



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104531590 A

(43) 申请公布日 2015.04.22

(21) 申请号 201510018144.4

(22) 申请日 2015.01.14

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO. 10224 2014.12.18

(71) 申请人 贵州大学

地址 550025 贵州省贵阳市花溪区霞晖路贵州大学(南校区)

(72) 发明人 何腊平 张玲

(74) 专利代理机构 贵阳中工知识产权代理事务所 52106

代理人 刘安宁

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A61P 3/06(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

一株香猪源性降胆固醇、耐氧双歧杆菌 BZ11

(57) 摘要

一株香猪源性降胆固醇、耐氧双歧杆菌 BZ11, 该菌株为动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*), 该菌株纯培养物于 2014 年 12 月 18 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC), 地址是: 中国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, 邮政编码 100101; 保藏编号 CGMCC NO. 10224, 简称动物双歧杆菌乳亚种 BZ11。动物双歧杆菌乳亚种 BZ11 不仅降胆固醇能力高、耐酸受性、耐胆盐受性、耐氧性能良好和具有益生特性, 能作为益生菌添加到发酵乳制品中使其成为功能性食品, 丰富了双歧杆菌菌种资源, 有利于双歧杆菌保健产品的开发。

1. 一株香猪源性降胆固醇、耐氧双歧杆菌 BZ11, 其特征在于该菌株为动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*), 该菌株的纯培养物已于 2014 年 12 月 18 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC), 该中心地址是: 中国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, 邮政编码: 100101; 保藏编号为 CGMCC NO. 10224, 简称为动物双歧杆菌乳亚种 BZ11。

2. 如权利要求 1 所述的香猪源性降胆固醇、耐氧双歧杆菌 BZ11, 其特征在于所述动物双歧杆菌乳亚种 BZ11 的形态特征及生理生化特征菌均接近于双歧杆菌属, 其 16S rRNA 基因序列与动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*) 的 16S rRNA 序列同源率为 100%, 根据《伯杰氏系统细菌学手册》中双歧杆菌属的分类规定, 动物双歧杆菌乳亚种 BZ11 属于放线菌门 (Actinobacteria)、放线菌纲 (Actinobacteria)、放线菌亚纲 (Actinobacteridae)、双歧杆菌目 (Bifidoacterales)、双歧杆菌科 (Bifidobacteriaceae)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*), 动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*)。

3. 如权利要求 1 和 2 之一所述的香猪源性降胆固醇、耐氧双歧杆菌 BZ11, 其特征在于所述动物双歧杆菌乳亚种 BZ11 具有安全性: 该菌株对青霉素 G、哌拉西林、阿莫西林 / 棒酸、万古霉素、头孢噻肟、头孢唑啉、阿奇霉素、利福平、呋喃妥因 9 类抗生素敏感, 对环丙沙星、新霉素、复方新诺明、氧氟沙星、诺氟沙星和多粘菌素 B 共 6 类抗生素耐药; 青霉素类药物中, 该菌株对氨苄西林敏感; 头孢素类药物中, 该菌株对头孢哌酮敏感; 大环内酯类药物中, 该菌株对乙酰螺旋霉素敏感; 喹诺酮类药物中, 该菌株对林霉素敏感;

且通过灌胃小鼠实验, 表明动物双歧杆菌乳亚种 BZ11 菌株无急性毒性, 因此初步证实了该菌株的安全性, 并通过灌胃小鼠实验进一步验证了其体内降胆固醇作用。

一株香猪源性降胆固醇、耐氧双歧杆菌 BZ11

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物,特别涉及降胆固醇、耐氧双歧杆菌。

背景技术

[0002] 胆固醇广泛存在于动物组织细胞中,是构成细胞的重要成分之一,在人体中发挥着重要的生理作用,它在体内转化形成类固醇激素,是合成维生素 D 以及胆汁酸的前体物质。体内胆固醇主要有两个来源,一是食物,二是内源合成。有些人由于不合理膳食习惯,血液胆固醇含量超过正常指标;而体内胆固醇含量过高会造成动脉粥样硬化、冠心病等心脑血管疾病,严重威胁到人类健康。据报道,全球心脑血管疾病引起人类死亡的人数占总死亡人数的 29%,根据世界卫生组织预测,到 2030 年,心脑血管疾病仍将是导致人类死亡的主要原因,而血清中的胆固醇过高是引发冠心病、动脉硬化、脑中风等心脑血管疾病的重要因素。有研究发现与拥有正常血脂的人相比,高胆固醇血症的人患心脏病的风险是其正常人的 3 倍。因此,通过降低血清胆固醇水平来对心脑血管疾病进行防治是一种实效可行的研究方向,具有潜在的应用价值和广阔市场空间。

[0003] 欲降低体内胆固醇,除了通过合理饮食以外,运用生物转化法,特别是运用益生菌对胆固醇进行直接降解已成为研究的趋势。双歧杆菌作为人体肠道内的一类益生菌,其益生作用有维持肠道内菌群平衡、降低血清胆固醇、抗肿瘤等益生作用。而贵州香猪是贵州省特色资源,属于小型猪,其遗传稳定,器官结构和功能与人体相似。因此,从香猪中筛选出来的双歧杆菌易于为人体所接受和利用。

[0004] 目前中国专利数据库中,涉及双歧杆菌的专利申请件很多,但涉及耐氧双歧杆菌的专利申请件仅有浙江大学申请的 ZL2009100965117 号《一种耐氧性双歧杆菌》和天津科技大学申请的 ZL2011100894937 号《一种耐氧耐酸性长双歧杆菌》。这两个双歧杆菌能否降胆固醇不得而知。迄今为止,尚无涉及降胆固醇、耐氧动物双歧杆菌的申请件。

发明内容

[0005] 本发明旨在提供一株香猪源性降胆固醇、耐氧双歧杆菌,使之有可能作为益生菌进一步深度开发利用,添加到发酵乳制品中使其成为功能性食品,以降低人体胆固醇含量,促进人类健康。

[0006] 发明人提供的香猪源性降胆固醇、耐氧双歧杆菌,该菌株为动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*),该菌株的纯培养物已于 2014 年 12 月 18 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC),该中心地址是:中国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,邮政编码:100101;保藏编号为 CGMCC NO. 10224,简称为动物双歧杆菌乳亚种 BZ11。该菌株是从贵州特色资源小香猪的肠道内容物中筛选与分离纯化得到。

[0007] 上述动物双歧杆菌乳亚种 BZ11 的形态特征及生理生化特征菌均接近于双歧杆菌属,其 16S rRNA 基因序列与动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp.

Lactis) 的 16S rRNA 序列同源率为 100%，根据《伯杰氏系统细菌学手册》中双歧杆菌属的分类规定，动物双歧杆菌乳亚种 BZ11 属于放线菌门 (Actinobacteria)、放线菌纲 (Actinobacteria)、放线菌亚纲 (Actinobacteridae)、双歧杆菌目 (Bifidobacteriales)、双歧杆菌科 (Bifidobacteriaceae)、双歧杆菌属 (Bifidobacterium)，动物双歧杆菌乳亚种 (Bifidobacterium animalis subsp. Lactis)。

[0008] 上述动物双歧杆菌 BZ11 的安全性如下：该菌株对青霉素 G、哌拉西林、阿莫西林/棒酸、万古霉素、头孢噻肟、头孢唑啉、阿奇霉素、利福平、呋喃妥因 9 类抗生素敏感，对环丙沙星、新霉素、复方新诺明、氧氟沙星、诺氟沙星和多粘菌素 B 共 6 类抗生素耐药。青霉素类药物中，该菌株对氨苄西林敏感；头孢素类药物中，该菌株对头孢哌酮敏感；大环内酯类药物中，菌株 BZ11 对乙酰螺旋霉素敏感；喹诺酮类药物中，该菌株对林霉素敏感。且通过灌胃小鼠实验，表明动物双歧杆菌乳亚种 BZ11 菌株无急性毒性，因此可以初步证实 BZ11 菌株的安全性，可以考虑作为益生菌进一步深度开发利用。并通过灌胃小鼠实验进一步验证了其体内降胆固醇作用。

[0009] 发明人提供的菌株是从贵州特色资源小香猪肠道内容物中分离并初步筛选出具有降胆固醇能力的双歧杆菌，并对所得的菌株以降胆固醇率、耐酸耐胆盐受性为指标进行进一步的复筛，复筛出一株胆固醇去除率高且耐酸受性、耐胆盐受性均良好的双歧杆菌菌株，然后进行耐氧性能实验、安全性评价实验及灌胃小鼠实验，之后通过对该菌株进行形态学、生理生化试验鉴定和 16S rRNA 序列鉴定，最终鉴定出此菌株为动物双歧杆菌乳亚种 (Bifidobacterium animalis subsp. Lactis)。

[0010] 为了验证本发明的菌株，发明人进行了如下实验：

[0011] (1) 样品的采集与分离纯化

[0012] 从贵州省特色资源小香猪的多个部位采样，包括小肠、大肠以及新鲜的小香猪粪便中，编号并记录，并迅速带回实验室处理。取 10g 的新鲜样品放入装有 90mL 的无菌生理盐水中，人工摇匀后，在洁净工作台内用移液枪吸取 100 μ l 混合液涂布于含有 Li-Mupirocin 的 MRS 平板上，置于厌氧培养箱（厌氧环境为 $N_2 : CO_2 : H_2 = 90 : 5 : 5$ ）中，37℃ 培养 48h，然后挑取单菌落接种于含有 X-gal 的 PTYG 平板上，放入 37℃、20% CO_2 浓度的二氧化碳培养箱中培养两天，观察菌落颜色、形态并进行革兰氏染色、镜检，记录菌株形态特征。将疑似双歧杆菌菌株在 PTYG 平板上纯化传代 4 次后，甘油保藏于 -80℃ 的超低温冰柜中。

[0013] 上述 MRS 琼脂培养基成分为：蛋白胨 10g，牛肉膏 10g，酵母粉 5g，葡萄糖 20g，吐温 80 1mL， K_2HPO_4 2g，醋酸钠 5g，柠檬酸二铵 2g， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g， $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25g，琼脂 20g；制法是将各成分加热溶解于 1000mL 蒸馏水中，调 pH 值至 6.5，121℃ 灭菌 15min，备用。

[0014] 上述含有 Li-Mupirocin 的 MRS 中，100mL MRS 琼脂培养基含有 5mg 的莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin)。

[0015] 上述 PTYG 液体培养基成分为：胰蛋白胨 5g，大豆蛋白胨 5g，酵母粉 10g，葡萄糖 10g，吐温 80 1mL，盐溶液 40mL；制法是将各成分加热溶解于 1000mL 蒸馏水中，调 pH 值至 6.5，121℃ 灭菌 15min，备用。

[0016] 上述培养基中的盐溶液成分为：无水 $CaCl_2$ 0.2g， K_2HPO_4 1.0g， KH_2PO_4 1.0g， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.48g， Na_2CO_3 10g，NaCl 2g；制法是将 $CaCl_2$ 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 混合在 300mL 蒸馏水中直至

溶解,加入 500mL 水,搅拌同时缓慢加入其他盐类,直至溶解;再加入 200mL 蒸馏水,混合后贮存于 4℃,备用。

[0017] 上述 PTYG 琼脂培养基制法为:在每 1000mL 的液体培养基中加入 20g 琼脂粉,加热煮沸,121℃ 灭菌 15min 后倾注平板,备用。

[0018] 上述含有 X-gal 的 PTYG (PTYG-X) 培养基制法为:在每 1000mL 的改良 PTYG 培养基中加入 X-gal 40mg,由于 X-gal 不耐高温,直接用无菌水稀释浓度为 20mg/mL,每个 PTYG 平板涂布 40 μ L,备用。

[0019] (2) 胆固醇去除率的测定

[0020] 将初筛所得的菌株采用邻苯二甲醛法 (OPA) 测其胆固醇去除率。

[0021] (3) 待测菌悬液的制备

[0022] 将保藏在 -80℃ 的超低温冰柜中的菌株活化,划线纯化 3 次后,接种于 PTYG 液体培养基中进行富集培养,然后将菌悬液离心,收集菌泥,将菌液浓度调至 10^8 CFU/mL,菌悬浮液带用于体外耐受实验。

[0023] (4) 酸耐受性实验

[0024] 将待测菌悬液按 5% (体积比) 接种量分别接种于 pH3.0 和 pH7.0 的灭菌 PTYG 液体培养基中,混匀后 37℃ 下静置 2h,进行平板计数。

[0025] (5) 胆盐耐受性实验

[0026] 将待测菌悬液按 5% (体积比) 的接种量分别接种于添加 0.3% (质量/体积) 牛胆盐的灭菌 PTYG 液体培养基和不含牛胆盐的灭菌 PTYG 液体培养中,37℃、二氧化碳培养箱中培养,分别于 0h 和 24h 进行活菌计数。

[0027] (6) 耐氧性能实验

[0028] 将经过耐酸性和胆盐耐受性的菌株接种到 PTYG 培养基中分别在普通培养箱和 20% CO₂ 的二氧化碳培养箱中培养 24h 后,进行平板计数。对两者生长情况进行对比以判断其耐氧性。

[0029] 通过上述采样、分离纯化的初筛实验以及以菌株的降胆固醇率,耐受性为指标进行复筛,最终得到一株菌株 BZ11,其降胆固醇率高,达到 38.52%,且耐酸受性和耐胆盐受性好,并对氧有较好耐受性。

[0030] (7) 菌株的安全性评价实验

[0031] a、药物敏感实验

[0032] 将 BZ11 菌株活化并在 PTYG 琼脂培养基中纯化 3 代后,液体 PTYG 培养基富集培养,然后将菌液在 5000r/min, 4℃ 条件下离心 10min,收集菌泥洗涤后,用 PBS 缓冲液配置为 10^8 CFU/mL 的菌悬液。然后选取 8 类 19 种药敏试剂片,采用 K-B 药敏纸片琼脂扩散法进行药物敏感实验。

[0033] b、急性毒性实验

[0034] 将 BZ11 菌株活化后,分离纯化三次,接种菌株在 PTYG 的液体培养基中二氧化碳培养箱中培养 48h,将菌液在以 5000r/min, 4℃ 条件下离心 10min,收集菌泥,再用无菌磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤一次并重新制成悬浮液,将菌液浓度调至 3×10^{10} CFU/mL。然后根据食品安全性毒理学评价程序和方法进行急性毒性实验。

[0035] (8) 降胆固醇、耐氧双歧杆菌的体内实验

[0036] 待测菌株 BZ11 和对照菌株金双歧解冻活化后纯化 3 次, 分别以 5% (体积比) 的接种量接种于 PTYG 液体培养基中, 在 37℃ 的二氧化碳培养箱中培养 24h 后, 以 5000r/min、4℃ 条件下离心 10min, 收集菌泥。再用灭菌 PBS 缓冲液进行 10 倍梯度稀释, 取 0. 1mL 在 PTYG 琼脂平板上涂布, 37℃ 培养 36 ~ 48h 后进行菌落计数, 根据平板计数结果, 分别将 BZ11 和金双歧调至菌悬液至 3.0×10^9 CFU/mL。然后进行小鼠灌胃实验, 在第 10、20 天时采血, 测其血清中总胆固醇含量、甘油三酯含量、高密度脂蛋白胆固醇含量、低密度脂蛋白胆固醇含量, 并计算其动脉硬化指数。为防止双歧杆菌死亡而影响结果, 每天新鲜配置菌液, 上午定时灌喂与放置饲料。

[0037] (9) 菌株的鉴定

[0038] 对所得的菌株进行生理生化鉴定以及种属的鉴定, 了解其生理生化特征, 对有效地应用文献、指导进一步的研究和应用有重要作用。因此, 对本发明的菌株 BZ11 进行生理生化实验鉴定以及 16S rRNA 序列的鉴定。

[0039] 形态特征: 将菌株接种于 PTYG 平板上, 37℃ 培养 48h, 其菌落形态为菌落较小、光滑、凸圆、边缘整齐、白色或乳白色不透明且质地柔软, 在 PTYG-X 平板上则呈现出深蓝色的菌落。挑取其菌落进行革兰氏染色, 其革兰氏染色呈阳性, 且在光学显微镜下观察其细胞形态呈多形态杆状, 符合双歧杆菌细胞形态特征。其生理生化实验结果见表 1。

[0040] 表 1 细胞形态及理化试验结果

[0041]

实验项目	结果	实验项目	结果	实验项目	结果
革兰氏染色	阳性	氧化酶	-	接触酶	-
细胞形态		多形态杆状			
碳水化合物产酸 (API 50CH)					
甘油	-	甘露醇	-	松三糖	-
赤癣糖	-	山梨醇	-	棉子糖	+
D-阿拉伯糖	-	α -甲基-D 甘露糖甙	-	淀粉	-
L-阿拉伯糖	-	α -甲基-D 葡萄糖甙	+	糖原	-
D-核糖	+	N-乙酰-葡糖胺	-	木糖醇	-
D-木糖	-	苦杏仁甙	+	龙胆二糖	+
L-木糖	-	熊果甙	-	D-松二糖	-
阿东醇	-	七叶灵	+	D-来苏糖	-
β -甲基-D 木糖甙	-	水杨苷	+	D-塔格糖	-
D-半乳糖	+	纤维二糖	+	D-岩藻糖	-
D-葡萄糖	+	麦芽糖	+	L-岩藻糖	-
D-果糖	-	乳糖	+	D-阿拉伯糖醇	-
D-甘露糖	-	蜜二糖	+	L-阿拉伯糖醇	-
L-山梨糖	-	蔗糖	+	葡萄糖酸盐	-
L-鼠李糖	-	海藻糖	-	2-酮基-葡萄糖酸盐	-
卫茅醇	-	菊糖	-	肌醇	-

[0042] 注 :+ :阳性, - :阴性

[0043] 根据以上的细胞形态以理化试验结果,菌株 BZ11 特征符合双歧杆菌属的特征,初步鉴定属双歧杆菌属。

[0044] 本发明的菌株是由中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC) 进行 16S rRNA 序列鉴定,将所测得的 16S rRNA 基因序列登陆 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网站,通过在

线 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), 共搜索到 100 个与该序列同源性比较高的基因片段, 且该菌株的 16S rRNA 基因序列与动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*) 的 16S rRNA 序列同源性达到 100%, 选取同源性较高的 20 株菌, 应用 MEGA5.0 分析软件构建系统进化树。作图显示, 动物双歧杆菌 BZ11 菌株与 Genbank 中 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* AD011 strain AD011 以及 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain YIT 4121 两株动物双歧杆菌乳亚种同属于一个最小分支中, 表明它们之间的亲缘关系最近。

[0045] 因此, 根据其形态特征、理化试验结果以及根据 16S rRNA 基因序列所构建的系统发育树分析, 根据《伯杰氏系统细菌学手册》中双歧杆菌属的分类规定, 动物双歧杆菌乳亚种 BZ11 菌株属于放线菌门 (Actinobacteria)、放线菌纲 (Actinobacteria)、放线菌亚纲 (Actinobacteridae)、双歧杆菌目 (Bifidobacteriales)、双歧杆菌科 (Bifidobacteriaceae)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*), 动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*)。

[0046] 本发明的香猪源性动物双歧杆菌乳亚种 BZ11 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*), 不仅降胆固醇能力高、耐酸受性、耐胆盐受性、耐氧性能良好和具有益生特性, 而且能作为益生菌添加到发酵乳制品中使其成为功能性食品, 从而丰富了双歧杆菌菌种资源, 对双歧杆菌保健产品的开发具有积极意义。

[0047] 下面参照附图结合实施例对本发明作进一步的描述。

附图说明

[0048] 图 1 是本发明的菌株 BZ11 与相关菌种的 16S rRNA 序列系统发育进化树, 图 2 是菌株 BZ11 的菌落形态图, 图 3 是菌株 BZ11 的革兰氏染色示意图, 图 4 是胆固醇含量测定的标准曲线图, 图 5 是菌株 BZ11 对青 - 青霉素 G、氨 - 氨苄西林、氧 - 哌拉西林、安 - 阿莫西林 / 棒酸抗生素药物敏感性, 图 6 是菌株 BZ11 对必 - 头孢哌酮、肟 - 头孢噻肟、V - 头孢唑林、阿 - 阿奇霉素抗生素药物敏感性, 图 7 是菌株 BZ11 对乙 - 乙酰螺霉素、新 - 新霉素、复 - 复方新诺明、万 - 万古霉素抗生素药物敏感性, 图 8 是菌株 BZ11 对环 - 环丙沙星、嗪 - 氧氟沙星、氟 - 诺氟沙星、克 - 克林霉素抗生素药物敏感性, 图 9 是菌株 BZ11 对利 - 利福平、呋 - 呋喃妥因、多 - 多粘菌素 B 抗生素药物敏感性。

具体实施方式

[0049] 实施例 1: 从贵州省特色资源小香猪的肠道内容物中筛选与分离筛选得到动物双歧杆菌 BZ11:

[0050] (1) 样品的采集:

[0051] 从贵州省贵阳市生态园中取猪龄小于 2 个月的小香猪多个部位采样, 包括小肠、大肠以及新鲜的小香猪粪便, 用已灭菌的镊子将新鲜小香猪样品放置于无菌密封袋中, 编号后放入装有冰袋的自制冷相中, 在 1h 内带回实验室处理;

[0052] (2) 双歧杆菌的分离及纯化

[0053] 将 10g 的新鲜样品放入装有 90mL 的灭菌蒸馏水中 (内含玻璃珠), 人工摇匀后进行梯度稀释。在超净工作台内, 取其样品稀释液 0.1mL 加入到含有 Li-Mupirocin 的

MRS (MUP-MRS) 平板培养基中进行涂布,放入厌氧培养箱中(厌氧环境为 $N_2 : CO_2 : H_2 = 90 : 5 : 5$), $37^\circ C$ 培养两天,然后挑取单菌落接种在含有 X-gal 的 PTYG (PTYG-X) 平板上,放入 $37^\circ C$ 、20% CO_2 浓度的二氧化碳培养箱中培养 2d。注意:从样品稀释到涂布,要求平板暴露在空气中的时间不超过 15min。

[0054] (3) 菌落形态及细胞形态特征观察

[0055] 在样品处理及培养后,观察并记录菌落形态、颜色,并进行革兰氏染色,镜检观察并记录。挑选在 MUP-MRS 平板上菌落较小、光滑、凸圆、边缘整齐、白色或乳白色不透明、质地柔软的单菌落,并且在 PTYG-X 平板上呈现出深蓝色的菌落,纯化传代四次后,得到纯化菌株,编号并记录菌落的形态。

[0056] (4) 菌株的保藏

[0057] 将得到的菌株接种在 PTYG 液体培养基中, $37^\circ C$ 下于二氧化碳培养箱中培养 48h 后,取 2mL 菌液与 3mL 50% 甘油混合于 10mL 已灭菌的洁净离心管中,最终使其甘油浓度达到 30%,放置于 $-80^\circ C$ 的超低温冰柜中进行冻结和保存。

[0058] 经过第一轮初筛,以菌落形态及菌株形态为指标,初步筛选出 70 余株疑似双歧杆菌菌株,甘油保藏于 $-80^\circ C$ 的超低温冰柜中。

[0059] (5) 降胆固醇率的测定:采用邻苯二甲醛 (OPA) 法测其降胆固醇率,其具体方法如下:

[0060] a、邻苯二甲醛法 (OPA) 标准曲线绘制

[0061] 准确吸取胆固醇标准溶液各 0.02、0.05、0.10、0.12、0.15、0.20mL 于洁净试管中,再加入无水乙醇使其体积为 1mL,然后在各试管中加入 OPA 试剂 4mL,室温放置 10min。再向其中缓慢加入 4mL 浓硫酸,立即用振荡器振 20s,充分混合后于室温黑暗条件下放置 10min。空白对照以 1mL 无水乙醇代替胆固醇储备液,最后测其在 550nm 处的吸光值,以胆固醇浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标做标准曲线如图 1,计算出其线性回归方程为 $y = 4.9264x - 0.0130$,相关系数 R^2 为 0.9992。

[0062] b、双歧杆菌胆固醇的测定

[0063] 将 $-80^\circ C$ 下保藏的菌株快速取出活化,并在 PTYG 平板上划线纯化 3 次后,接种到液体 PTYG 培养基中相同条件下进行富集培养 48h 后,以 5000r/min, $4^\circ C$ 条件下离心 10min,收集菌体。然后用 PBS 缓冲溶液稀释菌体,将待测菌液调至 3×10^8 CFU/mL 后按 10% (v/v) 接种量接种于胆固醇含量为 0.1mg/mL 的胆固醇 PTYG 培养基中,厌氧环境, $37^\circ C$ 培养 48h。菌液以 10000r/min, $4^\circ C$ 条件下离心 20min,保留上层清液作为待测液,同时用 PBS 缓冲溶液洗涤菌泥两次,洗液并入上清待测液,用于测定胆固醇含量,以未接种的胆固醇 PTYG 培养基作为空白对照组。然后采用邻苯二甲醛 (OPA) 法测其双歧杆菌降胆固醇率。

[0064] 降胆固醇率 S 按以下公式计算:

$$[0065] \quad S = (1 - A/B) \times 100\%$$

[0066] 注:S—降胆固醇率, %

[0067] A—待测发酵上清液中胆固醇浓度, mg/mL

[0068] B—未接种的胆固醇 PTYG 培养基中胆固醇浓度, mg/mL

[0069] 经第一次复筛,以降胆固醇率为指标筛选出 7 株降胆固醇率高于 30% 的菌株,进行下一步的复筛。

[0070] (6) 待测悬浮液的制备

[0071] 将 -80°C 下保藏的菌株快速取出活化,并在 PTYG 平板上划线纯化 3 次,接种到液体 PTYG 培养基中相同条件下进行富集培养 48h 后,将菌液在 $5000\text{r}/\text{min}$, 4°C 条件下离心 10min,收集菌泥,再用无菌磷酸盐缓冲盐 PBS 洗涤一次病重新制成悬浮液,将菌液浓度调至 $10^8\text{CFU}/\text{mL}$,悬浮液带用于体外耐受实验。

[0072] (7) 酸耐受性实验

[0073] 将待测菌悬液按 5% (体积比) 接种量分别接种于 pH3.0 和 pH7.0 的灭菌 PTYG 液体培养基中,混匀后于 37°C 恒温静置 2h,取 1mL 加入到含 9mL 质量分数为 0.84% 无菌生理盐水的试管中,用快速混匀器混匀,继续 10 倍递减稀释至合适梯度。各取 0.1mL 涂布于 PTYG 平板上 37°C ,二氧化碳培养箱中培养 48h,进行活菌计数,每个平板做 3 个平行重复。根据以下公式计算出存活率 N。

$$[0074] \quad N = N_0/N_1 \times 100\%$$

[0075] 式中, N—菌株耐酸性存活率

[0076] N_0 —pH3.0PTYG 培养 2h 的存活菌数

[0077] N_1 —pH7.0PTYG 培养 2h 的存活菌数

[0078] (8) 胆盐耐受性实验

[0079] 将待测菌悬液按 5% (体积比) 的接种量分别接种于添加 0.3% (质量与体积之比) 牛胆盐的灭菌 PTYG 液体培养基和不含牛胆盐的灭菌 PTYG 液体培养中, 37°C 二氧化碳培养箱中培养,分别于 0h 和 24h 进行活菌计数。每个平板做 3 次平行重复。

[0080] (9) 耐氧性能实验

[0081] 将经过耐酸性和胆盐耐受性的菌株接种到 PTYG 培养基中分别在普通培养箱和 20% CO_2 的二氧化碳培养箱中培养 24h 后,进行平板计数。根据以下公式评价其耐氧性能 Y。

$$[0082] \quad Y = N_3/N_2 \times 100\%$$

[0083] 式中, Y—菌株耐氧性能存活率

[0084] N_3 —普通培养箱中培养 24h 后的活菌数

[0085] N_2 —20% CO_2 的二氧化碳培养箱中培养 24h 后的活菌数

[0086] 结果表明,普通培养箱中培养 24h 后的活菌数为 CO_2 培养箱中的 12.4%,表现出较好的耐氧性,而且菌株的生长性能良好。

[0087] 经第二次复筛,以耐酸耐胆盐受性为指标进行复筛,筛选出一株菌株 BZ11 降胆固醇能力高且耐酸受性、耐胆盐受性良好的菌株,其降胆固醇率达到 38.52%,在 pH 值 3.0 条件下的存活率达到 98.65%,在含有 0.3% 胆盐的 PTYG 培养基中其存活率达到 90% 以上,而且其耐氧性能好。

[0088] (10) 菌株的安全性评价实验

[0089] a、药物敏感试验

[0090] 将 -80°C 下保藏的菌株快速取出活化,并在 PTYG 平板上划线纯化 3 次后,接种到液体 PTYG 培养基中相同条件下进行富集培养 48h 后,将菌液在 $5000\text{r}/\text{min}$, 4°C 条件下离心 10min,收集菌泥洗涤后,用 PBS 缓冲液配置为 $10^8\text{CFU}/\text{mL}$ 的菌悬液。然后采用 K-B 药敏纸片琼脂扩散法进行药物敏感试验。

[0091] 取供试菌液 0.5mL 与 10mL 50℃左右的 PTYG-F 琼脂培养基迅速混匀,倒入准备好的 10mL 琼脂铺底的灭菌平板中。待培养基冷却凝固后,贴放标准药敏纸片,放入 37℃的二氧化碳培养箱中,20h 左右后测量并记录抑菌圈的直径。

[0092] 本实验根据不同的药理作用,选择了 8 大类 19 种抗菌药物,分别是青霉素类:包括青霉素 G(penicillin)、氨苄西林 (ampicillin)、哌拉西林 (piperacillin) 和 β -内酰胺抑制剂的复合物:阿莫西林/棒酸 (amoxicillin/clavulanic),糖肽类:包括万古霉素 (vancomycin) 和环丙沙星 (ciprofloxacin),头孢类:包括头孢噻肟 (cefotaxime)、头孢唑啉 (cefoazolin) 和头孢哌酮 (cefoperazon),大环内酯类:包括阿奇霉素 (azithromycin) 和乙酰螺旋霉 (acetylspiramycin),氨基糖苷类:新霉素 (neomycin),磺胺类:复方新诺明 (sulfomethorxazole),喹诺酮类,包括氧氟沙星 (ofloxacin)、诺氟沙星 (norfloxacin) 和克林霉素 (clindamycin) 以及其他类:包括利福平 (rifampin)、呋喃妥因 (nitrofurantoin) 和多粘菌素 B (polymyxin B),对待测菌株进行了药物敏感实验,按照 1977 年世界卫生组织规定,测试革兰氏阳性菌时,需用质控菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC25923 菌株作为标准菌株参照,结果判定参照 WHO 提供的 NCCLS 标准。

[0093] b、急性毒性试验

[0094] 将 BZ11 菌株活化后,分离纯化三次,接种菌株在 PTYG 的液体培养基中二氧化碳培养箱中培养 48h,将菌液在以 5000r/min,4℃条件下离心 10min,收集菌泥,再用无菌磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤一次并重新制成悬浮液,将菌液浓度调至 3×10^{10} CFU/mL。然后根据食品安全性毒理学评价程序和方法进行急性毒性实验。

[0095] 按体重要求选用健康成年的昆明种雄小鼠 20 只,小鼠间体重差异不显著。适应动物房环境 (相对湿度:50±5%,温度:20℃~25℃) 7d 后,小鼠逐只称重,随即分为 2 组,每组 10 只,即实验组与空白对照组。用 BZ11 菌液对实验动物染毒,对禁食禁水空腹 12h 的小鼠进行 0.4mL/20g 体重的灌胃容积;空白对照组小鼠,以相同剂量灌胃纯净水。小鼠染毒后,在一周内观察其一般状态、体重变化、中毒症状和死亡情况,第 8 天处死小鼠。实验末期再次对动物进行称重,对死亡动物和到期处死动物进行尸体解剖,肉眼观察大体病理改变情况。实验全过程及观察内容做详细记录。

[0096] 通过对菌株进行安全性实验评价实验,结果表明筛选得到的菌株 BZ11 无急性毒性,证实菌株 BZ11 初步的安全性,可以考虑作为益生菌进一步深度开发利用。

[0097] (11) 降胆固醇、耐氧双歧杆菌的体内试验

[0098] 待测菌株 BZ11 和对照菌株金双歧解冻活化后纯化 3 次,分别以 5% (体积比) 的接种量接种于 PTYG 液体培养基中,在 37℃的二氧化碳培养箱中培养 24h,将菌液在 5000r/min,4℃条件下离心 10min,收集菌泥。再用灭菌 PBS 缓冲液进行 10 倍梯度稀释,取 0.1mL 在 PTYG 琼脂平板上涂布,37℃培养 36~48h 后进行菌落计数,根据平板计数结果,分别将 BZ11 菌株和金双歧调至为菌液浓度为 3.0×10^9 CFU/mL 的菌悬液。为防止双歧杆菌的死亡而影响结果,每天新鲜配置菌液,上午定时灌喂与放置饲料。

[0099] 健康 4 周的昆明种小鼠 48 只,雌雄各半,购自贵阳医学院。将小鼠随机分为 4 组,每组 12 只,雌雄各半。在动物房环境中 (相对湿度:50±5%,温度:20℃~25℃,每天 12h 光照,12h 黑暗,且清洁卫生环境良好) 自由饮水进食,普通饲料正常饲养 7d 后,逐个进行称

重,按各组间平均体重无显著差异重新分为4组,每组12只。实验结果见下表:

[0100]

组别	每组动物数(只)	体重(g)	饲喂方式
A组	12	20.10 ± 1.15	普通饲料 ± 1mL 生理盐水
B组	12	20.20 ± 0.71	高脂饲料 ± 1mL 生理盐水
C组	12	20.33 ± 0.66	高脂饲料 ± 1mL 金双歧菌液
D组	12	20.13 ± 0.80	高脂饲料 ± 1mL BZ11 菌液

[0101] 注:A组表示正常对照组,B组表示高脂模型组,C组表示金双歧实验中,D组表示BZ11实验组。

[0102] 饲料配方及配置方法:基础饲料购于贵阳医学院,参照方法,高脂饲料的配方为:猪油12%、胆固醇1%、牛胆盐0.5%、基础饲料86.5%。具体饲料制作步骤如下:(1)将普通饲料用粉碎机粉碎,加入牛胆盐等混合均匀;(2)在锅中加热猪油熬制,同时加入胆固醇使之溶解;(3)将液态的猪油加入到混合的普通饲料中,用玻璃棒混匀,再逐步加适量水,进行揉捏塑形为圆柱状饲料,注意不要加水太多导致过于柔软不易成型。(4)制作好后放于4℃的冰箱中保藏备用,喂食时放到微波炉加热5秒左右,取出即可。

[0103] 灌胃小鼠实验开始后的第10、20天对实验小鼠进行逐个体重测定,观察组别间的体重是否有差异。且每组随机挑选10只小鼠进行血样采集,实验过程中一共采血样两次,分别是在第10、20天各进行一次采血,每次采血前各组鼠需禁食禁水12h。第一次采血方式为眼眶后静脉丛采血,第二次为摘眼球采血,采血量为0.2mL/只。第二次采血后所有小鼠颈椎脱臼处死。

[0104] 将采集的血样收集于具有抗凝剂的2mL灭菌离心管中,37℃水浴30min后,3000r/min离心10min,小心取上层血清。参照试剂盒使用说明以及采用酶标仪测定血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量。并计算动脉硬化指数(Atherogenic index, AI),公式如下:

[0105] $AI = LDL-C/HDL-C$

[0106] 与对照菌株金双歧相比,BZ11菌株对高脂小鼠的体重影响更大,更能降低小鼠血清中的总胆固醇(TC)含量、降低血清中甘油三酯(TG)的含量、抑制血清中低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量、提高高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量、降低动脉硬化(AI)指数。

[0107] (12)通过以上的初筛与复筛实验,最终筛选出菌株BZ11降胆固醇能力高且耐酸受性、耐胆盐受性、耐氧性能良好的菌株,通过进行生理生化实验鉴定以及16S rRNA基因序列鉴定。

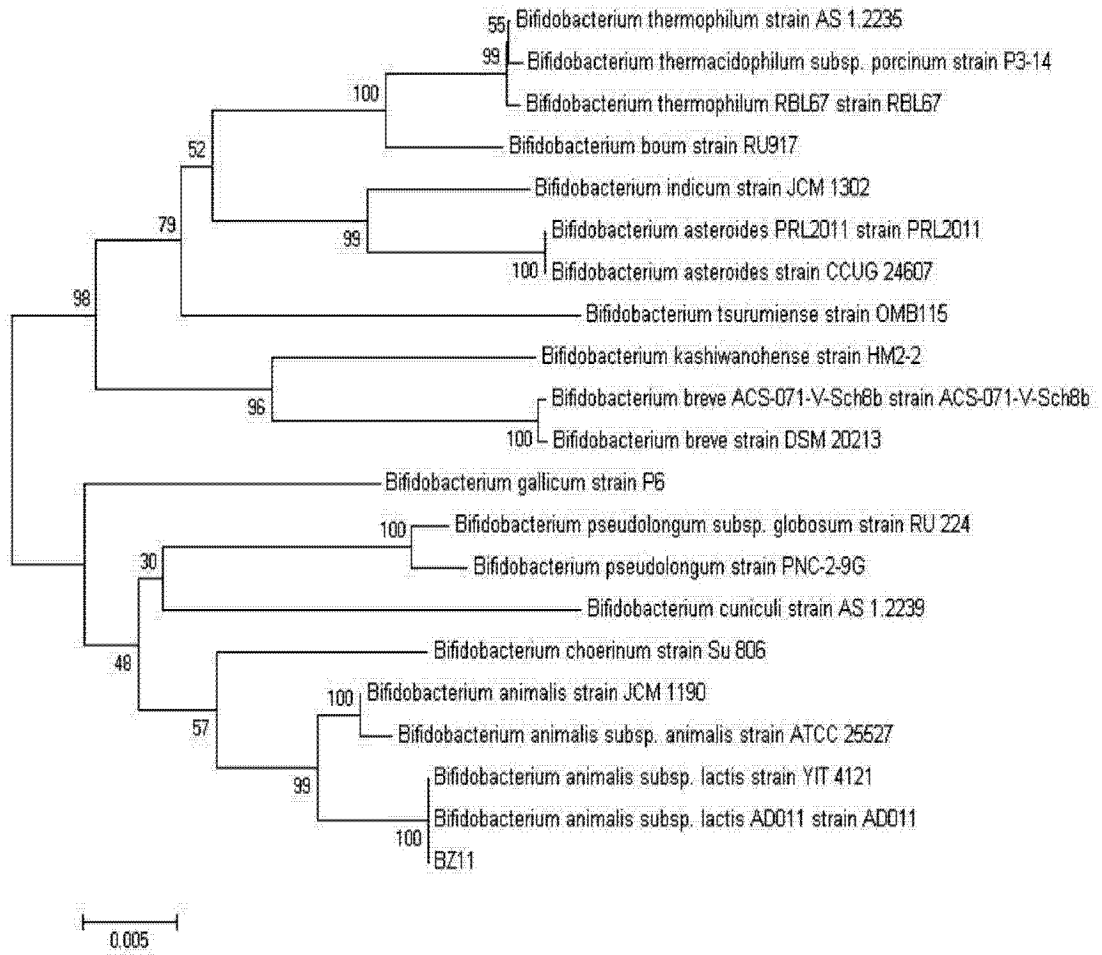


图 1

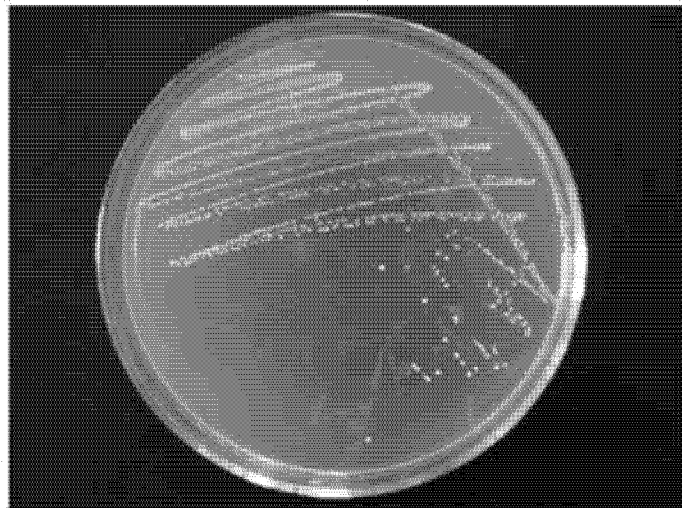


图 2

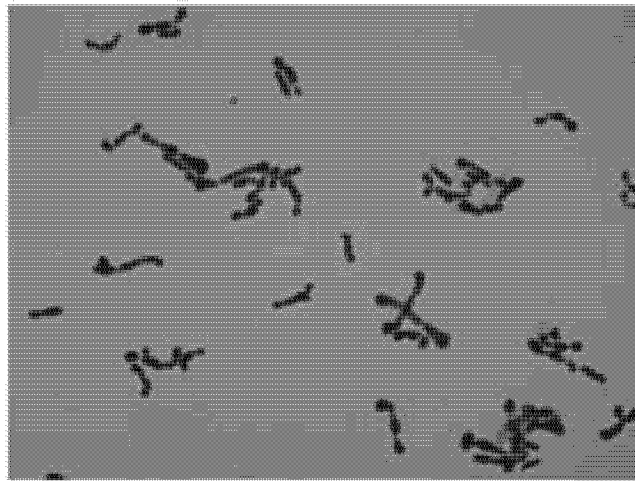


图 3

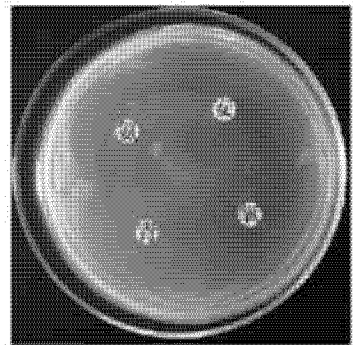
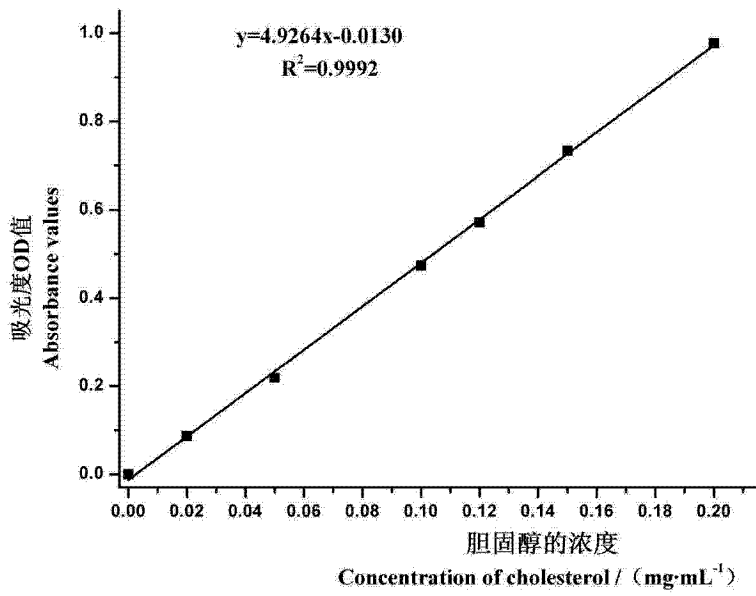


图 5

图 4

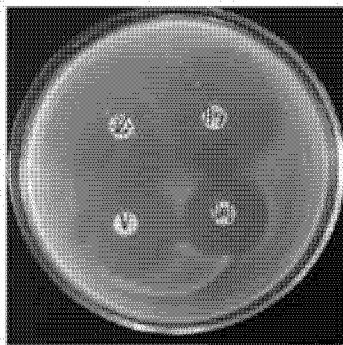


图 6

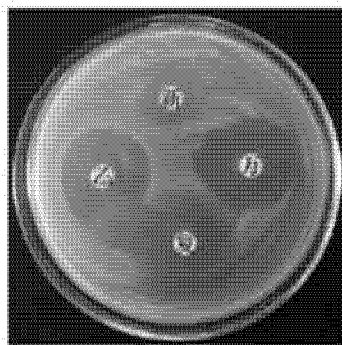


图 7

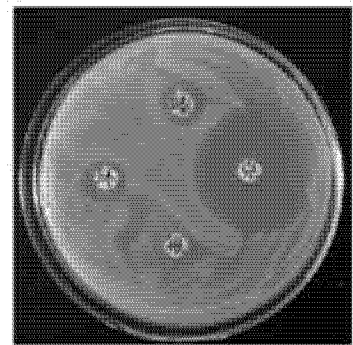


图 8

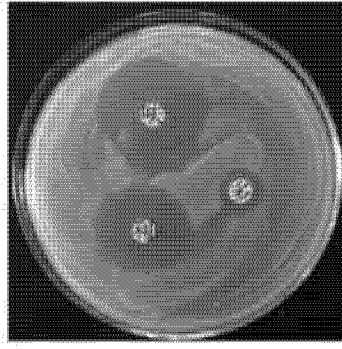


图 9