



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114574407 B

(45) 授权公告日 2022.11.01

(21) 申请号 202210483073.5

(22) 申请日 2022.05.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114574407 A

(43) 申请公布日 2022.06.03

(83) 生物保藏信息
CCTCC NO: M 2022188 2022.03.04

(73) 专利权人 微康益生菌(苏州)股份有限公司
地址 215200 江苏省苏州市吴江经济技术
开发区龙桥路1033号

(72) 发明人 方曙光 刘欢 朱明明 孔素芬
黄琴琴

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理
有限公司 11129
专利代理师 向群

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 113832058 A, 2021.12.24
CN 113564078 A, 2021.10.29
CN 104531590 A, 2015.04.22
CN 105849248 A, 2016.08.10
CN 112961808 A, 2021.06.15
CN 113209139 A, 2021.08.06
US 2009170185 A1, 2009.07.02
Fatemeh Famouri et al..Effects of Probiotics on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Obese Children and Adolescents.《JPGN》.2017,第64卷(第3期),第413-417页.
Xi Liang et al..Probiotics improved hyperlipidemia in mice induced by high cholesterol diet via downregulating FXR.《Food Funct.》.2020,第1-10页. (续)

审查员 曹梦超

权利要求书1页 说明书11页
序列表2页 附图6页

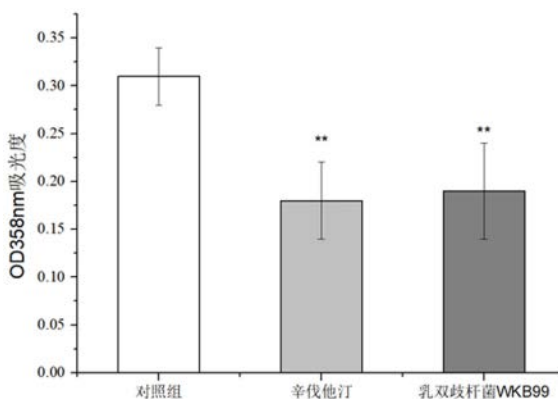
(54) 发明名称

动物双歧杆菌乳亚种WKB99及其在制备改善代谢综合征制品方面的应用和产品

(57) 摘要

本发明“动物双歧杆菌乳亚种WKB99及其在制备改善代谢综合征制品方面的应用和产品”属于微生物技术领域。所述动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp.lactis*)菌株WKB99的保藏编号为CCTCC NO:M 2022188。本发明还提供菌株WKB99在制备调节脂质和/或改善代谢综合征制品方面的应用,以及基于菌株WKB99的调节脂质制品和改善代谢综合征制品。动物双歧杆菌乳亚种WKB99可广泛应用于食品领域及微生物制剂,通过日常摄入而不需要通过药

物达到改善代谢综合征的目的。



CN 114574407 B

[接上页]

(56) 对比文件

S. Nabavi et al..Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease.《J. Dairy Sci.》.2014,第97卷

(第12期),第7386-7393页.

Chencheng Xie et al..Role of Probiotics in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Does Gut Microbiota Matter?.《Nutrients》.2019,第1-22页.

1. 一种动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) 菌株 WKB99, 其特征在于, 其保藏编号为 CCTCC NO: M 2022188。

2. 保藏编号为 CCTCC NO: M 2022188 的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) 菌株 WKB99 在制备调节脂质和/或改善代谢综合征制品方面的应用; 所述调节脂质指: 去除胆固醇或降低甘油三酯。

3. 根据权利要求 2 所述的保藏编号为 CCTCC NO: M 2022188 的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) 菌株 WKB99 在制备调节脂质和/或改善代谢综合征制品方面的应用, 其特征在于, 所述改善代谢综合征包括: 降低肝脏甘油三酯、降低谷丙转氨酶、降低血清葡萄糖水平、提高血清 HDL-C、降低血清胆固醇;

和/或, 所述谷丙转氨酶选自肝脏或血液中的谷丙转氨酶。

4. 一种调节脂质药物, 包括调节脂质的活性成分, 其特征在于, 所述活性成分包括保藏编号为 CCTCC NO: M 2022188 的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) 菌株 WKB99; 所述调节脂质指: 去除胆固醇或降低甘油三酯。

5. 根据权利要求 4 所述的一种调节脂质药物, 其特征在于, 还包括: 药用辅料。

6. 一种改善代谢综合征药物, 包括改善代谢综合征的活性成分, 其特征在于, 所述活性成分包括保藏编号为 CCTCC NO: M 2022188 的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) 菌株 WKB99。

7. 根据权利要求 6 所述的一种改善代谢综合征药物, 其特征在于, 还包括: 药用辅料。

8. 一种保健食品, 其特征在于, 包括保藏编号为 CCTCC NO: M 2022188 的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) 菌株 WKB99。

9. 根据权利要求 8 所述的一种保健食品, 其特征在于, 还包括: 食用辅料。

动物双歧杆菌乳亚种WKB99及其在制备改善代谢综合征制品方面的应用和产品

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,尤其是涉及动物双歧杆菌乳亚种WKB99及其在制备改善代谢综合征制品方面的应用和产品。

背景技术

[0002] 代谢综合征(MetS)是指人体的蛋白质、脂肪、碳水化合物等物质发生代谢紊乱的病理状态,是一组复杂的代谢紊乱症候群。主要包括中心性肥胖、血压增高、空腹血糖增高、甘油三酯升高和高密度脂蛋白降低。随着生活水平及生活便利程度的提高,引起生活方式、饮食结构的变化,导致代谢综合征的患病率不断上升。临床研究表明,代谢综合征是心血管疾病和糖尿病的高危因素,增加人群死亡的风险。长期服用药物类进行降血糖和降脂的控制会导致一些明显的副作用,并且存在诸多的限制。近些年研究表明,肠道菌群与宿主生理、肥胖以及代谢紊乱密切相关。肠道微生物失调可能会直接影响脂肪组织,影响脂肪因子、促炎因子、抗炎因子和脂肪酸氧化水平,进而对肝产生重要影响。通过膳食补充的益生菌,部分定植于肠道,有利于调节肠道菌群平衡。动物双歧杆菌乳亚种不仅是益生菌,而且有比较成熟的商业菌株,同时在我国可食用菌株名单中,这大大增加了动物双歧杆菌乳亚种的被广泛使用的可能性。

[0003] 本领域需要开发更多可用的动物双歧杆菌乳亚种新菌株。

发明内容

[0004] 针对本领域的上述需求,本发明提供动物双歧杆菌乳亚种在改善代谢综合征药物或食品上的应用。代谢综合征患者通过食用含有益生菌动物双歧杆菌乳亚种WKB99的药物或食品代替化学药物改善血脂、血糖及肝脏代谢等情况。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 一种动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99,其特征在于,其保藏编号为CCTCC NO: M 2022188。

[0007] 保藏编号为CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99在制备调节脂质和/或改善代谢综合征制品方面的应用。

[0008] 所述脂质选自:胆固醇或甘油三酯;

[0009] 优选地,所述调节脂质指:去除胆固醇或降低甘油三酯。

[0010] 所述改善代谢综合征包括:降低肝脏甘油三酯、降低谷丙转氨酶、降低血清葡萄糖水平、提高血清HDL-C、降低血清胆固醇;

[0011] 优选地,所述谷丙转氨酶选自肝脏或血液中的谷丙转氨酶。

[0012] 一种调节脂质制品,包括调节脂质的活性成分,其特征在于,所述活性成分包括保藏编号为CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis*

subsp. lactis) 菌株WKB99。

[0013] 所述制品选自药物或保健食品。

[0014] 所述的一种调节脂质制品还包括:辅料;

[0015] 优选地,所述辅料选自药用辅料或食用辅料。

[0016] 一种改善代谢综合征制品,包括改善代谢综合征的活性成分,其特征在于,所述活性成分包括保藏编号为CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99。

[0017] 所述制品选自药物或保健食品。

[0018] 所述的一种改善代谢综合征制品还包括:辅料;

[0019] 优选地,所述辅料选自药用辅料或食用辅料。

[0020] 在一些国家或地区的专利法允许的情况下,本发明还请求保护保藏编号为CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99在调节脂质和/或改善代谢综合征方面的用途。

[0021] 所述动物双歧杆菌乳亚种菌株WKB99于2022年03月04日保藏于中国典型培养物保藏中心,其分类命名为:动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*),保藏地址为:中国、武汉、武汉大学,微生物保藏号为:CCTCC NO: M 2022188。

[0022] 所述动物双歧杆菌乳亚种具有优异的胃液、肠液耐受性,高降胆固醇特性、高胆盐水解酶活性。能够降低脂肪变性的HepG2细胞在358nm吸收值和甘油三酯含量。进一步研究发现,本发明所述的动物双歧杆菌乳亚种,能够显著降低高脂小鼠血清谷丙转氨酶、总胆固醇、葡萄糖含量,提高血清HDL-C含量;降低高脂小鼠肝脏谷丙转氨酶、甘油三酯含量,说明动物双歧杆菌乳亚种WKB99具有降血脂、降血糖、调节肝脏功能等作用。

[0023] 所述的动物双歧杆菌乳亚种WKB99菌粉的发酵方法,包括以下步骤:配制10L发酵培养基加到15L厌氧发酵罐中,121℃灭菌20分钟,降温后用NaOH调发酵培养基pH至7。将动物双歧杆菌乳亚种种子液200mL接入到发酵培养基中,在温度37℃、转速100rpm的条件下发酵。发酵过程中自动流加25%氨水以维持发酵液pH值为5.5-6.0,发酵全程通入氮气。发酵16h时,当发酵液的OD600不再增加时,终止发酵。

[0024] 所述的动物双歧杆菌乳亚种菌株WKB99菌粉的制备方法,包括以下步骤:将离心收集的菌泥与冻干保护剂按照质量比1:1混合均匀,置于冷冻干燥机内,-40℃预冻2h,再于10Pa条件下4h升温至-10℃冷冻干燥15h,后于20Pa条件下2h升温至25℃冷冻干燥10h,即可得到动物双歧杆菌乳亚种冻干菌粉。所述的冻干保护剂包含如下按质量百分比计的组分:海藻糖6%、麦芽糊精8%、蔗糖2%、维生素C 0.02%、甘油3%、L-精氨酸0.8%,余量为水。

[0025] 本发明提供了动物双歧杆菌乳亚种菌株在制备食品中的应用,具体包括以下应用:在制备改善代谢综合征的食品中的应用,在制备降低胆固醇和降低血脂的食品中的应用,在制备降低血糖的食品中的应用。

[0026] 所述的食物是指普通食品和保健食品,包括压片糖果、发酵饮料、软糖、调制乳粉、发酵乳、固体饮料。

[0027] 本发明还提供了动物双歧杆菌乳亚种菌株在制备药物中的应用,具体包括以下应用:在在制备改善代谢综合征的药物中的应用,在制备降低胆固醇和降低血脂的药物中的应用,在制备降低血糖的药物中的应用。

[0028] 所述药物包括但不限于微生态制剂。

[0029] 本发明所采用的动物双歧杆菌乳亚种菌株从婴儿粪便中分离获得,安全无致病性,其具有较强耐胃酸耐肠液能力,是安全的益生菌。动物双歧杆菌乳亚种还有很强的胆盐水解酶活性,降胆固醇特性优异,其胆固醇去除率可达89.74%。通过细胞试验、小鼠试验证明其具有改善代谢综合征、降低血脂、降低胆固醇、降低血糖的功效。将其广泛应用到食品领域,增大消费者摄入的可能性,通过日常摄入就可以达到改善代谢综合征的目的。当然,所采用的动物双歧杆菌乳亚种WKB99也可以用于制备降低血脂、调节肠道菌群的药物中。

[0030] 本发明提供的动物双歧杆菌乳亚种WKB99具有较强耐胃酸耐肠液能力,较高的胆固醇去除能力。能够显著降低脂肪变性HepG2细胞内甘油三酯含量。动物双歧杆菌乳亚种WKB99能够改善代谢综合征小鼠的各项指标,显著降低高脂小鼠血清谷丙转氨酶、胆固醇、葡萄糖水平,提高血清HDL-C水平。动物双歧杆菌乳亚种WKB99能够显著降低高脂小鼠的肝脏谷丙转氨酶、甘油三酯水平。动物双歧杆菌乳亚种WKB99可广泛应用于食品领域及微生物制剂,通过日常摄入而不需要通过药物达到改善代谢综合征的目的。

[0031] 本发明动物双歧杆菌乳亚种菌株WKB99的保藏信息如下:

[0032] 保藏编号:CCTCC NO: M 2022188;

[0033] 分类命名:*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*;

[0034] 保藏日期:2022年03月04日;

[0035] 保藏单位:中国典型培养物保藏中心;

[0036] 保藏地址:中国、武汉、武汉大学。

附图说明

[0037] 图1为实施例5中动物双歧杆菌乳亚种WKB99对HepG2肝癌细胞红油O染色后358nm处的吸光值的影响的柱形图,辛伐他汀为阳性对照,**表示与对照比较差异极显著($P < 0.01$)。

[0038] 图2为实施例5中动物双歧杆菌乳亚种WKB99对HepG2肝癌细胞内甘油三酯含量的影响的柱形图。辛伐他汀为阳性对照,**表示与对照比较差异极显著($P < 0.01$)。

[0039] 图3是实施例6中各组小鼠血清谷丙转氨酶水平结果图。

[0040] 图4是实施例6中各组小鼠血清谷草转氨酶水平结果图。

[0041] 图5 是实施例6中各组小鼠血清总胆固醇水平结果图。

[0042] 图6是实施例6中各组小鼠血清甘油三酯水平结果图。

[0043] 图7是实施例6中各组小鼠血清HDL-C水平结果图。

[0044] 图8是实施例6中各组小鼠血清LDL-C水平结果图。

[0045] 图9是实施例6中各组小鼠血清葡萄糖水平结果图。

[0046] 图10是实施例7中各组小鼠肝脏谷丙转氨酶水平结果图。

[0047] 图11是实施例7中各组小鼠肝脏谷草转氨酶水平结果图。

[0048] 图12是实施例7中各组小鼠肝脏甘油三酯水平结果图。

具体实施方式

[0049] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明

书所描述的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0050] 生物材料的来源

[0051] 实验例2使用的大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌购自广东微生物菌种保藏中心;实验例5使用的HepG2细胞购自上海一研生物科技有限公司;实验例6使用的小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

[0052] 第1组实施例、本发明的菌株WKB99

[0053] 本组实施例提供一种动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99,其特征在于,其保藏编号为CCTCC NO: M 2022188。

[0054] 任何利用、使用、销售、许诺销售、生产、制备、培养、扩繁、发酵保藏编号为CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99的行为均落入本发明的保护范围。

[0055] 本领域技术人员根据本发明的教导和启发,出于实际生产需要,结合微生物工艺领域常用技术手段选择合适的辅料加以调配,将本发明保藏编号为CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99制成各种符合各类符合工艺生产要求的剂型产品,例如,粉剂、片剂、液体剂;还可制成食品,例如,发酵乳制品、发酵豆制品、发酵果蔬制品、发酵肉制品、发酵饮料、益生菌发酵剂、益生菌固体饮料等。所述发酵乳制品包括常温酸奶、低温酸奶、搅拌型酸奶、凝固型酸奶、饮用性酸奶、乳酪、乳酸菌饮料等。

[0056] 根据“Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis subsp. animalis subsp. nov.* and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis subsp. lactis subsp. nov.*”一文的记载,*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*的曾用名名为*Bifidobacterium lactis*,即,动物双歧杆菌乳亚种曾用名名为乳双歧杆菌,动物双歧杆菌乳亚种即为乳双歧杆菌,二者对于有益菌领域的技术人员而言具有相同的技术含义。

[0057] 因此本文中,发明内容、具体实施方式、说明书附图记载的动物双歧杆菌乳亚种、动物双歧杆菌乳亚种菌株、WKB99、菌株WKB99、*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*、动物双歧杆菌乳亚种WKB99、动物双歧杆菌乳亚种WKB99菌株、乳双歧杆菌WKB99均指代本发明的保藏编号为CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99。

[0058] 第2组实施例、本发明的菌株WKB99的制品用途

[0059] 本组实施例提供保藏编号为CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99在制备调节脂质和/或改善代谢综合征制品方面的用途。

[0060] 在一些具体的实施例中,所述脂质选自:胆固醇或甘油三酯;

[0061] 在优选的实施例中红,所述调节脂质指:去除胆固醇或降低甘油三酯。

[0062] 在另一些实施例中红,所述改善代谢综合征包括:降低肝脏甘油三酯、降低谷丙转

氨酶、降低血清葡萄糖水平、提高血清HDL-C、降低血清胆固醇；

[0063] 优选地,所述谷丙转氨酶选自肝脏或血液中的谷丙转氨酶。

[0064] 在更具体的实施例中,所述制品选自药物或保健食品。

[0065] 第3组实施例、本发明的菌株WKB99的适应症用途

[0066] 本组实施例提供保藏编号为CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99在调节脂质和/或改善代谢综合征方面的用途。

[0067] 在一些具体的实施例中,所述脂质选自:胆固醇或甘油三酯;

[0068] 在优选的实施例中,所述调节脂质指:去除胆固醇或降低甘油三酯。

[0069] 在另一些实施例中,所述改善代谢综合征包括:降低肝脏甘油三酯、降低谷丙转氨酶、降低血清葡萄糖水平、提高血清HDL-C、降低血清胆固醇;

[0070] 优选地,所述谷丙转氨酶选自肝脏或血液中的谷丙转氨酶。

[0071] 第4组实施例、本发明的调节脂质制品

[0072] 本组实施例提供一种调节脂质制品。本组所有的实施例都具备如下共同特征:所述调节脂质制品包括调节脂质的活性成分,所述活性成分包括保藏编号为CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99。

[0073] 在具体的实施例中,所述制品选自药物或保健食品。

[0074] 在进一步的实施例中,所述的一种调节脂质制品还包括:辅料;

[0075] 优选地,所述辅料选自药用辅料或食用辅料。

[0076] 在更具体的实施例中,所述药用辅料选自:溶剂、抛射剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、着色剂、黏合剂、崩解剂、填充剂、润滑剂、润湿剂、渗透压调节剂、稳定剂、助流剂、矫味剂、防腐剂、助悬剂、包衣材料、芳香剂、抗黏合剂、整合剂、渗透促进剂、pH值调节剂、缓冲剂、增塑剂、表面活性剂、发泡剂、消泡剂、增稠剂、包合剂、保湿剂、吸收剂、稀释剂、絮凝剂、反絮凝剂、助滤剂、释放阻滞剂等。

[0077] 在另一些实施例中,所述食用辅料选自:漂白剂、防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂、酸味剂、增味剂、护色剂等。

[0078] 根据本发明的内容,出于实际生产应用中的不同需求,再结合药物制备或食品生产加工工艺领域的常规技术手段(例如,《食品生产概论》、《食品与食品生产百科全书》、《食品加工技术》、《制剂技术百科全书》、《药物制剂技术》等),本领域技术人员可对上述药用辅料或食用辅料进行选择 and 调配,并将CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99制成不同的剂型,例如粉剂、片剂、注射剂、口服液等。

[0079] 第5组实施例、本发明的改善代谢综合征制品

[0080] 本组实施例提供一种改善代谢综合征制品。本组所有的实施例都具备如下共同特征:所述改善代谢综合征制品包括改善代谢综合征的活性成分,所述活性成分包括保藏编号为CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99。

[0081] 在具体的实施例中,所述制品选自药物或保健食品。

[0082] 在进一步的实施例中,所述的一种改善代谢综合征制品还包括:辅料;

[0083] 优选地,所述辅料选自药用辅料或食用辅料。

[0084] 在更具体的实施例中,所述药用辅料选自:溶剂、抛射剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、着色剂、黏合剂、崩解剂、填充剂、润滑剂、润湿剂、渗透压调节剂、稳定剂、助流剂、矫味剂、防腐剂、助悬剂、包衣材料、芳香剂、抗黏合剂、整合剂、渗透促进剂、pH值调节剂、缓冲剂、增塑剂、表面活性剂、发泡剂、消泡剂、增稠剂、包合剂、保湿剂、吸收剂、稀释剂、絮凝剂、反絮凝剂、助滤剂、释放阻滞剂等。

[0085] 在另一些实施例中,所述食用辅料选自:漂白剂、防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂、酸味剂、增味剂、护色剂等。

[0086] 根据本发明的内容,出于实际生产应用中的不同需求,再结合药物制备或食品生产加工工艺领域的常规技术手段(例如,《食品生产概论》、《食品与食品生产百科全书》、《食品加工技术》、《制剂技术百科全书》、《药物制剂技术》等),本领域技术人员可对上述药用辅料或食用辅料进行选择 and 调配,并将CCTCC NO: M 2022188的动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99制成不同的剂型,例如粉剂、片剂、注射剂、口服液等。

[0087] 实验例1、动物双歧杆菌乳亚种分离、筛选和鉴定

[0088] (1)分离与筛选:

[0089] 采集婴儿粪便,无菌生理盐水稀释至合适梯度,涂布于添加有5%(V/V)的莫匹罗星锂盐、且含有0.1%的L-半胱氨酸盐酸盐的MRS琼脂平板上,37℃厌氧条件下培养48h。挑选不透明乳白色、圆形有光泽、边缘整齐、表面凸起且湿润的单克隆菌落,在L-MRS固体培养基上进行反复划线纯化培养,经过细胞形态和个体形态观察,获得双歧杆菌菌株。

[0090] L-MRS培养基成分:蛋白胨10g、牛肉浸粉5g、酵母浸粉4g、 K_2HPO_4 2g、柠檬酸三铵2g、乙酸钠5g、葡萄糖20g、吐温80 1mL、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25g、L-半胱氨酸盐酸盐 1g、蒸馏水1000mL;pH值 6.2 ± 0.2 。

[0091] (2)菌株保藏与活化:

[0092] 菌株保藏:挑取纯化后的单个菌落接种至装有L-MRS培养基的厌氧管中,置于37℃培养12h-24h,生长至菌液浑浊,转接两次后,离心去掉上清液,添加等量30%甘油,转移至甘油管中,置于-80℃冰箱保藏。

[0093] 菌株活化:从-80℃冰箱取出甘油管,解冻后,以2%接种量接种于装有L-MRS培养基的厌氧管中,置于37℃培养12h-24h,生长至菌液浑浊为活化一代。

[0094] (3)分子生物学鉴定:

[0095] 将双歧杆菌菌株采用基因组DNA抽提试剂盒提取菌株基因组DNA,采用上游引物27F(AGTTTGATCMTGGCTCAG)和下游引物1492R(GGTTACCTTGTTACGACTT),对16S rDNA序列进行扩增,得到PCR产物。并对PCR产物进行测序。其中PCR反应体系:10×Buffer 20μL,引物dNTP 4μL,上、下游引物各1μL,DNA模板2μL,Taq酶0.5μL,ddH₂O 34.5μL。PCR反应条件:95℃ 10min;94℃ 30s,56℃ 30s,72℃ 2min,35个循环;72℃ 10min。将PCR产物通过凝胶电泳检测后送往武汉金开瑞生物工程有限公司测序。将鉴定的基因序列提交至NCBI数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)中进行BLAST分析比对。根据分子生物学的鉴定结果,确定该菌株为动物双歧杆菌乳亚种,将其命名为动物双歧杆菌乳亚种WKB99菌株,并送保藏。动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)菌株WKB99的16S rDNA序列如

SEQ ID No.1所示,其保藏信息列示如下:

[0096] 保藏编号:CCTCC NO: M 2022188;

[0097] 分类命名:*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*;

[0098] 保藏日期:2022年03月04日;

[0099] 保藏单位:中国典型培养物保藏中心;

[0100] 保藏地址:中国、武汉、武汉大学。

[0101] 实验例2、动物双歧杆菌乳亚种通过胃肠道的环境评价

[0102] 模拟人工胃液:配制PBS溶液,加入0.3%胃蛋白酶,用1mol/L HCL调节pH值至2.5,然后充分溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌备用。

[0103] 模拟人工肠液:配制PBS溶液,加入0.1%胰蛋白酶和0.3%的牛胆粉,用0.1mol/L NaOH调节pH值至8.0,然后充分溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌备用。

[0104] 动物双歧杆菌乳亚种在厌氧条件下活化培养2代。将活化后的动物双歧杆菌乳亚种菌液离心,收集菌体。取0.4mL菌体悬液分别接入1.6mL配制好的pH2.5的模拟人工胃液和pH8.0的模拟人工肠液中混匀,37 $^{\circ}$ C条件下消化,同时分别取0h和3h的消化液检测活菌数,计算存活率,结果见下表。其中,菌株存活率(%)= $N_t/N_0 \times 100\%$,式中 N_0 表示菌株0h的活菌数(CFU/mL), N_t 表示菌株3h的活菌数(CFU/mL)。

[0105] 表1. 动物双歧杆菌乳亚种模拟消化道环境实验数据表

菌株	pH2.5 3h 人工胃液存活率	pH8.0 3h 人工肠液存活率
动物双歧杆菌乳亚种 WKB99	89.97%	92.94%

[0107] 动物双歧杆菌乳亚种在pH2.5的人工胃液中3h存活率为89.97%,在pH8.0的人工肠液中3h存活率为92.94%。实验说明,该动物双歧杆菌乳亚种具备较强的耐受胃肠道环境的能力。

[0108] 实验例3动物双歧杆菌乳亚种的抑菌能力评价

[0109] 取拮抗菌株按2%(V/V)接种至含有0.1%的L-半胱氨酸盐酸盐MRS液体培养基的厌氧玻璃管中,37 $^{\circ}$ C恒温静置培养12h。将致病菌株大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌分别接种于液体牛肉膏蛋白胨培养基中,37 $^{\circ}$ C、转数250rpm、恒温摇床过夜培养,然后制备病原菌悬液。将MRS固体培养基冷却至55 $^{\circ}$ C左右,与病原菌悬液按一定比例混匀,使体系病原菌活菌数在 10^6 CFU/mL数量级,然后迅速倾注于预先放置牛津杯的平板中,待培养基冷却凝固后,取出牛津杯,于每孔注入200 μ L拮抗菌株菌液,将平皿轻盖后正置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱,培养适宜时间后观察,并用游标卡尺测量抑菌圈直径。

[0110] 结果如表2显示,动物双歧杆菌乳亚种WKB99表现出对肠道致病菌极强的抑制作用,尤其对大肠杆菌的抑制能力。

[0111] 表2WKB99抑制肠道病原菌试验

	指示菌株	抑菌圈直径 (mm)
[0112]	大肠杆菌	36
	沙门氏菌	32
	金黄色葡萄球菌	28

[0113] 实验例3、动物双歧杆菌乳亚种胆固醇去除率测定

[0114] (1) 胆固醇标准曲线测定: 准确称取0.1g胆固醇粉末, 正己烷定容1mg/mL的溶液, 然后分别吸取0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.12、0.14mL到比色管中, 60℃水浴氮气吹干后, 加入4mL 0.5mg/mL邻苯二甲醛溶液和2mL 98%浓硫酸, 显色反应20min, 在553nm处测定吸光度值, 以胆固醇含量为横轴, 吸光度值为纵轴作标准曲线。

[0115] (2) 邻苯二甲醛测定胆固醇含量的方法: 取1mL样品, 加入3mL95%乙醇和2mL50%(w/v)氢氧化钾, 涡旋振荡混匀。于60℃下恒温水浴10min, 冷却后加入5mL正己烷, 涡旋震荡萃取1-2min, 加入2mL蒸馏水, 振荡均匀, 静置分层。取2mL上层正己烷, 60℃水浴氮气吹干, 加入4mL 0.5mg/mL(w/v)邻苯二甲醛溶液(用冰醋酸定容)和2mL 浓硫酸显色反应20min, 在553nm处测定吸光度值。

[0116] (3) 动物双歧杆菌乳亚种胆固醇去除率测定:

[0117] 将动物双歧杆菌乳亚种接种于装有L-MRS液体培养基的厌氧管中, 37℃静置培养12h转接3次活化后, 按2%(v/v)接种量接种于5mL培养液MRSO-CHOL中, 摇匀后立即取样1mL, 4000 r/min离心5min, 取上清液用邻苯二甲醛比色法测定胆固醇含量。接种后的发酵液37℃静置培养48h后用同样方法测定上清中胆固醇含量, 做多组平行求平均值。其中培养液MRSO-CHOL的组成: 由MRS液体培养基、巯基乙酸钠、胆固醇和牛胆盐组成; 巯基乙酸钠的浓度为2g/L, 胆固醇的浓度为200mg/L, 牛胆盐的浓度为0.3%(质量分数), 115℃灭菌20min。

[0118] 胆固醇的去除率: $V = \frac{B-A}{B} \times 100\%$ 。

[0119] 式中:A为各菌株发酵后的培养基553nm处的吸光度值,B为空白对照553nm处的吸光度值。

[0120] 结果显示, 动物双歧杆菌乳亚种WKB99胆固醇去除率可达89.74%。

[0121] 实验例4、动物双歧杆菌乳亚种WKB99胆盐水解酶活性测定

[0122] 新鲜配制的MRS液体培养基中加0.37g/L CaCl_2 、5g/L牛磺去氧胆酸和15g/L琼脂, 121℃灭菌15min后, 取出冷却到40-50℃, 倾倒在放有牛津杯的平板上, 待培养基完全凝固后, 小心将牛津杯取出。将活化好的菌液取100 μL 接种于平板上, 37℃厌氧培养48h, 观察菌苔周围是否形成沉淀圈, 若形成白色沉淀, 表明有胆盐水解酶活性, 沉淀圈直径越大, 表明胆盐水解酶活性越强。测得动物双歧杆菌乳亚种WKB99的沉淀圈直径为31mm(孔直径为8mm)。

[0123] 实验例5、HepG2细胞实验

[0124] 1) HepG2细胞复苏与活化:

[0125] (1) 从液氮罐中取出保存的细胞冻存管, 迅速置于37℃水浴锅中, 摇动直至管中液体全部解冻, 放入超净台中;

[0126] (2)将冻存液转至离心管中,加入2-3 mL含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基培养(1:100添加100ug/ml青霉素和100ug/ml链霉素), $1000\times g$ 离心4 min,弃上清;

[0127] (3)向离心管中加入3mL上述双抗培养基,轻轻吹打均匀,使细胞分散均一,然后转至T25细胞培养瓶中,置 37°C ,5% CO_2 -95%空气的细胞培养箱中培养;

[0128] (4)次日换液继续培养;

[0129] (5)每日用倒置显微镜观察细胞,当细胞在细胞培养瓶底长满80%时,进行传代。

[0130] 2)细胞传代与培养:

[0131] (1)待细胞长满培养瓶底80%左右,移弃培养基,用PBS漂洗2遍细胞层;

[0132] (2)加入0.5 mL胰蛋白酶消化液,盖好盖子,放进细胞培养箱中孵育5min左右,用倒置显微镜观察细胞形态,细胞边缘略脱离细胞壁;

[0133] (3)向培养瓶中加入1mL双抗培养基终止消化,轻轻吹打细胞培养瓶中的细胞,直至细胞分散均一,将消化下来的细胞转入离心管中, $1000\times g$ 离心4min;

[0134] (4)取出离心管,弃上清,向离心管中加入适量培养基,充分混匀后,转至多个细胞培养瓶中, 37°C ,5% CO_2 -95%空气培养箱中培养。

[0135] 3)细胞脂肪变性模型建立

[0136] HepG2细胞按照 2.5×10^5 个/孔接种于6孔板中,当细胞铺满80%左右,移弃培养基,用PBS缓冲液漂洗2遍细胞层。在细胞中加入1.5mM的DMEM培养基。设置3组平行,培养24h后观察。

[0137] 红油O染色:培养24h后,弃掉培养基,用PBS缓冲液漂洗2次,再向六孔板加入ORO Fixative固定液,固定时间在20min至30min;然后用PBS清洗一遍,弃去PBS后每孔加入按产品说明书配制的油红O染液室温染色20min。染色完毕后,PBS漂洗三次,最后一次弃掉PBS后每孔加入100 μl 二甲亚砜DMSO,置于摇床上轻轻摇晃5min使油红充分溶解,采用酶标仪读取358nm处吸光值。向建立的HepG2 细胞脂质变性模型的六孔板中加入 1×10^8 CFU/mL的动物双歧杆菌乳亚种WKB99菌悬液,于5% CO_2 、 37°C 孵育2h后,弃掉菌悬液用PBS缓冲液漂洗3次,重复上述步骤,并设立50 μM 辛伐他汀为对照组。(图1)

[0138] 动物双歧杆菌乳亚种WKB99对HepG2细胞的甘油三酯的影响:根据所建立的 HepG2细胞脂质变性模型,弃去培养上清,向六孔板中分别加入1mL浓度为 1×10^8 CFU/mL 的动物双歧杆菌乳亚种WKB99菌悬液,并设立PBS阴性对照组和50 μM 辛伐他汀为阳性对照组,于5% CO_2 、 37°C 孵育2h后,PBS清洗5次,各孔加入100 μL 的含10 μL 苯甲基磺酰氟(PMSF)的RIPA 细胞裂解液,冰上裂解30min。12000rpm低温离心5min后,收集上清,按照细胞中的甘油三酯含量测定说明书测定甘油三酯含量。

[0139] 由图1可见,经油酸处理后的肝HepG2细胞内脂质含量明显增加,动物双歧杆菌乳亚种WKB99和辛伐他汀均能显著减低358nm处的吸光值,表明脂质含量显著降低,且两者无显著差异,这表明细胞实验中,动物双歧杆菌乳亚种WKB99能够达到辛伐他汀同样的降脂效果。

[0140] 由图2可见,经油酸处理后的肝HepG2细胞内甘油三酯含量增加,动物双歧杆菌乳亚种WKB99和辛伐他汀均能显著减低细胞内甘油三酯含量,且两者无显著差异,这表明细胞实验中,动物双歧杆菌乳亚种WKB99能够达到辛伐他汀同样的降低甘油三酯的效果。

[0141] 实验例6、动物双歧杆菌乳亚种改善代谢综合征的小鼠试验

[0142] 1) 实验分组及喂养方式

[0143] 取培养后的动物双歧杆菌乳亚种,用生理盐水洗涤3次,将浓度调整至 1.0×10^8 — 10^9 CFU/mL用于小鼠试验。40只SPF级雌性昆明小鼠在温度为 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度为 $(50 \pm 10)\%$ 的动物房饲养。严格按照12h光照/黑暗循环,自由采食和进水。适应性喂养一周后,将40只7周龄昆明小鼠按各组间平均体质量无显著差异分为3组:正常组(ND):饲喂基础饲料,对照组(HFD):饲喂高脂饲料+生理盐水,低剂量组(HFD+WKB99):饲喂高脂饲料+ 1×10^8 CFU/mL,高剂量组(HFD+WKB99):饲喂高脂饲料+ 1×10^9 CFU/mL。每只小鼠灌胃0.2mL/次/天,连续灌胃42d。

[0144] 2) 指标测定

[0145] (1) 实验过程中,每周称量并记录体重和采食量。

[0146] (2) 喂养结束,麻醉后眼睛取血, 4°C 离心后取上清作为血清样品,处死动物;按照试剂盒说明书,利用自动生化分析仪测定血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG),葡萄糖(GLU)含量。收取肝脏组织, -80°C 低温保存。按照试剂盒说明书,利用自动生化分析仪测定肝脏中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)。

[0147] (3) 数据处理

[0148] 采用SPSS 26统计软件,用方差分析检验显著性,多重比较用最小显著性差异法(least significant difference, LSD)检验进行数据分析。

[0149] (4) 动物双歧杆菌乳亚种对高脂饮食小鼠体质量及摄食量的影响如下表3所示:

[0150] 表3

分组	正常组	高脂饲料	低剂量组	高剂量组
采食量	4.83 \pm 0.28	4.76 \pm 0.24	4.75 \pm 0.25	4.8 \pm 0.22
初始体重	36.44 \pm 0.49	36.12 \pm 0.53	36.79 \pm 0.37	36.43 \pm 0.46
最终体重	38.54 \pm 0.27 ^a	47.25 \pm 0.45 ^c	42.29 \pm 0.37 ^b	43.65 \pm 0.40 ^b

[0152] 注:不同字母表示同一行比较差异显著($P < 0.05$)。

[0153] 由表可看出,各组小鼠的采食量无显著性差异,各组小鼠初始体重无显著性差异,高脂饲料组的体重增加量显著高于正常组,说明肥胖小鼠造模成功。低剂量组和高剂量组小鼠体重显著低于高脂饲料组,说明乳酸双歧杆菌WKB99能够显著降低肥胖小鼠的体重,改善肥胖。

[0154] (5) 动物双歧杆菌乳亚种WKB99对高脂小鼠的影响

[0155] 高脂组小鼠血清谷丙转氨酶的含量显著高于正常组,低剂量组和高剂量组小鼠血清谷丙转氨酶含量显著低于高脂组(图3),说明饲喂动物双歧杆菌乳亚种WKB99可显著降低高脂小鼠的血清谷丙转氨酶水平,剂量组间无差异显著性。

[0156] 高脂组小鼠血清谷草转氨酶的含量高于正常组,低剂量组和高剂量组小鼠血清谷草转氨酶含量略低于高脂组,但差异不显著(图4)。

[0157] 高脂组小鼠血清总胆固醇的含量显著高于正常组,低剂量组和高剂量组小鼠血清总胆固醇含量显著低于高脂组,剂量组间无差异显著性(图5)。说明饲喂动物双歧杆菌乳亚

种WKB99可显著降低高脂小鼠的血清胆固醇水平。

[0158] 高脂组小鼠血清甘油三酯的含量高于正常组,低剂量组和高剂量组小鼠血清甘油三酯含量略低于高脂组,接近于正常组,均差异不显著(图6)。

[0159] 高脂组小鼠血清HDL-C的含量显著低于正常组、低剂量组和高剂量组,低剂量组和高剂量组小鼠血清HDL-C含量与正常组无显著性区别(图7),说明饲喂动物双歧杆菌乳亚种WKB99可显著提高高脂小鼠的血清HDL-C水平,并使其接近正常组小鼠的水平。

[0160] 高脂组小鼠血清LDL-C的含量高于正常组,低剂量组和高剂量组小鼠血清甘油三酯含量略低于高脂组,接近于正常组,均差异不显著(图8)。

[0161] 高脂组小鼠血清葡萄糖的含量显著高于正常组,低剂量组和高剂量组小鼠血清葡萄糖含量显著低于正常组和高脂组,剂量组间无差异显著性(图9)。说明饲喂动物双歧杆菌乳亚种WKB99可显著降低小鼠的血清葡萄糖水平。

[0162] 高脂组小鼠肝脏谷丙转氨酶的含量显著高于正常组,低剂量组和高剂量组小鼠血清谷丙转氨酶含量显著低于高脂组(图10),说明饲喂动物双歧杆菌乳亚种WKB99可显著降低高脂小鼠的肝脏谷丙转氨酶水平,剂量组间无差异显著性。

[0163] 高脂组小鼠肝脏谷草转氨酶含量与正常组、低剂量组、高剂量组无显著性差异,低剂量组、高剂量略低于正常组(图11)。

[0164] 高脂组小鼠肝脏甘油三酯的含量显著高于正常组,低剂量组和高剂量组小鼠肝脏甘油三酯含量显著低于高脂组,剂量组间无差异显著性(图12)。说明饲喂动物双歧杆菌乳亚种WKB99可显著降低高脂小鼠的肝脏甘油三酯水平。

[0165] 实验例7、动物双歧杆菌乳亚种WKB99菌粉制备方法

[0166] 所述的动物双歧杆菌乳亚种WKB99菌粉的发酵方法,包括以下步骤:配制10L发酵培养基加到15L厌氧发酵罐中,121℃灭菌20分钟,降温后用NaOH调发酵培养基pH至7。将动物双歧杆菌乳亚种种子液200mL接入到发酵培养基中,在温度37℃、转速100rpm的条件下发酵。发酵过程中自动流加25%氨水以维持发酵液pH值为5.5-6.0,发酵全程通入氮气。发酵16h时,当发酵液的OD600不再增加时,终止发酵。

[0167] 所述的动物双歧杆菌乳亚种WKB99菌粉的制备方法,包括以下步骤:将离心收集的菌泥与冻干保护剂按照质量比1:1混合均匀,置于冷冻干燥机内,-40℃预冻2h,再于10Pa条件下4h升温至-10℃冷冻干燥15h,后于20Pa条件下2h升温至25℃冷冻干燥10h,即可得到动物双歧杆菌乳亚种冻干菌粉。所述的冻干保护剂包含如下按质量百分比计的组分:海藻糖6%、麦芽糊精8%、蔗糖2%、维生素C 0.02%、甘油3%、L-精氨酸0.8%,余量为水。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 微康益生菌(苏州)股份有限公司
- [0003] <120> 动物双歧杆菌乳亚种WKB99及其在制备改善代谢综合征制品方面的应用和产
- [0004] 品
- [0005] <130> P220389/WKY
- [0006] <160> 3
- [0007] <170> PatentIn version 3.5
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 1335
- [0010] <212> DNA
- [0011] <213> Artificial Sequence
- [0012] <220>
- [0013] <223> 动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis* subsp.
- [0014] *lactis*)菌株WKB99的16S rDNA
- [0015] <400> 1
- [0016] tcggggtgag agtggcgaac gggtagtaa tgcgtgacca acctgccctg tgcaccggaa 60
- [0017] tagctcctgg aaacgggtgg taataccgga tgctccgctc catcgcattg tggggtggga 120
- [0018] aatgcttttg cggcatggga tggggtcgcg tcctatcagc ttgttgccgg ggtgatggcc 180
- [0019] caccaaggcg ttgacgggta gccggcctga gagggtgacc ggccacattg ggactgagat 240
- [0020] acggcccaga ctctacggg aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg cgcaagcctg 300
- [0021] atgcagcagc gccgcgtgcg ggatggaggc ctccgggttg taaaccgctt ttgttcaagg 360
- [0022] gcaaggcacg gtttcggccg tgttgagtgg attgttcgaa taagcaccgg ctaactacgt 420
- [0023] gccagcagcc gcgtaatac gtaggggtcgc agcgttatcc ggatttattg ggcgtaaagg 480
- [0024] gctcgtaggc gtttcgtcgc gtccgggtgtg aaagtccatc gcctaacggt ggatctgcgc 540
- [0025] cgggtacggg cgggctggag tgcggtaggg gagactggaa ttcccgggtg aacgggtgaa 600
- [0026] tgtgtagata tcgggaagaa caccaatggc gaaggcaggt ctctgggccc tcaactgacg 660
- [0027] tgaggagcga aagcgtgggg agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa 720
- [0028] cggtgatgac tggatgtggg gccctttcca cgggtcccgt gtcggagcca acgcgttaag 780
- [0029] catccgcct ggggagtagc gccgcaaggc taaaactcaa agaaattgac gggggcccgc 840
- [0030] acaagcggcg gagcatgcgg attaattcga tgcaacgcga agaaccttac ctgggcttga 900
- [0031] catgtgccgg atcgcctgg agacacggtt tcccttcggg gccggttcaac aggtggtgca 960
- [0032] tggtcgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct 1020
- [0033] cgcccatgt tgccagcggg tgatgccggg aactcatgtg ggaccgccgg ggtcaactcg 1080
- [0034] gaggaagggt gggatgacgt cagatcatca tgccccttac gtccagggtt tcacgcatgc 1140
- [0035] tacaatggcc ggtacaacgc ggtgcgacac ggtgacgtgg ggcggatcgc tgaaaaccgg 1200
- [0036] tctcagttcg gatcgcagtc tgcaactcga ctgcgtgaag gcggagtcgc tagtaatcgc 1260
- [0037] ggatcagcaa cgccgcggtg aatgcgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcaagtca 1320
- [0038] tgaaagtggg tagca 1335
- [0039] <210> 2
- [0040] <211> 18
- [0041] <212> DNA

-
- [0042] <213> Artificial Sequence
[0043] <220>
[0044] <223> 游引物27F
[0045] <400> 2
[0046] agtttgatcm tggctcag 18
[0047] <210> 3
[0048] <211> 19
[0049] <212> DNA
[0050] <213> Artificial Sequence
[0051] <220>
[0052] <223> 下游引物1492R
[0053] <400> 3
[0054] ggttaccttg ttagcactt 19

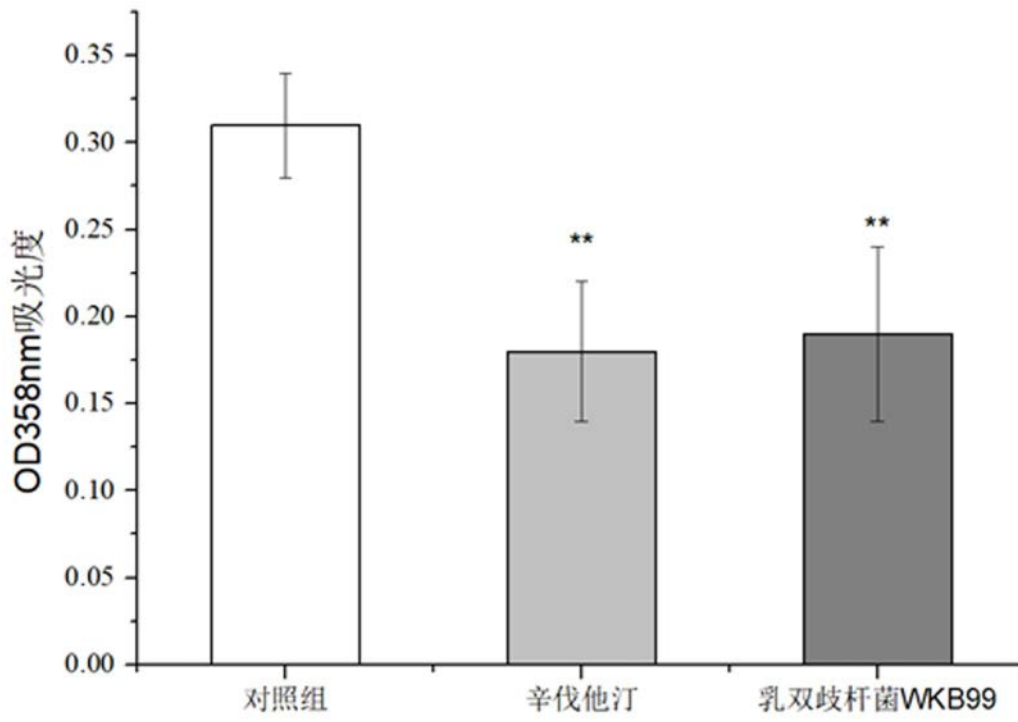


图1

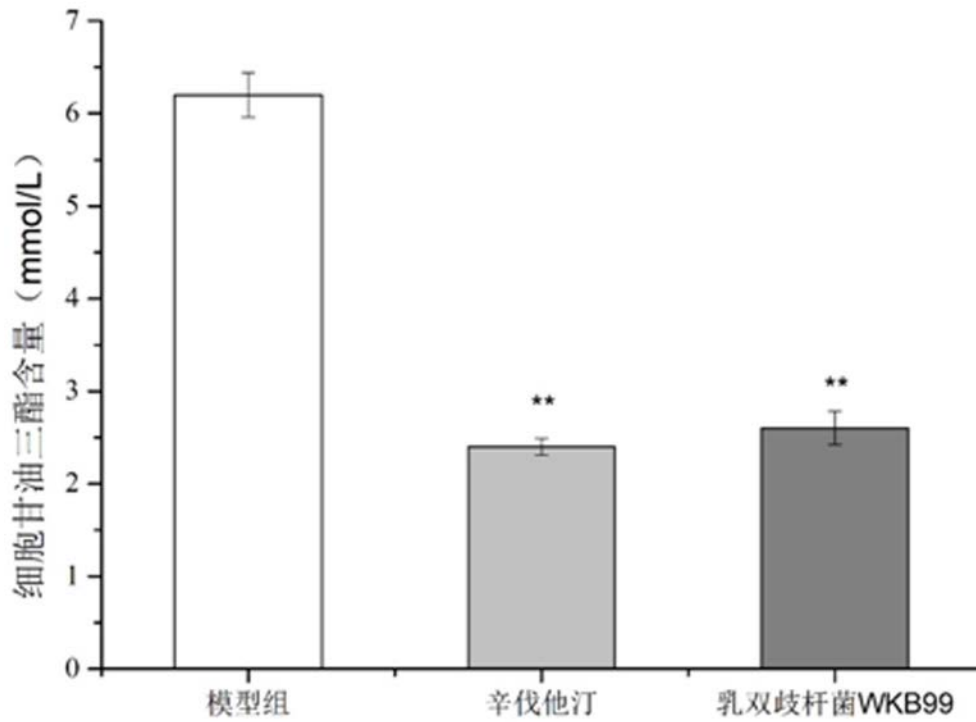


图2

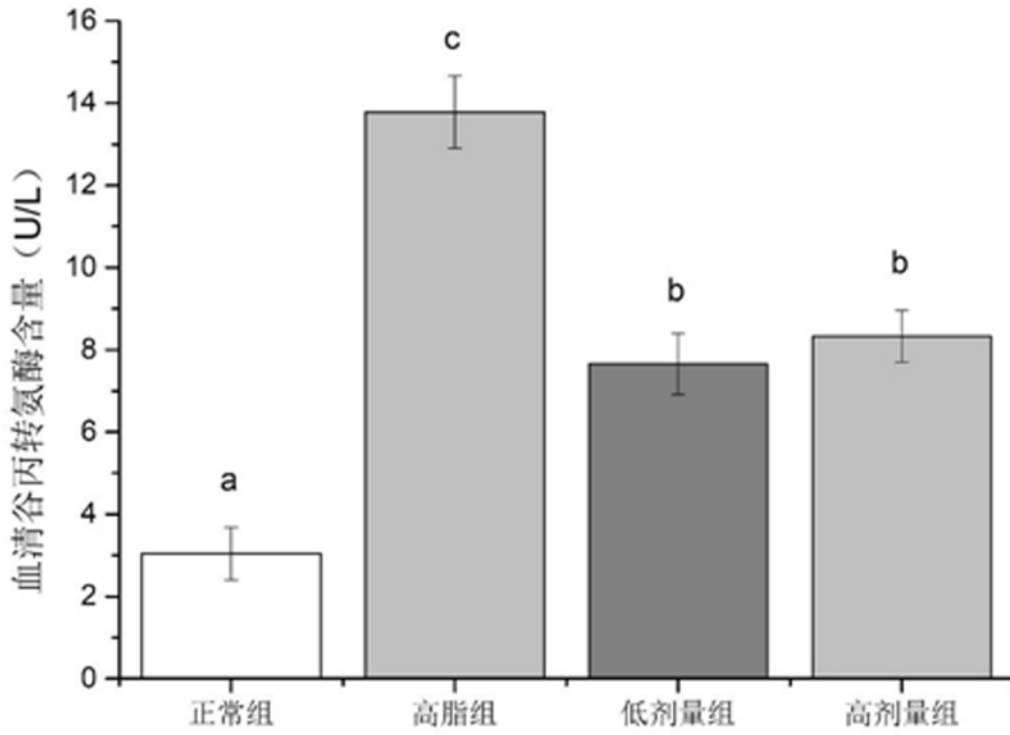


图3

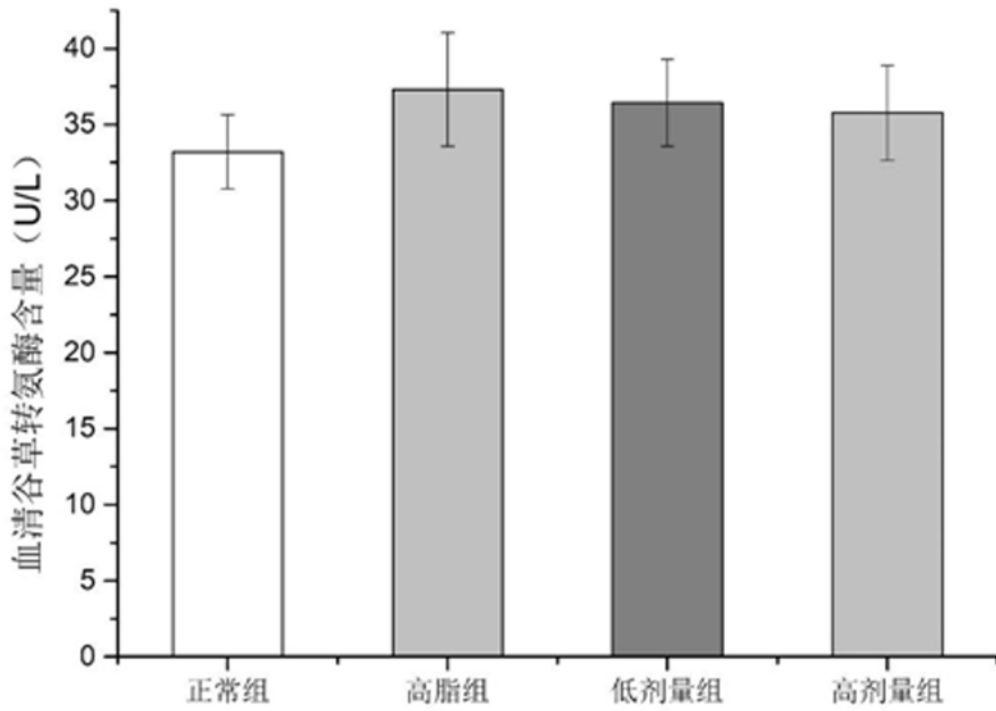


图4

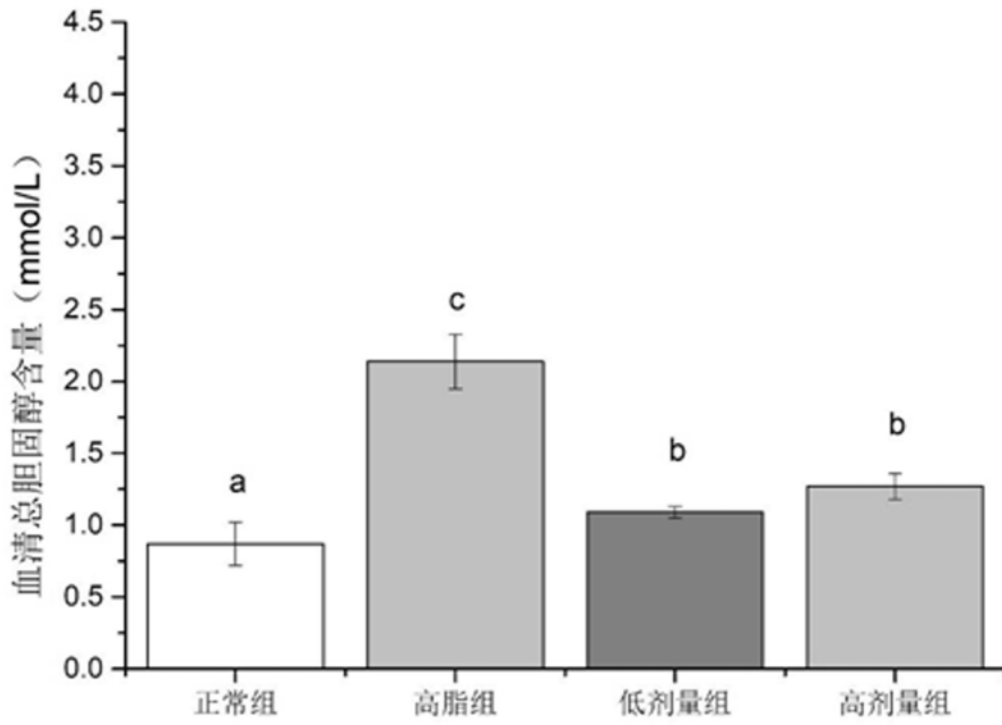


图5

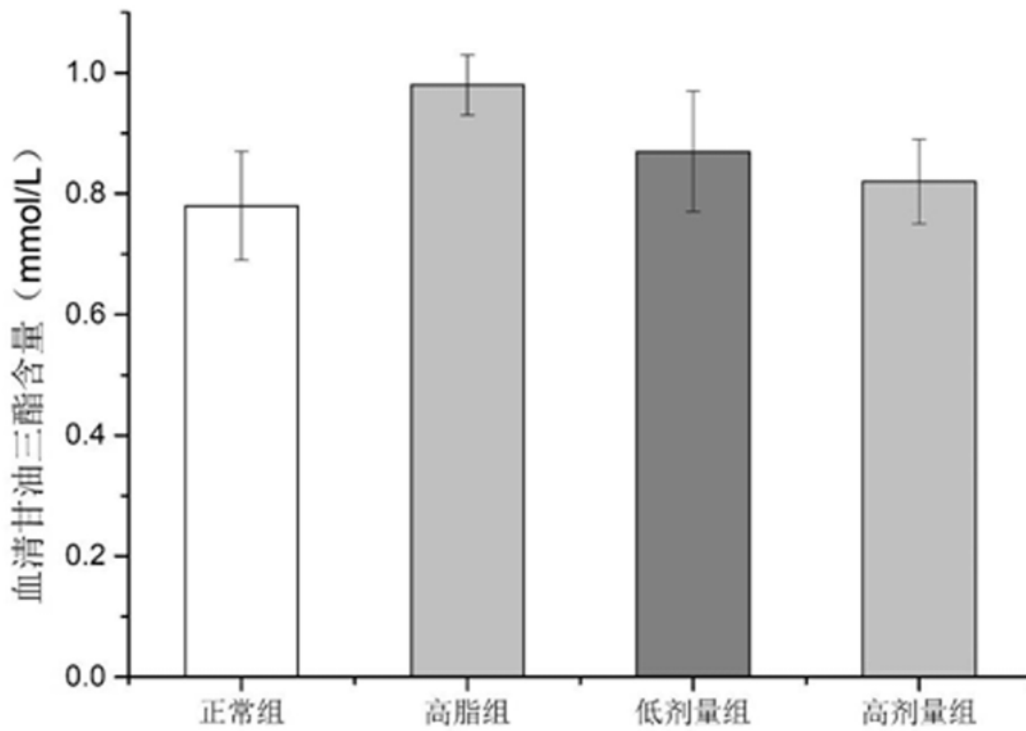


图6

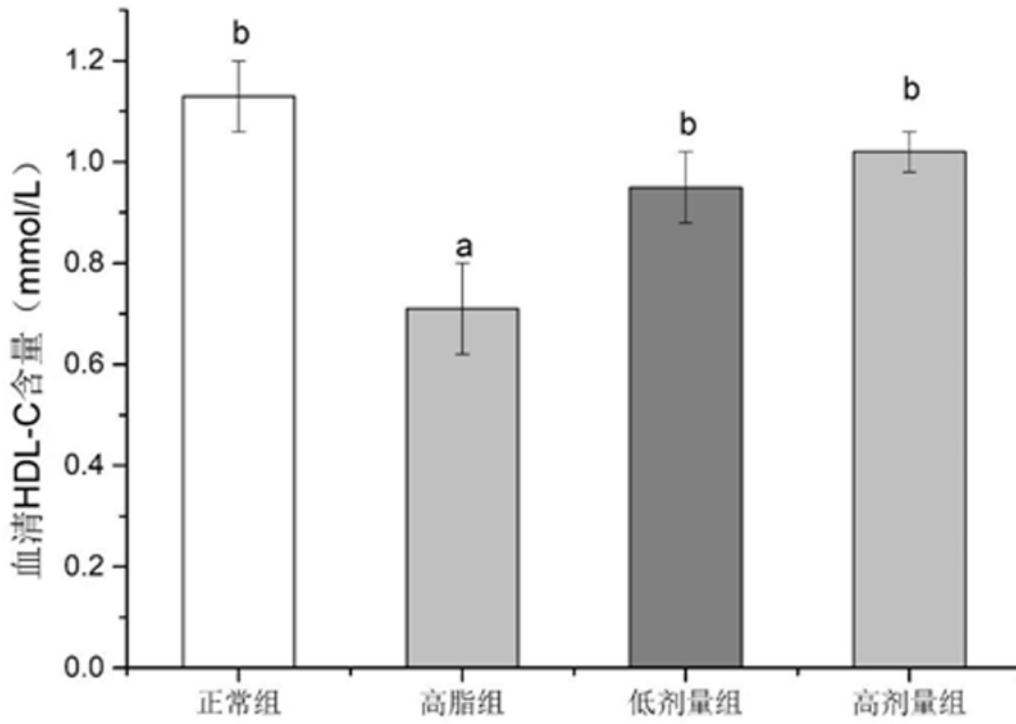


图7

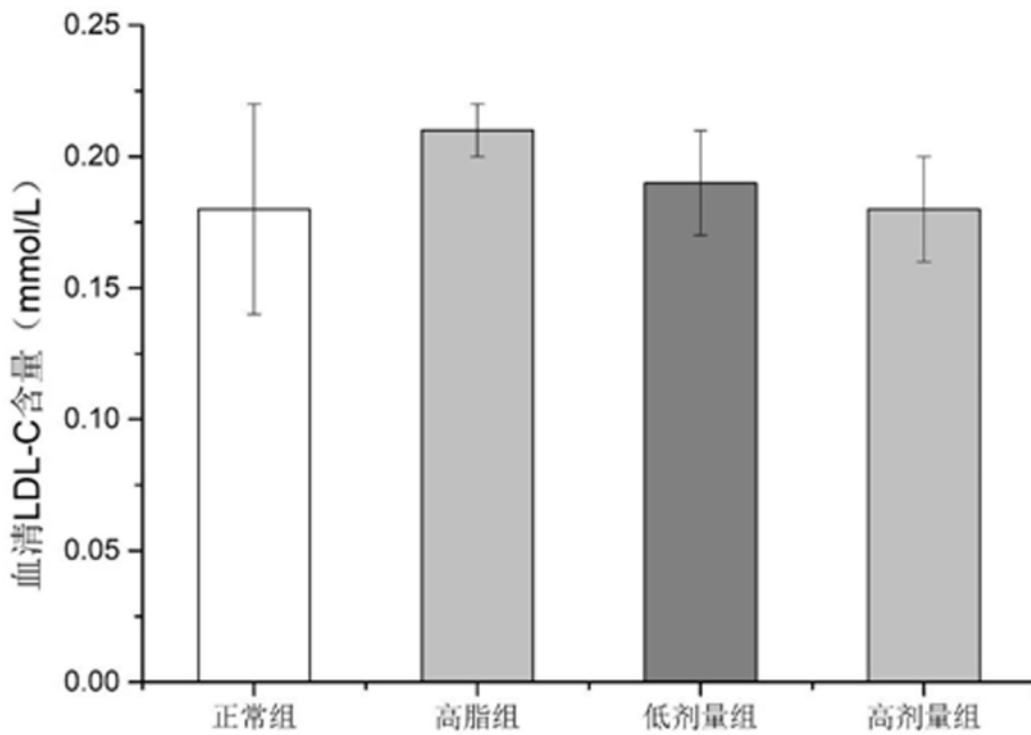


图8

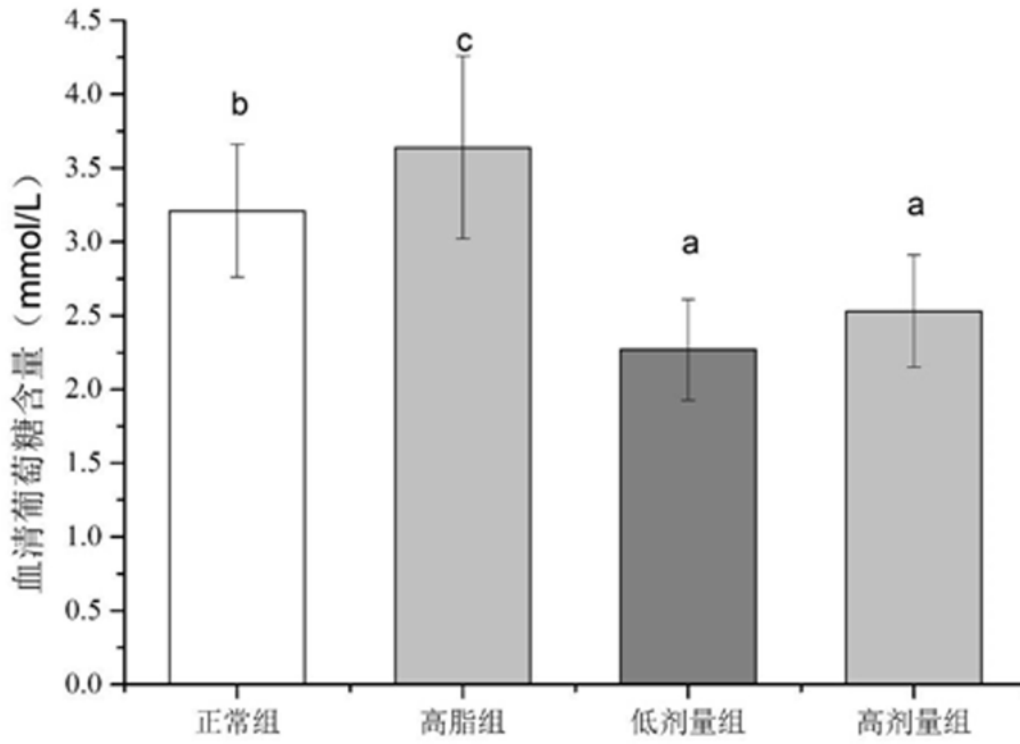


图9

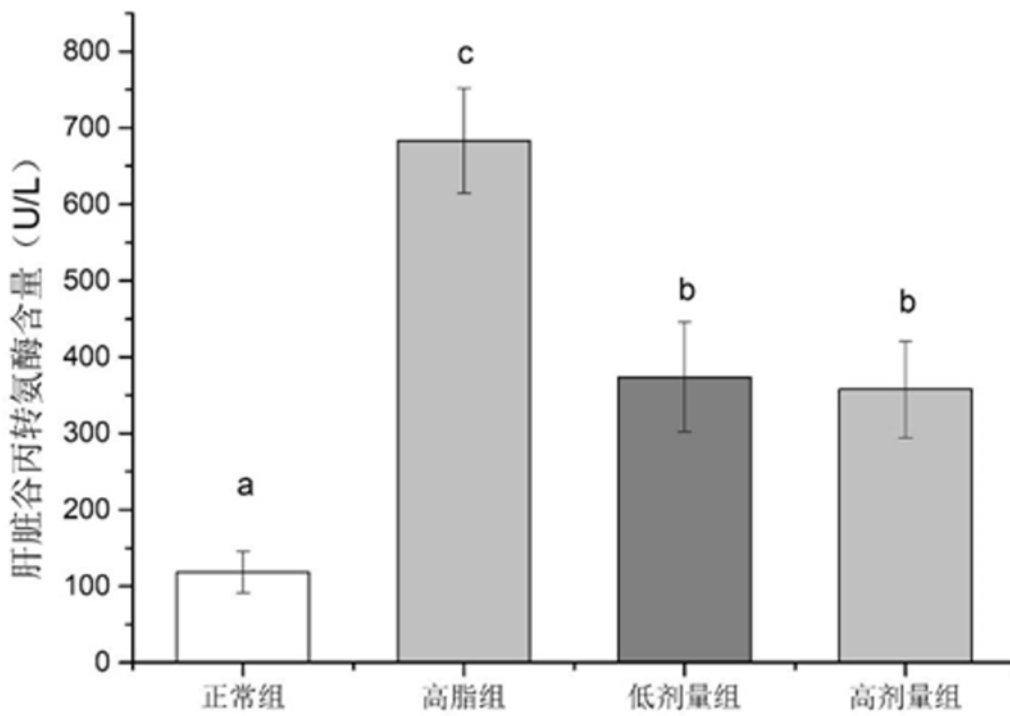


图10

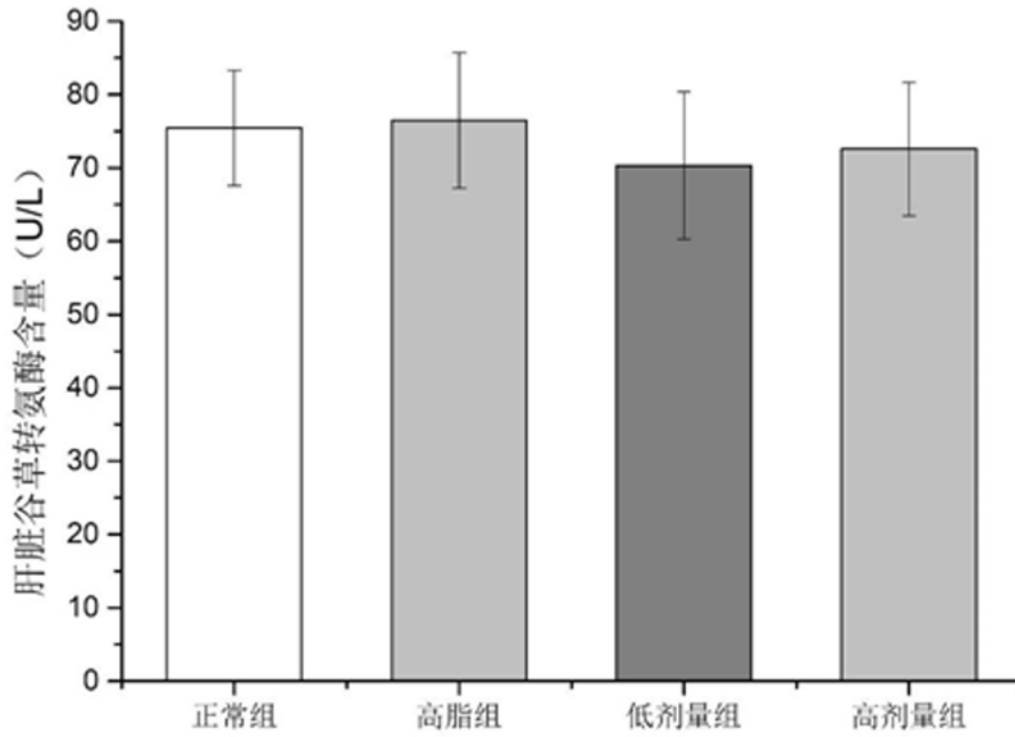


图11

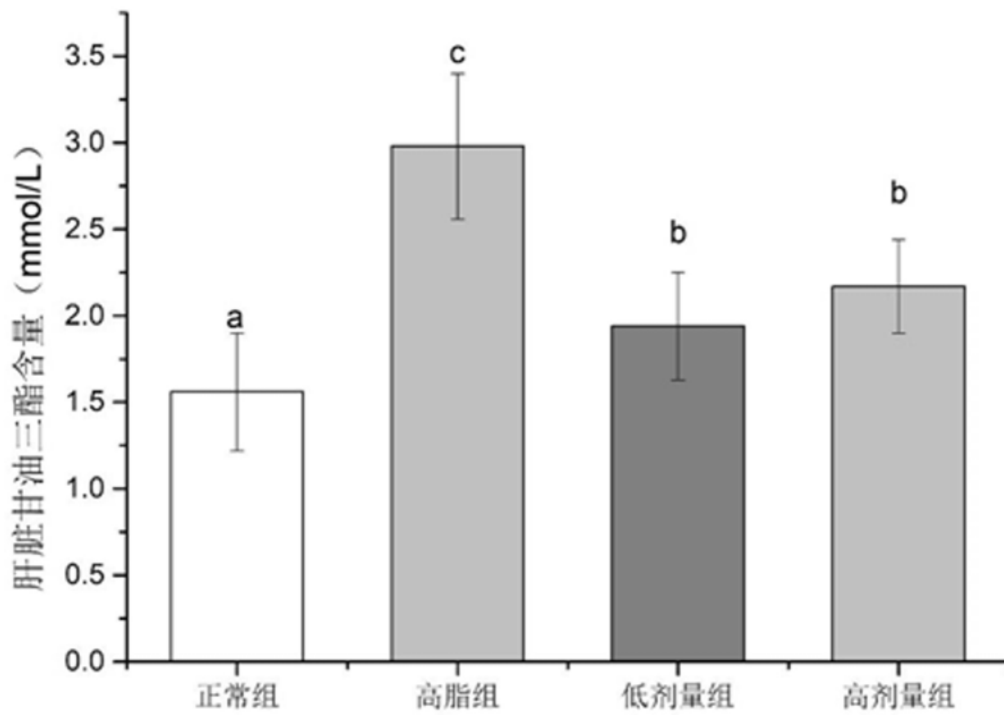


图12