



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103275920 B

(45) 授权公告日 2015.04.15

(21) 申请号 201310186510.8

CN 1701116 A, 2005.11.23, 全文.

(22) 申请日 2013.05.16

CN 101748083 A, 2010.06.23, 全文.

(73) 专利权人 江南大学

Lilian Pumbwe et al..Bile salts

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号

enhance bacterial co-aggregation,
bacterial-intestinal epithelial cell
adhesion, biofilm formation and

(72) 发明人 陈卫 张秋香 赵山山 刘小鸣
王刚 田丰伟 郝光飞 赵建新
张灏

antimicrobial resistance of Bacteroides
fragilis. 《Microbial Pathogenesis》.2007, 摘
要.

(74) 专利代理机构 无锡互维知识产权代理有限
公司 32236

Margaret C. de Jesus et al..Acid and
Bile-Salt Stress of Enteropathogenic
Escherichia coli Enhances Adhesion to
Epithelial Cells and Alters Glycolipid
Receptor Binding Specificity. 《The Journal
of Infectious Diseases》.2005, 1430-1440.

代理人 王爱伟

(51) Int. Cl.

C12N 1/38(2006.01)

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/25(2006.01)

C12R 1/245(2006.01)

C12R 1/23(2006.01)

C12R 1/225(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

陈臣等. 荧光标记法初探植物乳杆菌 ST- III
对 Caco-2 细胞的粘附机理. 《微生物学通
报》.2010, 第 37 卷 (第 3 期), 355-361.

(56) 对比文件

CN 101198689 A, 2008.06.11, 全文.

CN 101198689 A, 2008.06.11, 全文.

FI 116191 B, 2005.10.14, 全文.

刘丽波等. 氯化钠刺激对保加利亚乳杆
菌生长及质膜流动性的影响. 《食品工业科
技》.2012, 132-139.

审查员 毛舒燕

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方
法

(57) 摘要

本发明公开一种提高乳酸菌粘附肠道上皮细
胞能力的方法,包括以下步骤:(1) 乳杆菌或乳球
菌种子液的培养;(2) 将所述种子液以 3%-4% (v/
v) 接种量接种到含有一定浓度盐的液体培养基
中,静置培养;(3) 离心,获得菌体.本发明通过
对乳酸菌在含盐的培养基中培养,提高了乳酸菌
粘附肠道上皮细胞的能力,实验重复性好,为提高
乳杆菌粘附肠道上皮细胞的能力提供了一种新方
法。

CN 103275920 B

1. 一种提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法,其特征在于:

包括以下步骤:

(1) 乳杆菌或乳球菌种子液的培养;

(2) 将所述种子液以 3%~4% (v/v) 接种量接种到含有一定浓度盐的液体培养基中,静置培养;

(3) 离心,获得菌体;

所述步骤(1)中乳杆菌为植物乳杆菌 ST-III;

所述步骤(1)中乳球菌为乳酸乳球菌乳脂亚种;

所述步骤(2)中在含有一定浓度盐的液体培养基中培养,其中盐指的是氯化钠,一定浓度范围为 2%~10%。

2. 根据权利要求 1 所述的提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法,其特征在于:所述步骤(1)中将植物乳杆菌 ST-III 在 MRS 固体平板上划线,37℃~42℃倒置培养至长出单菌落,挑取单菌落接种到 MRS 液体培养基中,37℃~42℃静置培养 6h~10h。

3. 根据权利要求 1 所述的提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法,其特征在于:所述步骤(1)中将乳酸乳球菌乳脂亚种在 GM17 固体平板上划线,30℃~32℃倒置培养至长出单菌落,挑取单菌落接种到 GM17 液体培养基中,30℃~32℃静置培养 6h~10h。

4. 根据权利要求 1 所述的提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法,其特征在于:所述步骤(3)中离心速度控制在 4000~6000 rpm。

一种提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,特别涉及一种提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法。

背景技术

[0002] 乳酸菌(Lactic Acid Bacteria, LAB)是人类应用最早的细菌之一,广泛存在于人、畜、禽的肠道、食品、饮料及少数临床药品中,早在公元前三世纪,我们的祖先就用它来制作乳制品、肉制品及腌菜。乳酸菌不仅可以提高食品的营养价值,改善食品风味,提高食品附加值,还可以调节机体胃肠道正常菌群、保持微生态平衡,提高食物消化率,降低血清胆固醇,抑制肠道内腐败菌生长、繁殖及腐败产物的产生,刺激组织发育,从而对机体的营养状态、生理功能、细胞感染、药物效应、毒性反应、免疫反应、肿瘤发生和衰老过程等产生作用。

[0003] 益生乳酸菌必须在胃肠道中保持一定的数量,才能够在机体内发挥益生作用,而成功的粘附在肠道上皮细胞是乳酸菌在肠道中定殖、增殖的第一步。乳酸菌的粘附能力与多种因素有关,如:粘附素、细胞表面蛋白、荚膜多糖等。乳酸菌在工业生产中常常会遇到高盐环境,如在发酵奶酪、发酵蔬菜、鱼及肉制品,我们通过对分离自泡菜的植物乳杆菌 ST-III 耐盐转录组的分析发现,在含有盐的培养基中培养的植物乳杆菌 ST-III 细胞产生了盐应激反应,其粘附蛋白、细胞表面蛋白及荚膜多糖的表达量均比在不含盐的培养基中培养时有了显著的提高;国外也有研究报道,胆盐引起的应激反应提高了脆弱拟杆菌对肠道上皮细胞的粘附能力(Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. Microbial pathogenesis. 2007. 43, 78-87.),但盐引起的盐应激反应是否可以提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞的能力并没有报道。

发明内容

[0004] 本部分的目的在于概述本发明的实施例的一些方面以及简要介绍一些较佳实施例。在本部分以及本申请的说明书摘要和发明名称中可能会做些简化或省略以避免使本部分、说明书摘要和发明名称的目的模糊,而这种简化或省略不能用于限制本发明的范围。

[0005] 鉴于上述和/或现有提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞的能力的方式方法,提出了本发明。

[0006] 因此,本发明其中一个目的是通过对乳酸菌在含盐的培养基中培养,为提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞的能力提供一种新方法。

[0007] 为解决上述技术问题,根据本发明的一个方面,本发明提供了如下技术方案:一种提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法,包括以下步骤:(1) 乳杆菌或乳球菌种子液的培养;(2) 将所述种子液以 3%-4% (v/v) 接种量接种到含有一定浓度盐的液体培养基中,静置培养;(3) 离心,获得菌体。

[0008] 作为本发明所述提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法的一种优选方案,其中:所述步骤(1)中将乳杆菌在 MRS 固体平板上划线,37℃-42℃倒置培养至长出单菌落,挑取单菌落接种到 MRS 液体培养基中,37℃-42℃静置培养 6h-10h。

[0009] 作为本发明所述提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法的一种优选方案,其中:所述步骤(1)中将乳球菌在 GM17 固体平板上划线,30℃-32℃倒置培养至长出单菌落,挑取单菌落接种到 GM17 液体培养基中,30℃-32℃静置培养 6h-10h。

[0010] 作为本发明所述提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法的一种优选方案,其中:所述步骤(1)中乳杆菌包括植物乳杆菌、干酪乳杆菌、瑞士乳杆菌、保加利亚乳杆菌、嗜酸乳杆菌及罗伊氏乳杆菌中的一种或几种。

[0011] 作为本发明所述提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法的一种优选方案,其中:所述步骤(1)中乳球菌包括乳酸乳球菌乳脂亚种和 / 或乳酸乳球菌乳酸亚种。

[0012] 作为本发明所述提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法的一种优选方案,其中:所述步骤(2)中在含有一定浓度盐的液体培养基中培养,其中盐指的是钠盐。

[0013] 作为本发明所述提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法的一种优选方案,其中:所述步骤(2)中在含有一定浓度盐的液体培养基中培养,其中一定浓度范围为 2%-10%。

[0014] 作为本发明所述提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞能力的方法的一种优选方案,其中:所述步骤(3)中离心速度控制在 4000-6000rpm。

[0015] 本发明研究了盐应激反应对乳酸菌粘附肠道上皮细胞 HT-29 的能力的影响,提高了乳酸菌粘附肠道上皮细胞的能力,实验重复性好,为提高乳酸菌粘附肠道上皮细胞的能力提供了一种新方法。

具体实施方式

[0016] 下面结合具体的实施例对本发明所述方法进行详细说明。

[0017] 下面的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0018] 实施例 1

[0019] 一、菌体的培养

[0020] 1、将在 10% 甘油中保藏的植物乳杆菌 ST-III 接种到 MRS 液体培养基中,37℃静置培养 6h;

[0021] 2、接种针沾取少量培养液,在 MRS 固体平板上划线,37℃倒置培养至长出单菌落;

[0022] 3、挑取单菌落接种到 MRS 液体培养基中,37℃静置培养 10h,获得种子培养液;

[0023] 4、将种子培养液以 3% 的接种量分别接种到不含有盐及含有 2%NaCl、4%NaCl、6%NaCl、8%NaCl、10%NaCl 的 MRS 液体培养基中,37℃静置培养 10h。

[0024] 二、粘附实验

[0025] 1、5000rpm 离心 5min 收集在不含有盐及含 2%NaCl、4%NaCl、6%NaCl、8%NaCl、10%NaCl 的 MRS 液体培养基中生长的菌体;

[0026] 2、用与培养时相同浓度的盐水(在无盐条件下培养的菌体用生理盐水)洗涤菌体 3 次;

[0027] 3、生理盐水重悬菌体,并调节菌体浓度为 10^8 CFU/mL;

[0028] 4、将上述菌悬液加入含有长至单层的 HT-29 细胞盖玻片的 6 孔板中;

- [0029] 5、于 5%CO₂培养箱中 37℃ 孵育 2h；
- [0030] 6、孵育后用无菌 PBS 洗涤盖玻片 3 次；
- [0031] 7、0.4% 多聚甲醛固定 0.5h。
- [0032] 三、革兰氏染色染色
- [0033] 1、从多聚甲醛中取出盖玻片，自然晾干；
- [0034] 2、滴加草酸铵结晶紫染色 1min，无菌水清洗至水流为无色；
- [0035] 3、碘液媒染 1min 后无菌水清洗至水流为无色；
- [0036] 4、滴加 95% 乙醇脱色，20s 后水洗；
- [0037] 5、蕃红复染后无菌水清洗至水流为无色，用吸水纸轻轻吸去水滴。
- [0038] 四、粘附观察及计数
- [0039] 1、粘附观察
- [0040] 染色后，在油镜下观察细菌粘附的情况，并拍照。
- [0041] 2、粘附计数
- [0042] 显微镜观察时每个盐浓度下随机取 20 个视野内大约 100 个细胞，计算细胞所粘附的细菌数，每个细胞上平均被粘附的细菌数即为粘附指数。
- [0043] 表 1 植物乳杆菌 ST-III 粘附 HT-29 细胞系数

	盐浓度	粘附系数
	对照（不含盐）	3.11±0.54 ^{c*}
	2% NaCl	5.14±0.91 ^d
[0044]	4% NaCl	9.92±0.28 ^c
	6% NaCl	20.25±1.04 ^b
	8% NaCl	29.92±1.31 ^a
	10% NaCl	30.05±0.75 ^a

[0045] *：不同的字母代表差异显著 ($p \leq 0.05$)。

[0046] 由上表可知，在含有盐的培养基中培养的菌体对肠道上皮细胞 HT-29 的粘附能力明显高于在不含盐的培养基中培养的菌体；随着盐浓度的增高，菌体粘附能力也随之增加，盐浓度为 8% 及 10% 时菌体的粘附能力达到最大。虽然在 8%NaCl 和 10%NaCl 的 MRS 培养后的菌体的粘附能力没有显著差异，但考虑到菌体生长速度及食品中盐浓度的高低，本实验认为此方法应用到实际生产时选用 8% 的盐浓度较为适合。

[0047] 实施例 2

[0048] 一、种子液的培养

[0049] 1、将乳酸乳球菌乳脂亚种在 GM17 (M17, 0.5% 葡萄糖) 固体平板上划线，30℃ 倒置培养至长出单菌落，挑取单菌落接种到 GM17 液体培养基中，30℃ 静置培养 10h；

[0050] 2、将种子培养液以 3% 的接种量分别接种到不含有盐及含有 2%NaCl 的 GM17 液体培养基中，37℃ 静置培养 10h。

[0051] 二、粘附实验

[0052] 1、5000rpm 离心 5min 收集在不含有盐及含 2%NaCl 的 GM17 液体培养基中生长的菌体；

[0053] 2、用与培养时相同浓度的盐水(在无盐条件下培养的菌体用生理盐水)洗涤菌体 3

次；

- [0054] 3、生理盐水重悬菌体，并调节菌体浓度为 10^8 CFU/mL；
 [0055] 4、将上述菌悬液加入含有长至单层的 HT-29 细胞盖玻片的 6 孔板中；
 [0056] 5、于 5%CO₂培养箱中 37℃ 孵育 2h；
 [0057] 6、孵育后用无菌 PBS 洗涤盖玻片 3 次；
 [0058] 7、0.4% 多聚甲醛固定 0.5h。

[0059] 三、革兰氏染色染色

- [0060] 1、从多聚甲醛中取出盖玻片，自然晾干；
 [0061] 2、滴加草酸铵结晶紫染色 1min，无菌水清洗至水流为无色；
 [0062] 3、碘液媒染 1min 后无菌水清洗至水流为无色；
 [0063] 4、滴加 95% 乙醇脱色，20s 后水洗；
 [0064] 5、蕃红复染后无菌水清洗至水流为无色，用吸水纸轻轻吸去水滴。

[0065] 四、粘附观察及计数

- [0066] 1、粘附观察
 [0067] 染色后，在油镜下观察细菌粘附的情况，并拍照。

[0068] 2、粘附计数

[0069] 显微镜观察时每个盐浓度下随机取 20 个视野内大约 100 个细胞，计算细胞所粘附的细菌数，每个细胞上平均被粘附的细菌数即为粘附指数。

[0070] 表 2 乳酸乳球菌乳脂亚种 NZ9000 粘附 HT-29 细胞系数

	盐浓度	粘附系数
[0071]	对照（不含盐）	$3.58 \pm 0.22^{b*}$
	2% NaCl	5.02 ± 0.47^a

[0072] *：不同的字母代表差异显著 ($p \leq 0.05$)。

[0073] 由上表可知，在含有盐的培养基中培养的菌体对肠道上皮细胞 HT-29 的粘附能力明显高于在不含盐的培养基中培养的菌体；随着盐浓度的增高，菌体粘附能力也随之增加。

[0074] 应说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的精神和范围，其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。