



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117025452 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 10

(21) 申请号 202310898504.9

A61P 1/00 (2006.01)

(22) 申请日 2023.07.21

A61P 37/04 (2006.01)

(71) 申请人 华南理工大学

A61P 1/10 (2006.01)

地址 510640 广东省广州市天河区五山路  
381号

A61P 39/06 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(72) 发明人 刘冬梅 钟舒莹 彭芸燕 许喜林  
张馨月

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有  
限公司 44245

专利代理师 宫爱鹏

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 33/135 (2016.01)

A23K 10/18 (2016.01)

A61K 35/745 (2015.01)

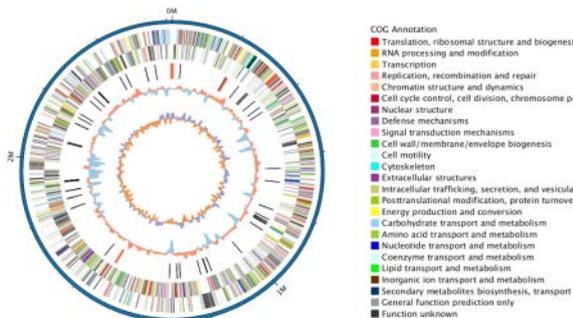
权利要求书2页 说明书13页 附图6页

(54) 发明名称

一种长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的高密度培  
养方法

(57) 摘要

本发明公开了一种长双歧杆菌婴儿亚种B2-01(Bifidobacterium longum subsp.infantis)的高密度培养方法,B2-01菌株从广州市健康3月龄婴儿粪便中分离筛选获得,已于2021年9月1日,在广东省微生物菌种保藏中心保藏,保藏编号为GDMCC No.:61911。本发明从基因水平上阐明了B2-01菌株具有较好的安全性,且具有一定的耐氧能力。本发明提供了B2-01菌株的高密度培养方法,该方法对MRS肉汤培养基的组分进行优化,使得发酵液中长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的活菌数达到 $4.20 \times 10^9$ CFU/mL,有利于该菌株在功能食品、饲料、药品等领域中的生产应用。



1. 一种长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的高密度培养方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) B2-01经过二次活化,得到种子发酵液;

所述长双歧杆菌婴儿亚种B2-01于2021年9月1日,在广东省微生物菌种保藏中心保藏,保藏编号为GDMCC No:61911;

(2) 将种子发酵液接种于高密度培养基中,在发酵温度37~45℃中培养18~20h,得到高密度发酵菌液;

所述高密度培养基为:以重量份数计,酪蛋白酶消化物0.8~1.2份、牛肉膏粉0.8~1.2份、酵母膏粉3~4份、柠檬酸三铵0.1~0.2份、乙酸钠0.4~0.5份、硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.01~0.02份、硫酸锰( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ) 0.004~0.005份、磷酸氢二钾0.1~0.2份、葡萄糖2~3份、吐温80 0.1~0.2份,乳糖2~3份,向上述原料加入100份水搅拌溶解,调节pH至 $6.8 \pm 0.1$ ,121℃灭菌15min。

2. 根据权利要求1所述的高密度培养方法,其特征在于,所述种子发酵液为:将冻存的长双歧杆菌婴儿亚种B2-01以体积比为1~5:100的比例接种于MRS肉汤培养基中进行第一次活化,将得到的一次活化的种子发酵液以体积比为 $3 \pm 1:100$ 的比例接种于MRS肉汤培养基中进行第二次活化,得到二次活化的种子发酵液。

3. 根据权利要求2所述长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的高密度培养方法,其特征在于,所述第一次活化的条件为 $37 \pm 2^\circ C$ 静置培养16~20h;所述第二次活化的条件为 $37 \pm 2^\circ C$ 静置培养16~20h。

4. 根据权利要求1所述长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的高密度培养方法,其特征在于,所述高密度发酵菌液中长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的活菌数达到 $4.0 \times 10^9$ CFU/mL以上。

5. 一种含有长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的组合物,其特征在于,还包含至少一种可食用微生物和添加剂;

所述微生物为细菌和真菌中的一种或多种;所述添加剂为营养物质;所述营养物质为膳食纤维、益生元、蛋白质、脂类物质、矿物质、维生素和植物成分中的一种或多种;所述植物成分为黄酮、多酚类物质中的一种或多种。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其特征在于,还包含辅料;所述辅料为果蔬粉和坚果中的一种或多种。

7. 权利要求6所述组合物的应用,其特征在于,所述组合物在制备食品、发酵剂及膳食补充剂中的应用;所述发酵剂应用于酸豆乳、发酵果蔬汁和发酵乳中的一种或多种;所述膳食补充剂应用于保健食品;

所述膳食补充剂为丸剂、粉剂、胶囊剂、片剂、颗粒粉剂、盖膜剂、小袋剂、糖衣丸剂或液体剂中一种或多种的形式。

8. 一种培养物,其特征在于,所述培养物包含长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的无细胞培养上清液、代谢产物、细胞结构成分和细胞内物质中的一种或多种;

所述代谢产物包括酶、胞外多糖、细菌素和有机酸中的一种或多种;

所述细胞结构成分为细胞壁及其成分。

9. 一种包含长双歧杆菌婴儿亚种B2-01灭活菌体的灭活菌体制剂,其特征在于,还包括至少一种微生物灭活菌体和营养成分;

所述微生物灭活菌体为细菌和真菌中的一种或多种;所述真菌为可食用酵母;  
所述营养成分为膳食纤维、益生元、蛋白质、脂类物质、矿物质、维生素和植物成分中的一种或多种;所述植物成分为黄酮、多酚类物质中的一种或多种。

## 一种长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的高密度培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,涉及一株婴儿肠道源的长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的高密度培养方法。

### 背景技术

[0002] 2001年,世界粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)对益生菌的定义:益生菌是活的微生物,当摄入充足的数量时,对宿主产生健康益处。近年来,人们越来越注重健康饮食,益生菌与健康成为研究热点。长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)是人和许多哺乳类动物肠道内重要的益生菌,其具有调节肠道菌群、增强免疫力、缓解便秘、抗氧化等益生功能。长双歧杆菌可分为3个亚种,分别是长双歧杆菌长亚种(*Bifidobacterium longum* subsp.*longum*)、长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp.*infantis*)、长双歧杆菌猪亚种(*Bifidobacterium longum* subsp.*suis*),近年来,益生菌产业不断发展,相关的法律法规不断完善,菌种的分类及命名也随之更加规范、准确。国家卫生健康委员会于2022年发布了关于《可用于食品的菌种名单》更新的公告,其中,长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)更名为长双歧杆菌长亚种(*Bifidobacterium longum* subsp.*longum*),婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)更名为长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp.*infantis*)。目前常采用全基因组测序、数字DDH(dDDH)分析、PCR-RFLP等方法来区分长双歧杆菌不同亚种。

[0003] 益生菌发挥益生作用,需要活菌数达到 $10^6$ CFU/g以上。目前,市场上的双歧杆菌产品(如双歧杆菌固体饮料)主要标称双歧杆菌活菌数可达十亿级别,而高活性菌粉的制备,一般需要发酵液中的活菌数达到 $10^8$ CFU/mL。优化培养基的成分可以让菌株获得更佳的营养条件,从而促进菌体的生长繁殖,提高菌株发酵液中的活菌数。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp.*infantis*)B2-01的高密度培养方法,对MRS肉汤培养基的组分进行优化,在普通静置培养的条件下(未在厌氧的条件下培养),使得发酵液中长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的活菌数达到 $4.20 \times 10^9$ CFU/mL。

[0005] 一种长双歧杆菌婴儿亚种B2-01高密度培养的方法,包括以下步骤:

[0006] (1)将长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp.*infantis*)B2-01经过二次活化,得到种子发酵液;

[0007] 所述长双歧杆菌婴儿亚种B2-01于2021年9月1日,在广东省微生物菌种保藏中心保藏,保藏编号为GDMCC No:61911;

[0008] (2)将种子发酵液接种于高密度培养基中,在发酵温度 $37 \sim 45^\circ\text{C}$ 中培养 $18 \sim 20\text{h}$ ,得到高密度发酵菌液;

[0009] 所述高密度培养基为:以重量份数计,酪蛋白酶消化物 $0.8 \sim 1.2$ 份、牛肉膏粉 $0.8$

~1.2份、酵母膏粉3~4份、柠檬酸三铵0.1~0.2份、乙酸钠0.4~0.5份、硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )0.01~0.02份、硫酸锰( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )0.004~0.005份、磷酸氢二钾0.1~0.2份、葡萄糖2~3份、吐温80 0.1~0.2份,乳糖2~3份,向上述原料加入100份水搅拌溶解,调节pH至 $6.8 \pm 0.1$ , $121^\circ\text{C}$ 灭菌15min。

[0010] 优选地,所述种子发酵液为:将冻存的长双歧杆菌婴儿亚种B2-01以体积比为1~5:100的比例接种于MRS肉汤培养基中进行第一次活化,将得到的一次活化的种子发酵液以体积比为 $3 \pm 1:100$ 的比例接种于MRS肉汤培养基中进行第二次活化,得到二次活化的种子发酵液。

[0011] 优选地,所述第一次活化的条件为 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 静置培养16~20h;所述第二次活化的条件为 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 静置培养16~20h。

[0012] 优选地,所述高密度发酵菌液中长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的活菌数达到 $4.0 \times 10^9$ CFU/mL以上。

[0013] 一种含有长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的组合物,其特征在于,还包含至少一种可食用微生物和添加剂;

[0014] 优选地,所述微生物为细菌和真菌中的一种或多种;

[0015] 优选地,所述添加剂为营养物质;所述营养物质为膳食纤维、益生元、蛋白质、脂类物质、矿物质、维生素和植物成分中的一种或多种;所述植物成分为黄酮、多酚类物质中的一种或多种。

[0016] 优选地,所述组合物还包含辅料;

[0017] 优选地,所述辅料为果蔬粉和坚果中的一种或多种。

[0018] 一种含有长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的组合物中的应用,其特征在于,所述组合物在制备食品、发酵剂及膳食补充剂中的应用;所述发酵剂应用于酸豆乳、发酵果蔬汁和发酵乳中的一种或多种;所述膳食补充剂应用于保健食品;

[0019] 优选地,所述膳食补充剂为丸剂、粉剂、胶囊剂、片剂、颗粒粉剂、盖膜剂、小袋剂、糖衣丸剂或液体剂中一种或多种的形式。

[0020] 一种培养物,其特征在于,所述培养物包含长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的无细胞培养上清液、代谢产物、细胞结构成分和细胞内物质中的一种或多种;

[0021] 优选地,所述代谢产物包括酶、胞外多糖、细菌素和有机酸中的一种或多种;

[0022] 优选地,所述细胞结构成分为细胞壁及其成分。

[0023] 一种包含长双歧杆菌婴儿亚种B2-01灭活菌体的灭活菌体制剂,其特征在于,还包括至少一种微生物灭活菌体和营养成分;

[0024] 优选地,所述微生物灭活菌体为细菌和真菌中的一种或多种;所述真菌为可食用酵母;

[0025] 优选地,所述营养成分为膳食纤维、益生元、蛋白质、脂类物质、矿物质、维生素和植物成分中的一种或多种;所述植物成分为黄酮、多酚类物质中的一种或多种。

[0026] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0027] (1)提供所述长双歧杆菌B2-01亚种水平的鉴定,通过ANI分析、系统发育树的构建以及数字DDH(dDDH)分析,确定长双歧杆菌B2-01菌株为长双歧杆菌婴儿亚种。长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)B2-01已于2021年9月1日,在广东省

微生物菌种保藏中心保藏,保藏编号为GDMCC No:61911。基于全基因组分析,B2-01菌株具有较好的安全性。

[0028] (2) 提供所述长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的耐氧性评价。250mL锥形瓶中装入60mL灭菌后的MRS肉汤培养基,以体积比为5:100的比例接种于MRS肉汤培养基中,在37℃、180rpm的条件下摇床培养18h后,存活率仍可达90.02%。B2-01菌株具有抗氧化相关基因,例如硫氧还蛋白系统编码基因、Fe-S簇蛋白合成和保护的相关基因、mntH基因等。本发明菌株具有良好的氧气耐受性。

[0029] (3) 对MRS肉汤培养基中的成分进行优化,提供了一种发酵液中长双歧杆菌婴儿亚种B2-01活菌数为 $4.20 \times 10^9$ CFU/mL的高密度培养方法,后续将发酵液进行冷冻干燥,可得到活菌数为 $6.10 \times 10^{10}$ CFU/g的菌粉,有利于该菌株在功能食品、饲料、药品等领域中的生产应用。

[0030] 保藏说明

[0031] 菌种名称:长双歧杆菌婴儿亚种

[0032] 拉丁名:*Bifidobacterium longum subsp. infantis*

[0033] 菌株编号:B2-01。

[0034] 保藏机构:广东省微生物菌种保藏中心。

[0035] 地址:广州市先烈中路100号大院59号楼5楼广东省科学院微生物研究所。

[0036] 保藏日期:2021年9月1日。

[0037] 保藏中心登记入册编号:GDMCC No:61911。

[0038] 该菌株已在中国专利CN202210850462.7中公开,属于现有技术。

## 附图说明

[0039] 图1为实施例1中长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的基因组圈图。基因组圈图的最外圈是基因组序列位置坐标,由外圈到里圈分别为:正链基因、负链基因、ncRNA (black表示tRNA,red表示rRNA)、GC含量(red表示大于均值,blue表示小于均值)、GC skew (GC偏移,用来衡量G和C的相对含量,用于环状染色体中标记起点和终点; $GC\ skew = (G - C) / (G + C)$ ;purple表示大于0,orange表示小于0)。

[0040] 图2A为实施例1中长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的ANI分析热图。

[0041] 图2B为实施例1中长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的基于核心基因的系统发育树。

[0042] 图3为实施例1中长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的COG功能注释分布图。

[0043] 图4为实施例1中长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的GO功能注释分布图。

[0044] 图5为实施例1中长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的KEGG功能注释分布图。

[0045] 图6为实施例2中长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的耐氧评价结果。

## 具体实施方式

[0046] 本发明提供长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的亚种水平鉴定、安全性评价(基因层面)、耐氧评价以及B2-01菌株高密度培养的方法。为了更好的理解本发明,下面结合具体的实施例,对本发明进行详细的阐述和说明,但本发明要求保护范围并不局限于以下具体实施例所示范围。

[0047] 以下实施例所使用的培养基配方为:

[0048] MRS肉汤培养基(购自广东环凯微生物科技有限公司):

[0049] 取酪蛋白酶消化物10g、牛肉膏粉10g、酵母膏粉4g、柠檬酸三铵2g、乙酸钠5g、硫酸镁( $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.2g、硫酸锰( $Mn SO_4 \cdot 4H_2O$ ) 0.05g、磷酸氢二钾2g、葡萄糖20g、吐温80 1.08g,加蒸馏水1000mL,溶解后,调pH至 $5.7 \pm 0.2$ 。121℃灭菌15min。

[0050] 实施例1长双歧杆菌婴儿亚种B2-01菌株的全基因组测序

[0051] 1.长双歧杆菌婴儿亚种B2-01全基因组的基本特征

[0052] 全基因组测序:采用CTAB法提取基因组DNA。DNA样品浓度的检测使用Qubit荧光定量仪,若Nanodrop微量分光光度计检测的值大于Qubit值的两倍,需要对DNA样品进行纯化。样品DNA的完整性使用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。样品DNA由广州基迪奥生物科技有限公司完成全基因组测序。

[0053] 测序数据质控:ONT和Illumina测序的原始数据(raw data)存在一定比例的低质量数据,会影响生物信息分析的准确可靠性。因而,应对原始数据进行过滤处理,获得有效数据(clean data)。使用Fastp软件对Illumina测序数据进行质控,筛选标准包括:去除含有接头的reads;去除全部都是A碱基的reads;去除含N比例大于10%的reads;去除低质量的reads(质量值 $Q \leq 20$ 的碱基数占整条reads的50%以上)。

[0054] 基因组组装:使用Flye对三代测序reads进行拼接组装。使用Pilon(version 1.23)将二代测序reads比对至组装好的基因组序列上,按软件默认参数对基因组结果进行校正,输出矫正后的基因组序列以及校正位点信息。针对组装的基因组序列,绘制基因组圈图。

[0055] 长双歧杆菌婴儿亚种B2-01基因组圈图如图1所示,长双歧杆菌婴儿亚种B2-01含有一个环状染色体,不含质粒,基因组大小为2,615,705bp,基因组G+C含量为59.22%。已将长双歧杆菌B2-01的完整基因组序列提交给NCBI GenBank,登录号为CP106830。

[0056] 2.长双歧杆菌婴儿亚种B2-01基因组组分析

[0057] 使用NCBI(National Center for Biotechnology Information Search database)进行编码基因预测。非编码RNA(non-coding RNA,ncRNA),即不编码蛋白质的RNA分子,其中tRNA、rRNA、sRNA在微生物中的研究较为普遍。使用RNAmmer(version 1.2)软件预测rRNA,使用tRNAscan(version 1.3.1)软件预测tRNA,使用cmscan(version 1.1.2)软件和Rfam数据库,预测sRNA。使用CRISPRfinder(version 4.2.17)软件对基因组进行CRISPR预测。使用软件Phage\_Finder(version 2.0)软件预测前噬菌体。

[0058] B2-01编码基因总长度为2,168,025,编码基因个数为2149个,编码基因的GC含量为60.15%。非编码RNA(non-coding RNA,ncRNA),即不编码蛋白质的RNA分子,但可执行多种生物学功能,在RNA水平对生命活动发挥作用。其中tRNA、rRNA、sRNA在微生物中的研究较为普遍。预测得到rRNA 12个、tRNA 57个、sRNA 1个。使用CRISPRfinder软件对基因组进行CRISPR预测。长双歧杆菌B2-01中注释到1个可信的CRISPR,区域长度为4176bp。使用软件Phage\_Finder预测前噬菌体。在B2-01基因组中发现了1个总长度为38189bp的前噬菌体。

[0059] 3.基于全基因组测序的亚种水平鉴定

[0060] (1)B2-01菌株的ANI分析及系统发育树的构建

[0061] 使用NCBI数据库搜索与B2-01亲缘关系接近的菌株。以长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) Bi-26、*Bifidobacterium longum*

subsp. infantis NLS、*Bifidobacterium longum* subsp. infantis ATCC 15697、长双歧杆菌长亚种 (*Bifidobacterium longum* subsp. longum) JCM7055、长双歧杆菌猪亚种 (*Bifidobacterium longum* subsp. suis) DSM 20211 为参考菌株。采用 pyani 计算 B2-01 基因组与参考菌株基因组的两两基因组比对区域的平均核苷酸同源性值 (Average Nucleotide Identity, ANI)。采用 Diamond 对所有参与分析的物种氨基酸 (或核苷酸) 序列进行比对, 使用 OrthoMC 进行相似性聚类。根据基因家族分析中的聚类结果, 分别统计测序菌株和参考菌株的菌株特有基因, 得到核心基因组和泛基因组的基因个数。用 MUSCLE 软件进行序列比对, 利用 iqtree 构建基于核心基因组的系统发育树。

[0062] 平均核苷酸同源性值 (ANI) 可判断不同物种的全基因组序列的整体相似程度, 对近缘物种的区分度较高, 通常, ANI 值以 95% 作为分类阈值区分不同物种。以长双歧杆菌婴儿亚种 Bi-26、NLS、ATCC 15697、长双歧杆菌长亚种 JCM7055 和长双歧杆菌猪亚种 DSM 20211 为参考菌株。将 B2-01 菌株与参考菌株进行 ANI 分析, 热图如图 2 (A) 所示, 除了 JCM7055 菌株, B2-01 菌株与其他参考菌株的全基因组的 ANI 值均在 95% 以上, 可确认 B2-01 菌株的种水平分类学地位, 鉴定为长双歧杆菌。B2-01 菌株与 Bi-26、NLS 和 ATCC 15697 菌株的 ANI 值均大于 98%, 具有更高的相似性, 亲缘关系更近。

[0063] 泛基因组 (Pan genome) 指近缘物种群体内的所有基因, 分为核心基因组 (core genome, 所有菌株中都存在的基因) 和非必须基因组 (Dispensable genome, 除去共有基因以外的基因)。基于同源基因家族分析, 得出核心基因组基因 1276 个, 泛基因组基因 3433 个。基于核心基因组构建系统发育树, 如图 2 (B) 所示, 长双歧杆菌 B2-01 与 Bi-26 和 NLS 菌株处于同一个分支, 可信度为 100, 说明, B2-01 菌株与长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum* subsp. infantis) 的同源性更高。

[0064] (2) B2-01 菌株的数字 DDH 分析

[0065] 使用 NCBI 数据库搜索与 B2-01 亲缘关系接近的标准菌株。选取 10 株标准菌株作为参考菌株。通过 GGDC 在线分析数据库 (<https://www.dsmz.de/services/online-tools/genome-to-genome-distance-calculator-ggdc>) 计算 B2-01 菌株和参考菌株的数字 DDH 值 (dDDH)。

[0066] 选取 10 株标准菌株的全基因组序列作为参考序列进行分析。研究表明通过 dDDH 技术可有效将目标菌株鉴定至亚种水平, 其判定阈值为 79%~80%, dDDH 值大于 79% 为同一亚种。如表 1 所示, B2-01 菌株与 *Bifidobacterium longum* subsp. infantis ATCC 15697、JCM11347、JCM7010 的 dDDH 值均大于 82%, 与长双歧杆菌长亚种、猪亚种的 dDDH 值均小于 70%, B2-01 菌株鉴定为长双歧杆菌婴儿亚种。

[0067] 表 1 dDDH 分析结果

菌株编号	参考菌株	dDDH (%)
B2-01	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. infantis ATCC 15697	84.4
B2-01	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. infantis JCM11347	83.1
B2-01	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. infantis JCM7010	82.6
B2-01	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. suillum DSM 28597	67.5

[0068]

[0069]	B2-01	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suillum</i> JCM 19995	67.4
	B2-01	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i> DSM 20211	66.5
	B2-01	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM 11343	62.6
	B2-01	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM 1217	62.3
	B2-01	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM 7052	62.2
	B2-01	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM 7055	61.8

[0070] 4. 长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的基因功能注释

[0071] 使用Blastp (version 2.6.0) 将基因编码的氨基酸序列和Nr数据库 (Non-redundant protein database, 即非冗余的蛋白质数据库) 比对获得注释信息。根据Nr注释信息, 使用Blast2GO (version 2.3.5) 得到基因的GO注释信息, 并对所有基因做GO功能分类统计。使用DIAMOND (version 0.9.22) 与COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins) 数据库比对, 获得基因对应的注释结果, 并根据注释结果对蛋白进行功能分类。使用DIAMOND (version 0.9.22) 与KEGG数据库比对, 获得基因所对应的注释结果。

[0072] (1) 基因组COG功能注释

[0073] COG (Cluster of orthologous group of proteins) 数据库是由NCBI创建并维护的蛋白数据库, 根据细菌、藻类和真核生物完整基因组中编码蛋白的系统进化关系构建而成。使用Diamond与COG数据库比对, 获得基因对应的注释结果, 并根据注释结果对蛋白进行功能分类。长双歧杆菌B2-01基因组中共有1388个基因获得COG注释。COG功能注释分布如图3所示。长双歧杆菌B2-01氨基酸转运和代谢 (E) 相关基因得到了最多注释, 达到239个, 同时, 碳水化合物转运和代谢 (G) 也得到了较高的基因注释量 (189个), 这意味着该菌株具有较强的碳水化合物和氨基酸的利用能力。除此之外, 防御机制 (V) 的注释量为72个, 从基因型上表明B2-01具有一定的抵抗环境胁迫的潜力。

[0074] (2) 基因组GO功能注释

[0075] Gene Ontology (简称GO) 是一个国际化的基因功能分类体系。GO注释包含三个ontology, 分别为: 细胞组分 (cellular component)、分子功能 (molecular function) 和生物过程 (biological process)。使用Blast2GO得到基因的GO注释信息, 并对所有基因做GO功能分类统计, 如图4所示, 长双歧杆菌B2-01基因组的所有编码蛋白序列分到3大类57个GO条目中。注释细胞过程 (cellular process) 的基因最多, 且有些基因参与多个GO条目。

[0076] (3) 基因组KEGG功能注释

[0077] KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 是系统分析基因产物在细胞中的代谢途径以及基因产物功能的数据库, 长双歧杆菌B2-01基因组中共有1196个基因获得KEGG注释。KEGG注释结果如图5所示, 其中关于碳水化合物代谢的基因134个, 氨基酸代谢的基因115个, 膜运输的基因85个、信号转导基因28个。

[0078] 5. 长双歧杆菌婴儿亚种B2-01安全性评价的相关基因注释

[0079] 根据毒力因子数据库 (Virulence factor database, VFDB) 对B2-01菌株的全基因组进行注释, 取比对结果中相似度大于50%且E值小于 $1 \times 10^{-10}$ 的注释结果。并在KEGG和VFDB数据库中对安全性相关基因进行注释。

[0080] 如表2所示,B2-01菌株的基因组在VFDB数据库中共注释到17个毒力因子,占全部的0.79%,但不能将其全部归为与毒性相关或是表达基因。这些注释到的毒力基因在其余数据库如KEGG和COG数据库中,不一定表达与毒力相关。在注释到的17个毒力基因中,groEL、clpB、relA基因与环境胁迫的应激有关,有助于菌株抵抗环境胁迫;tuf、secA基因与细胞黏附相关,有助于菌株的黏附定植;sigA基因与调控相关;其他基因与运输、信号转导、碳水化合物代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢相关。并未注释到高毒性蛋白相关基因。代谢相关基因在没有确定其次级有害代谢产物的表型结果时,并不能确定其定可产生毒力作用。

[0081] 利用Blast在VFDB数据库中搜索长双歧杆菌B2-01的潜在毒力基因,在匹配搜索条件的基因中并未发现硝基还原酶、色氨酸酶、氨基脱羧酶和溶血素相关基因,且在VFDB和KEGG数据库中未注释到产生腐胺、酪胺、组胺、尸胺的完整基因簇。

[0082] 表2毒力因子基因注释结果

基因位点	基因名称	注释
[0083] OAZ86_00395	<i>clpB</i>	Clp protease
OAZ86_00625	<i>leuD</i>	3-isopropylmalate dehydratase small subunit
OAZ86_01865	<i>mpa</i>	ATPase
OAZ86_01885	<i>pafA</i>	hypothetical protein
OAZ86_02015	<i>ugd</i>	UDP-glucose-6-dehydrogenase
OAZ86_02960	<i>tuf</i>	elongation factor Tu
OAZ86_03095	<i>glnA</i>	glutamine synthetase, type I
OAZ86_05705	<i>pvd</i>	peptide synthase
OAZ86_06105	<i>relA</i>	GTP pyrophosphokinase
OAZ86_06160	<i>sigA</i>	RNA polymerase sigma factor
[0084] OAZ86_06200	<i>secA</i>	preprotein translocase subunit SecA
OAZ86_07465	<i>phoP</i>	response regulator with CheY-like receiver domain and winged-helix DNA-binding domain
OAZ86_07480	<i>groEL</i>	chaperonin GroEL
OAZ86_08065	<i>zmp</i>	metallopeptidase
OAZ86_09430	<i>regX</i>	two-component sensory transduction protein RegX3
OAZ86_10000	<i>ctpV</i>	metal cation transporter p-type ATPase
OAZ86_11435	<i>sugC</i>	sugar ABC transporter ATP-binding protein

[0085] 实施例2长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的耐氧性评价

[0086] 将-20℃冰箱中冻存的菌株,接种于MRS肉汤培养基中,连续2次活化,得到种子发

酵液。将种子发酵液按3% (v/v) 的接种量接入MRS肉汤培养基中,37℃过夜培养得到菌株发酵液。

[0087] 取60mL的MRS肉汤培养基倒入250mL锥形瓶,121℃,灭菌15min。培养基冷却至室温后,将菌株发酵液按5% (v/v) 的接种量接种于MRS肉汤培养基,在37℃、180rpm的条件下培养,培养0h后测定活菌数,记为 $N_0$ ,培养t h后,取样测定活菌数,记为 $N_t$ 。由公式(1)计算存活率。并对B2-01菌株的基因组中氧气耐受相关基因进行注释。

$$[0088] \quad \text{存活率(\%)} = \frac{\lg N_t}{\lg N_0} \times 100, t=6,12,18 \quad (1)$$

[0089] 如图6所示,在37℃、180rpm的条件下摇床培养18h后,B2-01菌株存活率仍可达90.02%。如表3所示,B2-01基因组具有编码SIR2家族蛋白的基因(OAZ86\_11595),该基因能降低抗氧化酶foxo-依赖性转录,减少细胞中活性氧(ROS)的积累,携带该基因的长双歧杆菌能够清除人体内的自由基,有效延缓衰老。硫氧还蛋白系统(the thioredoxin system)是保护菌体细胞免受氧化损伤的抗氧化系统,B2-01基因组注释到较为完整的硫氧还蛋白系统,其中包括trxA、trxB、nrdH、msrAB、BCP基因。锰有助于菌体细胞抵御细胞内的活性氧(ROS),B2-01的mntH基因可以促进菌体细胞摄取锰离子,从而抵抗氧化应激。dps、fur和sufBCD基因的表达有助于Fe-S簇蛋白的合成和保护,进而减轻ROS对菌体的损伤。B2-01还注释到Clp、GroES和GroEL分子伴侣的编码基因,分子伴侣可以抑制由氧化应激引起的蛋白质错误折叠、蛋白质聚集和蛋白质变性,进而减轻蛋白质的氧化损伤。上述结果表明B2-01菌株具有较好的氧气耐受性,有利于菌株的工业化生产。

[0090] 表3长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的氧胁迫应激性相关基因

[0091]

基因位点	基因名称	基因功能
OAZ86_11595	npdA	SIR2 family protein;NAD-dependent deacetylase
OAZ86_02130	trxA	thioredoxin
OAZ86_11115	trxB	thioredoxin reductase (NADPH)
OAZ86_11410	nrdH	glutaredoxin-like protein NrdH
OAZ86_10915	msrAB	peptide methionine sulfoxide reductase msrA/msrB
OAZ86_09020	mntH	manganese transport protein
OAZ86_00600	mutT1	NTP pyrophosphohydrolase
OAZ86_04535	BCP	alkyl hydroperoxide reductase/Thiol specific antioxidant
OAZ86_04330	sufB	Fe-S cluster assembly protein SufB
OAZ86_04335	sufD	Fe-S cluster assembly protein SufD
OAZ86_04340	sufC	Fe-S cluster assembly ATP-binding protein
OAZ86_02670	fur	ferric uptake regulator
OAZ86_11150	dps	DNA-binding ferritin-like protein for protection from oxidative

[0092] 实施例3长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的高密度培养

[0093] 将-20℃冰箱中冻存的菌株,接种于MRS肉汤培养基中,连续2次活化,得到种子发酵液。

[0094] 按照各实验组别的培养基配方配制培养基,调节培养基的pH至 $6.8 \pm 0.1$ 后,121℃灭菌15min,待冷却至37℃左右,以体积比为3:100的比例,将二次活化的种子发酵液接种于不同实验组别的培养基中,置于37℃恒温培养箱,静置培养18~20h后,收集菌株发酵液,进行活菌计数。

[0095] (1)Plackett-Burman试验

[0096] 采用单因素实验优化酵母浸提粉、细菌学蛋白胨、葡萄糖、乳糖、低聚半乳糖的质量分数。当MRS肉汤培养基中分别含有质量分数为3.00%的酵母浸提粉、2.00%的细菌学蛋白胨、3.00%的葡萄糖、3.00%的乳糖和2.00%的低聚半乳糖时,获得B2-01菌株发酵液是各自单因素试验中活菌数最高的。因而选择这几个质量分数作为0水平,Plackett-Burmen试验设计的因素及水平如表4所示。

[0097] Plackett-Burman试验设计方案及结果如表5所示。对表5中的数据进行分析,结果如表6所示,对B2-01活菌数影响最大的三个因素是酵母浸提粉、葡萄糖和乳糖,其贡献率分别为53.98%、11.62%、8.73%。结果表明在这5个影响因素中,酵母浸提粉、葡萄糖和乳糖促进B2-01增殖的作用较其他因素更为明显。因此,选择酵母浸提粉、葡萄糖和乳糖这三种影响因素,进行下一步的最陡爬坡实验。

[0098] 表4Plackett-Burmen试验设计的因素及水平

因素	水平	
	-1	1
A-酵母浸提粉	2.00%	4.00%
B-细菌学蛋白胨	1.00%	3.00%
C-乳糖	2.00%	4.00%
D-葡萄糖	2.00%	4.00%
E-低聚半乳糖	1.50%	2.50%

[0100] 注:A、B、C、D、E分别代表酵母浸提粉、细菌学蛋白胨、乳糖、葡萄糖、低聚半乳糖的质量分数

[0101] 表5Plackett-Burmen试验结果表

实验组别	A-酵母浸提粉	B-细菌学蛋白胨	C-乳糖	D-葡萄糖	E-低聚半乳糖	活菌数( $\times 10^9$ CFU/mL)
1	1	1	-1	-1	-1	3.67 $\pm$ 0.42

[0103]	2	1	1	-1	1	1	2.76±0.06
	3	-1	1	1	1	-1	2.31±0.08
	4	1	-1	1	1	-1	3.42±0.40
	5	1	1	1	-1	-1	3.81±0.80
	6	1	1	-1	1	1	3.01±0.17
	7	1	-1	-1	-1	1	3.26±0.27
	8	-1	-1	1	-1	1	3.14±0.24
	9	-1	-1	-1	-1	-1	1.88±0.05
	10	-1	1	1	-1	1	2.75±0.05
	11	1	-1	1	1	1	2.9±0.20
	12	-1	-1	-1	1	-1	1.41±0.01

[0104] 表6 Plackett-Burman 试验分析表

	Term	Stdized Effects	Sum of Squares	Contribution(%)
[0105]	A-酵母浸提粉	0.97	2.82	53.98
	B-细菌学蛋白胨	0.38	0.44	8.43
	C-乳糖	0.39	0.46	8.73
	D-葡萄糖	-0.45	0.61	11.62
	E-低聚半乳糖	0.22	0.15	2.78

## [0106] (2) 最陡爬坡实验

[0107] 在 Plackett-Burman 试验中, 由表6可知, 酵母浸提粉和乳糖是正效应, 应增加。葡萄糖是负效应, 应减少。最陡爬坡试验设计方案及结果见表7。方案4的活菌数最大, 选择方案4作为响应面试验的中心点。

[0108] 表7 最陡爬坡试验设计及结果

	方案序号	酵母浸提粉/%	葡萄糖/%	乳糖/%	活菌数 ( $\times 10^9$ CFU/mL)
[0109]	1	2.00%	4.00%	2.00%	2.90±0.05
	2	2.50%	3.50%	2.25%	3.27±0.15
	3	3.00%	3.00%	2.50%	3.80±0.10

[0110]	4	3.50%	2.50%	2.75%	4.07±0.21
	5	4.00%	2.00%	3.00%	3.01±0.09

[0111] (3) Box-Behnken 试验

[0112] 在最陡爬坡试验的基础上得到,质量分数为3.50%的酵母浸提粉、2.50%的葡萄糖、2.75%的乳糖为响应面的中心点。运用Design-Expert 10.0.7软件设计三因素三水平的Box-Behnken试验,Box-Behnken试验设计的因素及水平见表8。

[0113] Box-Behnken试验设计方案及结果见表9,回归模型方差分析见表10。由表10可知,模型的p值为0.0010<0.05,模型显著,决定系数 $R^2=0.9492$ ,失拟项的p值为0.2126>0.05,失拟项不显著,说明模型与实际情况的拟合较好。

[0114] 根据以上分析得出响应值Y(活菌数)与三种营养因素酵母浸提粉(A)、葡萄糖(B)、乳糖(C)的回归方程为:

$$[0115] Y = 4.44000 - 0.10875A - 0.037500B + 0.038750C - 0.29750AB - 0.27000AC - 0.61250BC - 1.01000A^2 - 0.49250B^2 - 0.91000C^2$$

[0116] 由回归方程可知,当响应值Y(活菌数)最大值时,酵母浸提粉(A)为3.45%、葡萄糖(B)为2.48%,乳糖(C)为2.79%。此时理论预测B2-01活菌数为 $4.45 \times 10^9$ CFU/mL,对该配方培养基进行验证,发酵液的活菌数为 $4.20 \times 10^9$ CFU/mL,与预测值吻合,拟合率达94.38%。

[0117] 综上所述,长双歧杆菌婴儿亚种B2-01的高密度培养基为:酪蛋白酶消化物1份、牛肉膏粉1份、酵母膏粉3.45份、柠檬酸三铵0.2份、乙酸钠0.5份、硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )0.02份、硫酸锰( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ )0.005份、磷酸氢二钾0.2份、葡萄糖2.48份、吐温80 0.108份,乳糖2.79份,向上述原料加入100份蒸馏水,搅拌溶解后,调节pH至 $6.8 \pm 0.1$ ,121℃灭菌15min。

[0118] 表8Box-Behnken试验设计的因素及水平

因素	水平		
	-1	0	1
[0119] A-酵母浸提粉	2.50%	3.50%	4.50%
B-葡萄糖	2.00%	2.50%	3.00%
C-乳糖	2.00%	2.75%	3.00%

[0120] 注:A、B、C分别代表酵母浸提粉、葡萄糖、乳糖的质量分数。

[0121] 表9Box-Behnken试验设计及结果

[0122]

实验组别	A- 酵母浸提粉	B- 葡萄糖	C- 乳糖	活菌数 ( $\times 10^9$ CFU/mL)
1	-1	1	0	3.46 $\pm$ 0.46
2	1	0	1	2.06 $\pm$ 0.09
3	0	1	1	2.28 $\pm$ 0.12
4	0	0	0	4.10 $\pm$ 0.10
5	-1	0	-1	2.44 $\pm$ 0.04
6	1	-1	0	3.01 $\pm$ 0.09
7	-1	0	1	2.93 $\pm$ 0.07
8	1	1	0	2.76 $\pm$ 0.15
9	0	0	0	4.50 $\pm$ 0.40
10	-1	-1	0	2.52 $\pm$ 0.02
11	0	0	0	4.70 $\pm$ 0.20
12	0	0	0	4.30 $\pm$ 0.40
13	0	1	-1	3.30 $\pm$ 0.10
14	0	-1	1	4.00 $\pm$ 0.30
15	0	-1	-1	2.57 $\pm$ 0.03
16	1	0	-1	2.65 $\pm$ 0.06
17	0	0	0	4.60 $\pm$ 0.20

[0123] 表10回归模型方差分析

[0124]

来源	总和	自由 度	均方	F 值	p-value Prob>F	显著性
模型	12.00	9	1.33	14.52	0.0010	significant
A-酵母浸提粉	0.095	1	0.095	1.03	0.3438	
B-葡萄糖	0.011	1	0.011	0.12	0.7366	
C-乳糖	0.012	1	0.012	0.13	0.7282	
AB	0.35	1	0.35	3.86	0.0903	

[0125]	AC	0.29	1	0.29	3.18	0.1179	
	BC	1.50	1	1.50	16.35	0.0049	
	A2	4.30	1	4.30	46.79	0.0002	
	B2	1.02	1	1.02	11.12	0.0125	
	C2	3.49	1	3.49	37.98	0.0005	
	残差	0.64	7	0.092			
	失拟项	0.41	3	0.14	2.36	0.2126	not significant
	净误差	0.23	4	0.058			
	总误差	12.64	16				

[0126] 本发明的上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例,而并非是对本发明的实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无法对所有的实施方式予以穷举。凡是属于本发明的技术方案所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之列。

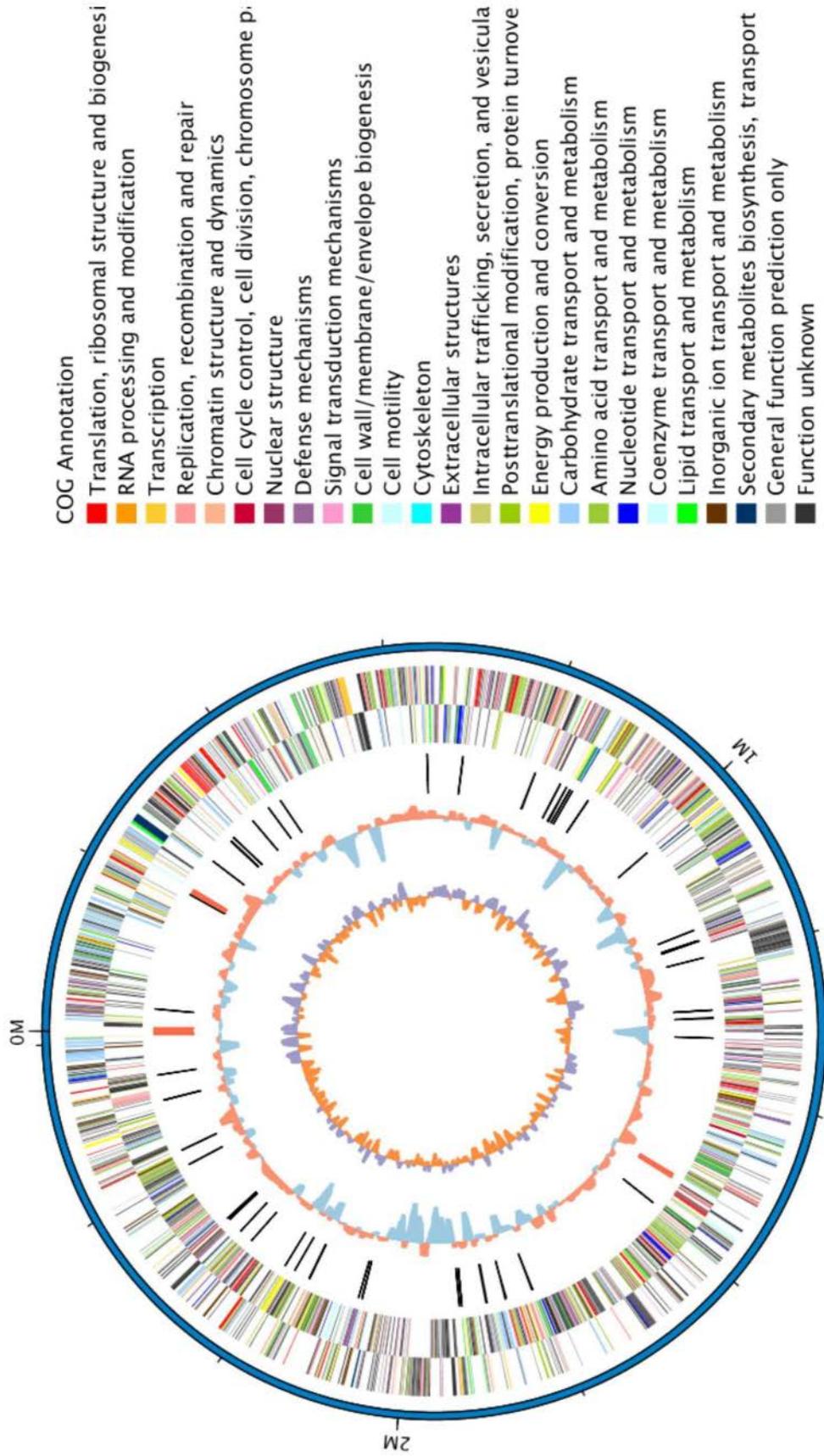


图1

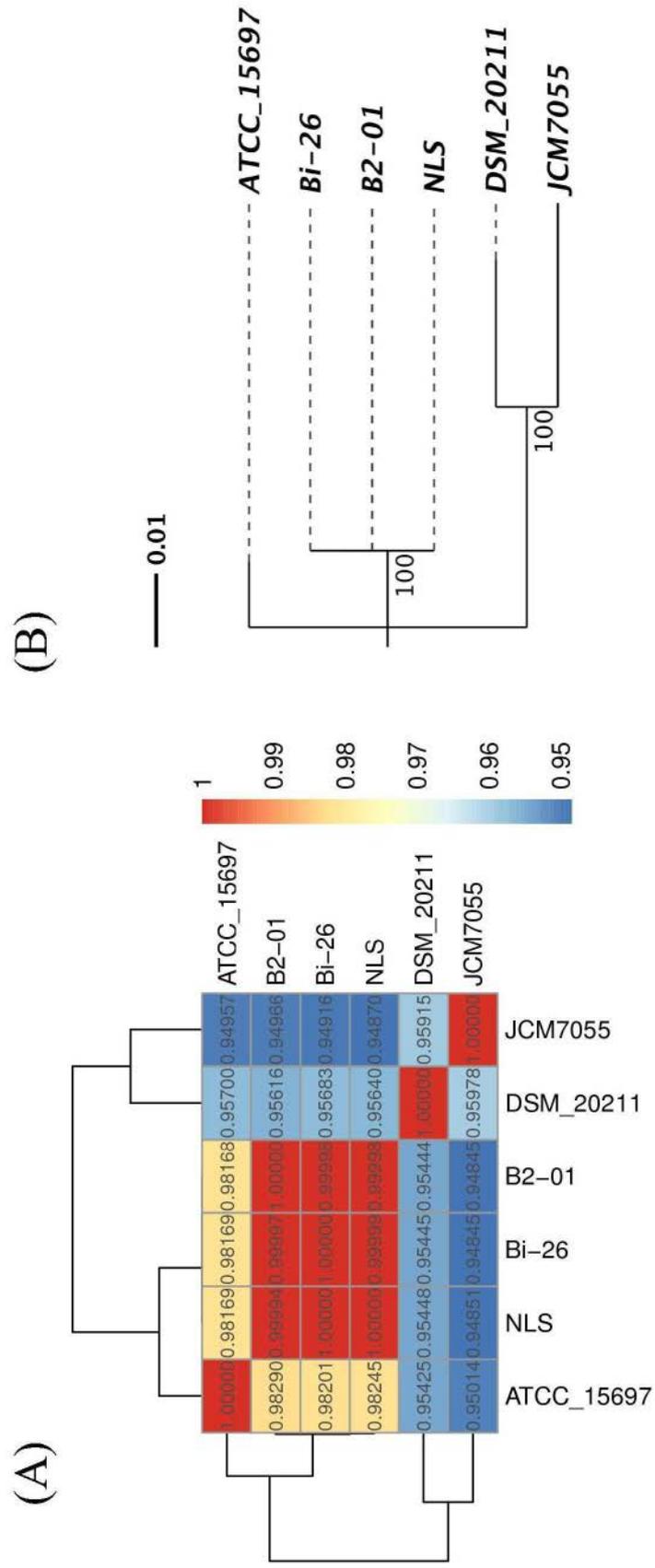


图2

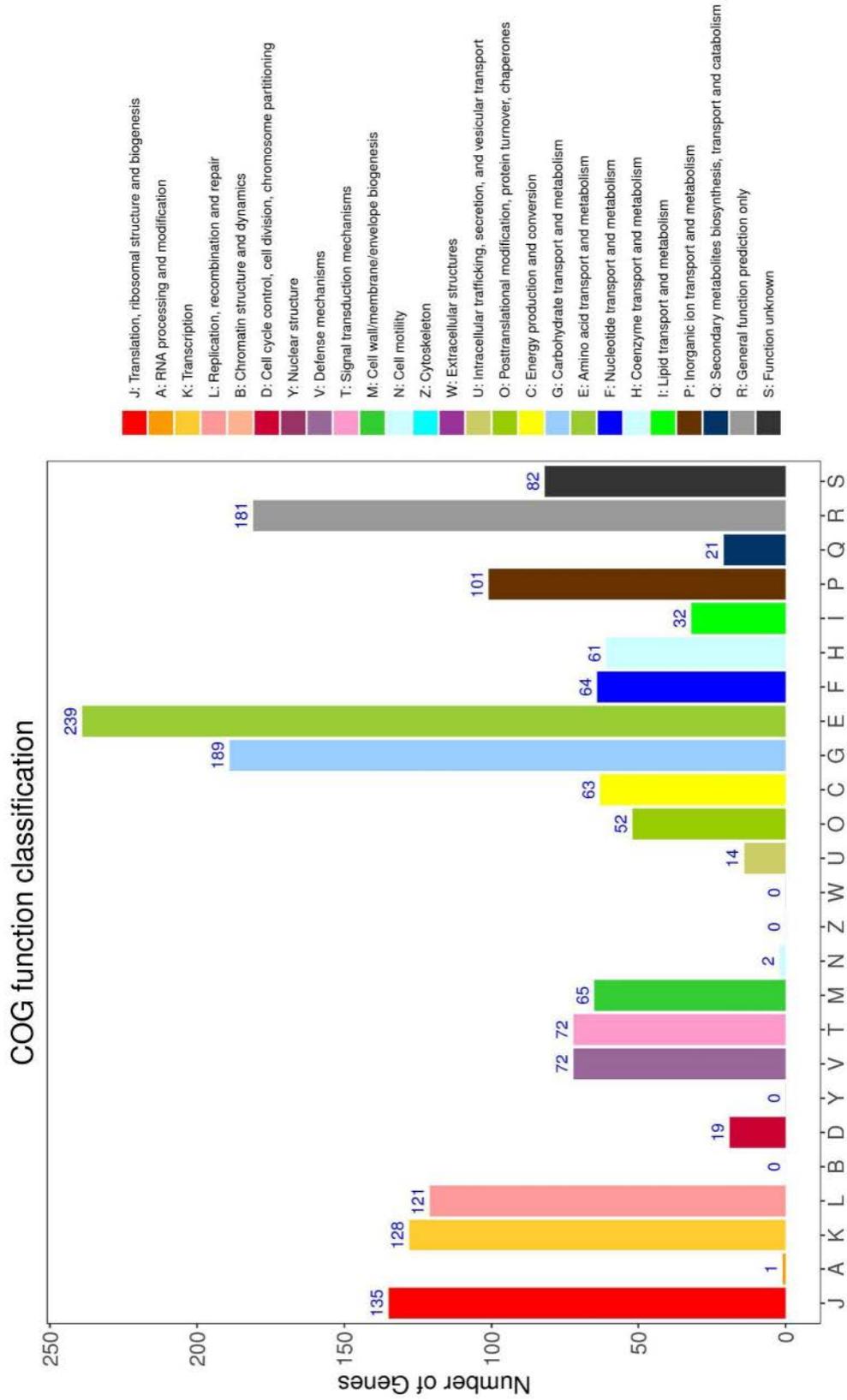


图3

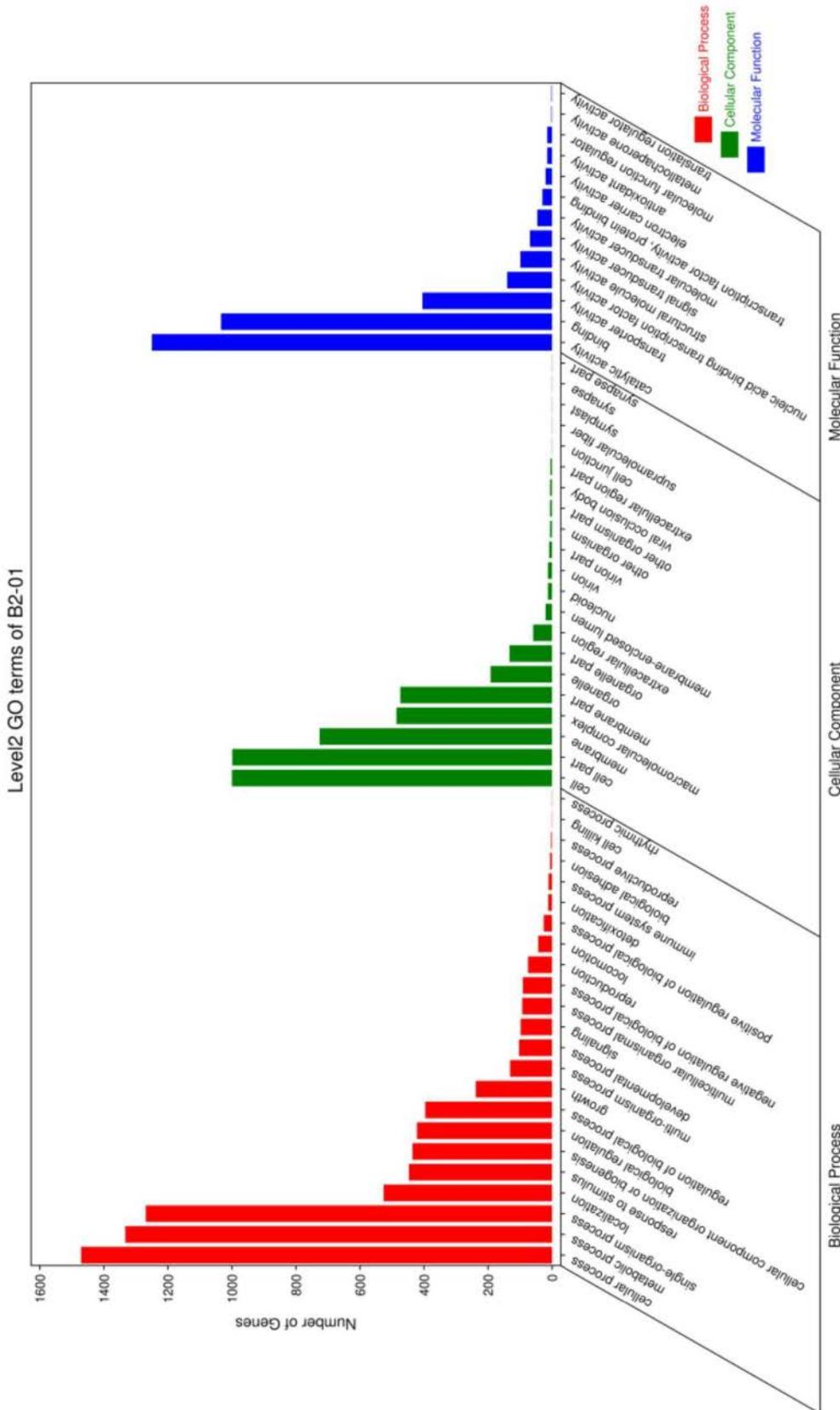


图4

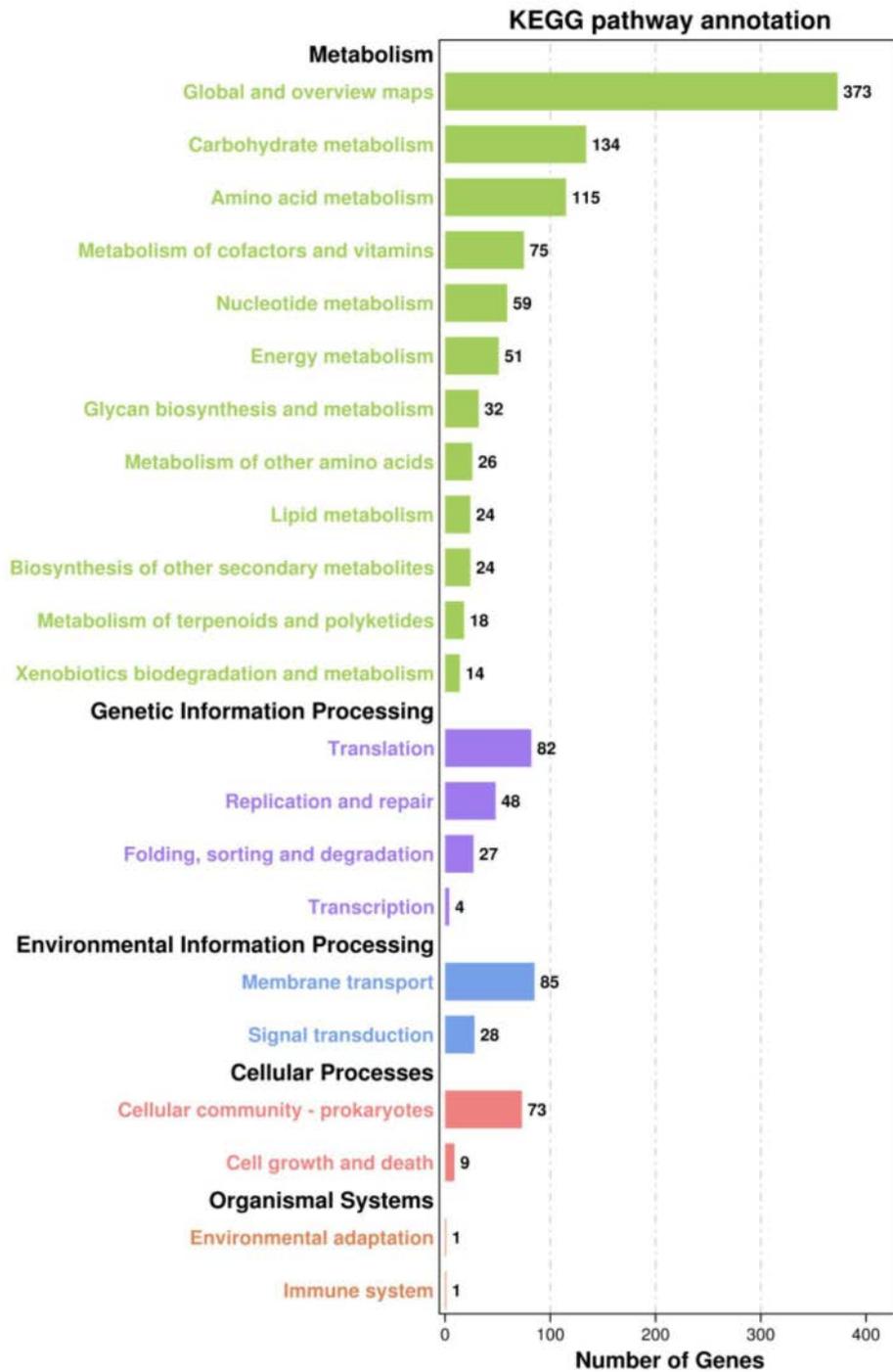


图5

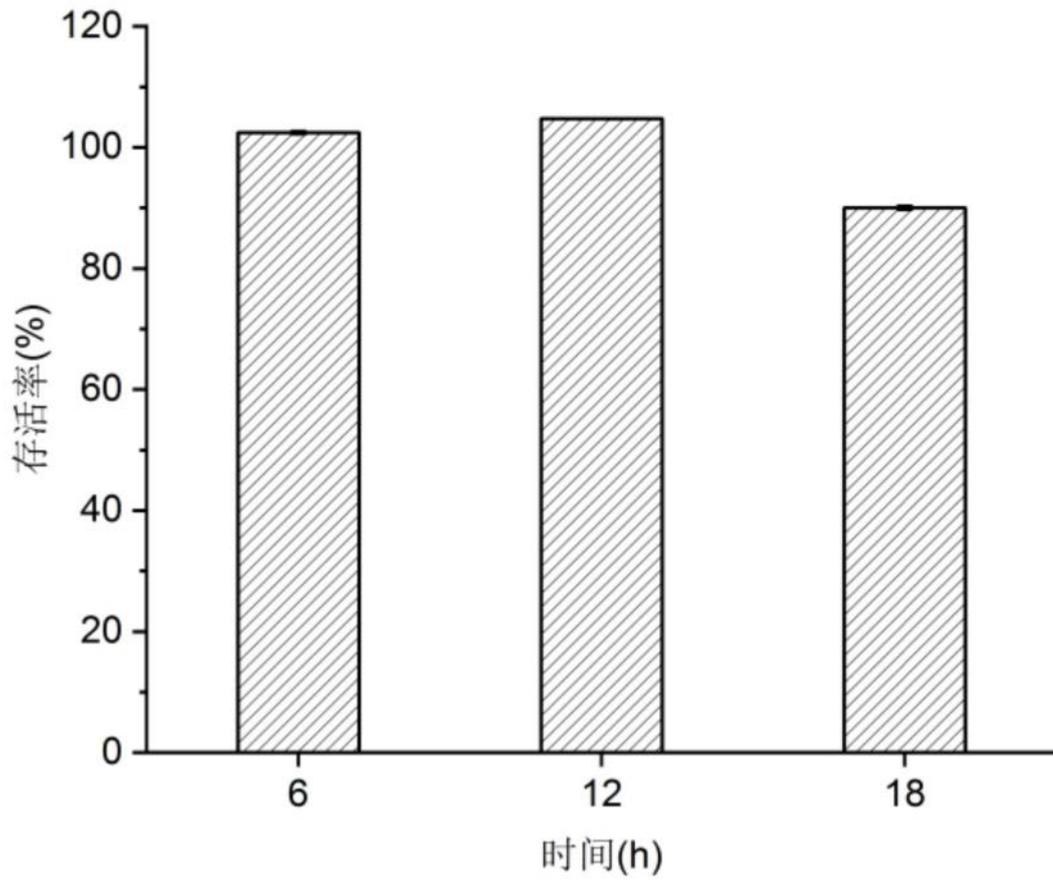


图6