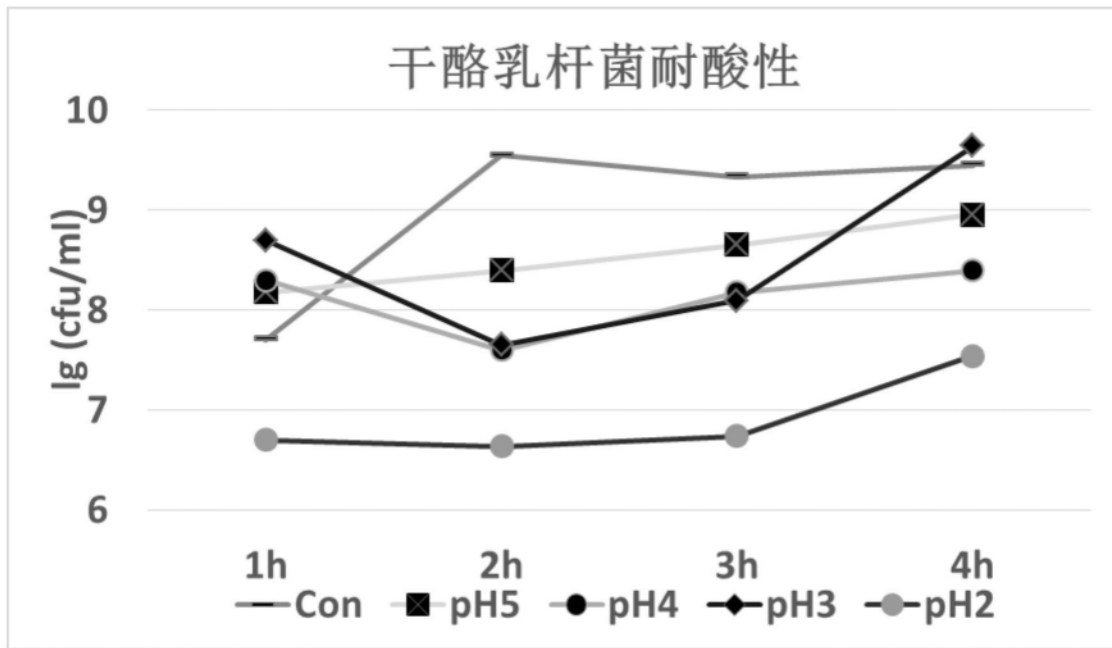


图3

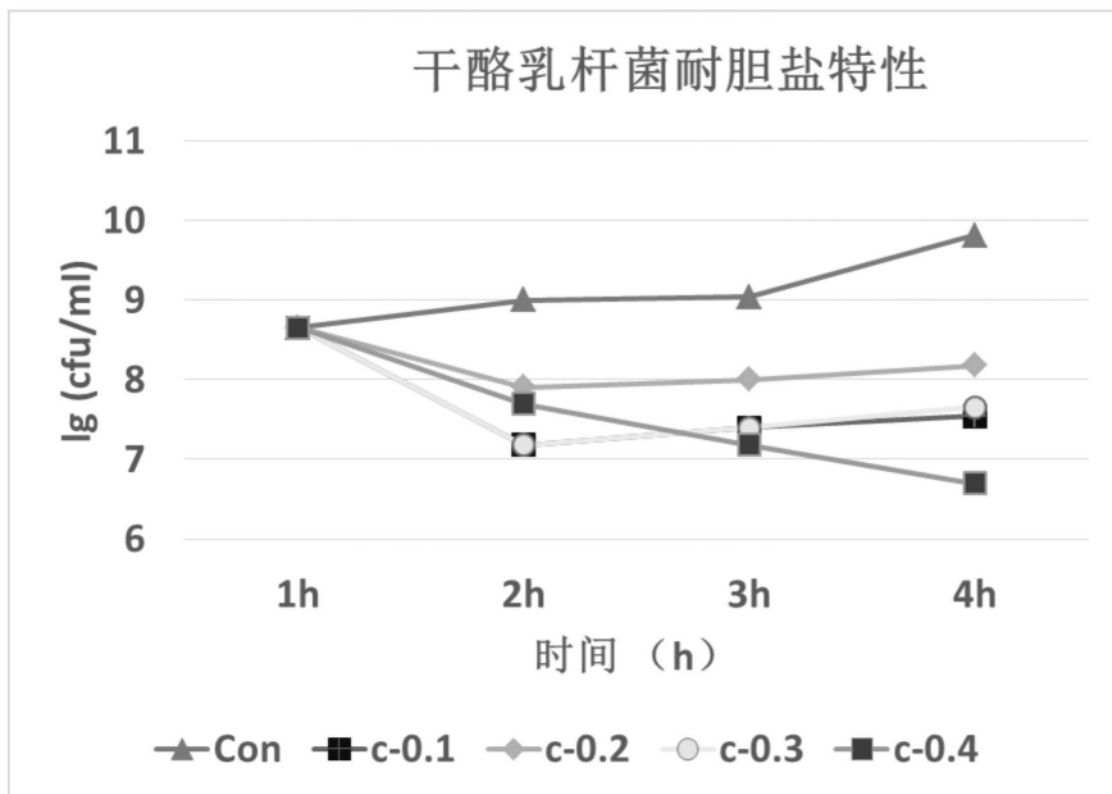
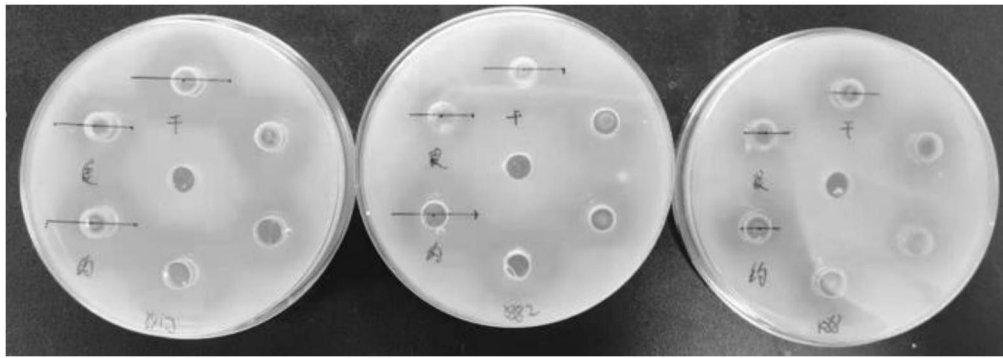


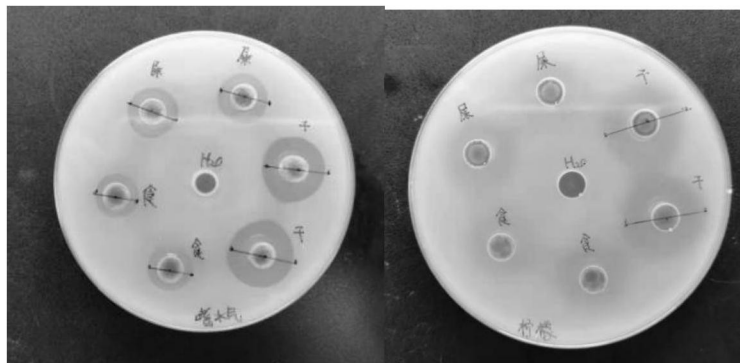
图4



CVCC1791

CVCC1882

K88



bio-52500

弗氏柠檬酸杆菌

图5

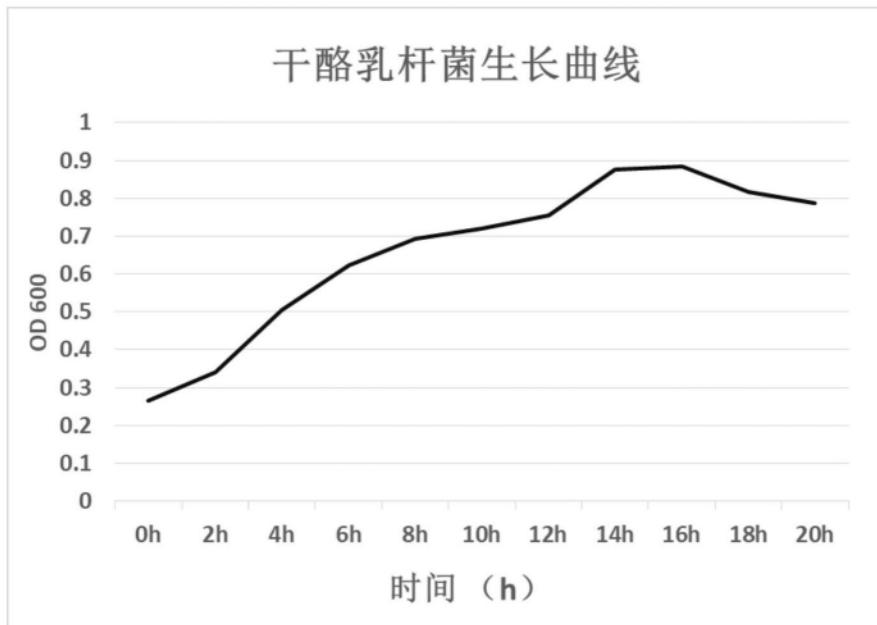


图6