



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111849827 B

(45) 授权公告日 2022.02.11

(21) 申请号 202010756524.9

(22) 申请日 2020.07.31

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111849827 A

(43) 申请公布日 2020.10.30

(83) 生物保藏信息
CGMCC NO.19126 2019.12.13

(73) 专利权人 南京农业大学
地址 210095 江苏省南京市玄武区卫岗1号

(72) 发明人 陈兴祥 李本睿 牟佳欣 葛雷
后丽丽 蒋帅 黄克和 潘翠玲
甘芳

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204
代理人 王艳

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 19/42 (2006.01)

A61K 35/741 (2015.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 3/02 (2006.01)

A23K 10/18 (2016.01)

A23K 20/174 (2016.01)

A23K 50/40 (2016.01)

C12R 1/225 (2006.01)

审查员 吴颖

权利要求书1页 说明书11页
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

犬源产维生素B12乳酸菌及应用

(57) 摘要

本发明公开了犬源产维生素B12乳酸菌及其应用,该犬源产维生素B12乳酸菌的分类命名为罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*),保藏编号为:CGMCC NO.19126,2019年12月13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。本发明所筛选的犬源产维生素B12乳酸菌,通过微生物法对其发酵液进行维生素B12含量的测定,产品中的维生素B12含量可达4.30 μg/L,通过优化后,产品中的维生素B12含量可达5.17 μg/L,本发明还提供了产维生素B12乳酸菌的扩增培养方法,使发酵液中菌含量可达 5.56×10^9 CFU/mL。



1. 犬源产维生素B12乳酸菌,其特征在于,该犬源产维生素B12乳酸菌的分类命名为罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*),保藏编号为:CGMCC NO.19126,2019年12月13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。

2. 权利要求1所述的犬源产维生素B12乳酸菌在制备维生素B12或益生菌制剂中的应用。

3. 含有权利要求1所述的犬源产维生素B12乳酸菌的肠道益生菌制剂。

4. 采用权利要求1所述的犬源产维生素B12乳酸菌制备维生素B12的方法,其特征在于,包括以下步骤:将犬源产维生素B12乳酸菌活化得到活化菌,将活化菌接种到MRS肉汤培养基中,置于恒温培养箱中厌氧静置培养得到菌液,将菌液离心后取上清液置于避光瓶中即得维生素B12。

5. 根据权利要求4所述的犬源产维生素B12乳酸菌制备维生素B12的方法,其特征在于,所述活化菌接种量为3%~9%,培养时间为24~96h,培养基pH在6~8。

6. 根据权利要求4所述的犬源产维生素B12乳酸菌制备维生素B12的方法,其特征在于,所述MRS肉汤培养基中还包括胆盐,所述胆盐浓度为0.1 %~0.4 % (w/v)。

7. 根据权利要求4所述的犬源产维生素B12乳酸菌制备维生素B12的方法,其特征在于,所述MRS肉汤培养基中还包括胰蛋白酶,所述胰蛋白酶浓度为1.0%~1.4%。

8. 根据权利要求4所述的犬源产维生素B12乳酸菌制备维生素B12的方法,其特征在于,所述MRS肉汤培养基中还包括 Co^{2+} , Co^{2+} 浓度为5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

9. 根据权利要求8所述的犬源产维生素B12乳酸菌制备维生素B12的方法,其特征在于,所述MRS肉汤培养基的 Co^{2+} 浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

犬源产维生素B12乳酸菌及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种犬源产维生素B12乳酸菌及其应用,具体涉及一种具有能够产维生素B12,用于预防和改善犬胃肠道疾病时维生素B12缺乏的菌株 NJAULR01,以及其在宠物食品中的应用。

背景技术

[0002] 维生素B12在机体中发挥着重要的生理作用,其作为蛋氨酸合成酶和甲基丙二酰辅酶A超氧化物歧化酶的辅助因子,参与同型半胱氨酸代谢、能量代谢和DNA复制,并且在产生和维持神经细胞髓鞘中起着关键作用。事实上,所有组织机能的正常发挥均需要维生素B12,但人类和非反刍动物均无法自身合成维生素B12,需要从富含维生素B12 的动物性食品(肉类、肝脏、肾脏、蛋类、牛奶、鱼类和贝壳类)中获得。

[0003] 进食动物性食品后,在胃内酸性条件下,食物中与蛋白质结合维生素B12得到释放,在胃内迅速与称为R结合物的一种糖蛋白结合。在犬中,R结合物在胃中合成,具有耐酸、耐胃蛋白酶的特性,可在维生素B12通过胃时提供保护作用。与R结合物结合的维生素B12到达十二指肠后,在碳酸氢盐存在的环境下,由胰腺蛋白酶将R结合物水解,释放出游离的维生素B12。随后,游离的维生素B12在肠内与内因子结合,形成钴胺素-内因子复合物。内因子合成的位点也因物种而异,在犬中主要由胃和胰腺合成。钴胺素-内因子复合物穿过肠道最终到达回肠末端,与回肠末端的钴胺素-内因子特异性受体结合并被吸收。还有一部分维生素B12通过肝肠循环被吸收。

[0004] 维生素B12缺乏引起的临床症状多种多样,包括巨幼细胞性贫血,伴有白细胞减少和血小板减少,消化粘膜萎缩,以及与神经细胞髓鞘有关的精神、认知和本体感觉障碍等神经症状。维生素B12的缺乏可由摄入、消化和吸收三方面中的一个或多个方面出现问题所导致的。目前市场上的宠物日粮通常拥有均衡的营养配比,犬猫一般不会出现维生素B12缺乏。犬猫维生素B12缺乏通常是由于胃肠道功能异常,特别是能够引起回肠和胰腺功能障碍的疾病引起维生素B12的消化吸收障碍。此外,在某些肝脏疾病中也会出现犬猫维生素B12缺乏。

[0005] 引起犬猫维生素B12缺乏最常见的疾病是慢性腹泻,尤其是波及回肠的慢性腹泻,可造成回肠末端的钴胺素-内因子特异性受体功能障碍,使得维生素B12的吸收受到影响。也有研究表明犬小肠细菌过度生长会造成维生素B12的耗竭。Simpson等人的研究表明,61.3%存在慢性腹泻临床症状表现的猫血清钴胺素低于正常值,Kook等人发现同时出现呕吐和腹泻症状的猫更容易出现维生素B12的缺乏。还有报道表明维生素B12 缺乏在患脂肪肝的猫中也较为常见,可能是由于潜在的胃肠道疾病或胆管肝炎所引起的。

[0006] 由于胰腺外分泌部是犬猫内因子的主要合成部位,所以胰腺外分泌功能不全的犬猫会出现维生素B12的缺乏。研究表明,在胰腺外分泌功能不全的猫中均出现了较低的血清维生素B12水平。Batchelor等人发现,82.8%患有胰腺外分泌功能不全的犬血清维生素B12水平较低。其他能够引起维生素B12缺乏的疾病包括犬猫的甲状腺机能减退或甲状腺机能

亢进、胃肠道淋巴瘤和某些特殊品种的遗传性维生素B12吸收障碍。

[0007] 总而言之,维生素B12缺乏在罹患胃肠道疾病、胰腺疾病、肝脏疾病以及一些内科疾病的犬猫中较为常见。

[0008] 常规犬猫维生素B12缺乏症的治疗主要通过每周皮下注射一次适当剂量的维生素B12,连续补充6周。而在一项最新的研究中发现,口服补充维生素B12也可纠正罹患慢性肠病犬的维生素B12缺乏,表明口服补充维生素B12可以替代慢性肠病和维生素 B12缺乏症动物皮下注射的给药方式。并且口服补充维生素B12通常比注射的方式更便宜、简单、减少动物的痛苦并且提高主人的依从性。

[0009] 维生素B12主要通过微生物发酵获得,脱氧假单胞菌和费氏丙酸杆菌是目前工业应用最广的维生素B12生产菌,但这两种菌均为工业用菌,并且对发酵的条件、时间和提取方法等均有严格要求,选择品质优良的维生素B12发酵菌株仍是当前研究的热点。乳酸菌是应用最早、最广泛的益生菌,且是国际公认的食品级安全微生物(GRAS)。乳酸菌制剂可以通过调节肠道菌群并且维持肠道的正常微生物平衡来预防和治疗胃肠道疾病,广泛应用于动物医疗和饲料相关领域。乳酸菌作为动物肠道中重要的益生菌群,产生的代谢产物富含有机酸,可通过降低肠道内pH值的方式来抑制肠道中潜在致病菌的生长;通过竞争性抑制病原体定植,调节肠道中的微生物生态平衡;还可提高动物机体免疫力等。近年来研究发现,乳酸菌同样具有产维生素B12的能力。Bhushan等从人类粪便及乳汁中分离的乳酸菌具有产维生素B12的能力。有研究表明,给予缺乏维生素 B12的怀孕母鼠口服具有产维生素B12能力的乳酸菌可治疗其因维生素B12缺乏而导致的临床症状。

[0010] 综上所述,鉴于犬猫罹患慢性腹泻、其他消化系统疾病和营养代谢性疾病所引起的维生素B12缺乏较为常见,分离鉴定能够产维生素B12的乳酸菌制备产维生素B12益生菌制剂,该制剂可同时发挥益生作用及补充维生素B12功能,以代替常规治疗手段,既减少了动物的痛苦又提高了主人的依从性。将是防治犬胃肠道疾病及维生素B12缺乏的有效手段。

发明内容

[0011] 发明目的:本发明所要解决的技术问题是提供了一种犬源产维生素B12乳酸菌 NJAULR01,该菌株具有调节肠道微生物平衡,并且能够产生维生素B12以预防和改善犬胃肠道疾病和维生素B12的缺乏,代替常规治疗(皮下注射)手段。

[0012] 本发明还要解决的技术问题是提供该犬源产维生素B12乳酸菌 NJAULR01在制备维生素B12或肠道益生菌中的应用。

[0013] 本发明还要解决的技术问题是提供犬源产维生素B12乳酸菌在犬内定殖中的应用。

[0014] 本发明最后要解决的技术问题是提供维生素B12的制备方法。

[0015] 技术方案:本发明提供了犬源产维生素B12乳酸菌,该犬源产维生素B12乳酸菌的分类命名为罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*),保藏编号为:CGMCC NO.19126,2019年12月13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。

[0016] 本发明内容还包括所述的犬源产维生素B12乳酸菌在制备维生素B12中的应用。

[0017] 本发明内容还包括所述的犬源产维生素B12乳酸菌在制备益生菌中的应用。

[0018] 本发明内容还包括含有所述的犬源产维生素B12乳酸菌的肠道益生菌。

[0019] 本发明内容还包括采用所述的维生素B12的制备方法,包括以下步骤:将犬源产维生素B12乳酸菌活化得到活化菌,将活化菌接种到MRS肉汤培养基中,置于恒温培养箱中厌氧静置培养得到菌液,将菌液离心后取上清液置于避光瓶即得维生素B12。

[0020] 其中,所述活化菌接种量为3%~9%,培养时间为24~96h。

[0021] 其中,所述MRS肉汤培养基中还包括猪胆盐,所述猪胆盐浓度为0.1%~0.4% (w/v)。

[0022] 其中,所述MRS肉汤培养基中还包括胰蛋白酶,所述胰蛋白酶浓度为1.0%~1.4%。

[0023] 其中,所述MRS肉汤培养基中还包括 Co^{2+} , Co^{2+} 浓度为5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0024] 其中,作为优选,所述MRS肉汤培养基的 Co^{2+} 浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0025] 本发明内容还包括维生素B12的测定方法,具体包括如下步骤:

[0026] 1) 取无水磷酸氢二钠、无水偏重亚硫酸钠和柠檬酸用二次蒸馏水溶解得到溶液,取上清液即维生素B12用上述溶液混合后,再用蒸馏水定容,置于121 $^{\circ}\text{C}$ 下水解10min,冷却后调pH,制成待测溶液;

[0027] 2) 将上述待测溶液加入维生素B12测定培养基中,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌5min后迅速冷却得到混合液,并向混合液中加入供试菌液,混匀,静置培养测其OD值,根据OD值与建立的标准浓度曲线对照得到维生素B12的含量。

[0028] 其中,所述步骤3)中的供试菌液的制备方法如下:将莱士曼氏乳酸杆菌ATCC7830进行活化,活化后菌液以5%传代至10mL MRS肉汤培养基中置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中厌氧静置培养48h。将菌液以5000r/min离心10min离心后,弃去上清液,加入用1mL 灭菌生理盐水洗菌三遍并将菌体重悬。以灭菌生理盐水作为空白对照,将紫外分光光度计调至550nm波长下进行测定,调整菌液OD在0.6~0.8之间,作为供试菌液。

[0029] 本发明的筛选的犬源产维生素B12乳酸菌能在MRS肉汤培养基内生长。使用微生物法进行对其发酵液中的维生素B12含量测定。其中,本发明常规培养条件为:培养时间48h,37 $^{\circ}\text{C}$,接种量5%,pH=6.8。结果表明,常规培养条件下,发酵液中维生素B12含量可达4.30 $\mu\text{g}/\text{L}$;本发明还提供了犬源产维生素B12乳酸菌的扩增培养方法,使发酵液中菌含量可达 $5.56 \times 10^9 \text{CFU}/\text{mL}$;并且优化了产维生素B12乳酸菌的培养条件,试验表明在培养基中钴离子浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (其他培养条件不变)时,产维生素B12乳酸菌发酵液中维生素B12的产量可达5.17 $\mu\text{g}/\text{L}$ (48h)。

[0030] 对产维生素B12乳酸菌进行生长能力以及产酸能力进行研究发现,该菌株在培养4h后达到对数期,表明其具有良好的生长能力。同时产维生素B12乳酸菌的发酵液pH在4.43-4.45之间,远低于培养基pH,表明其具有良好的产酸能力,能够降低胃肠道pH,发挥抑菌作用。

[0031] 进一步的体外生物学特性研究研究发现,产维生素B12乳酸菌在60 $^{\circ}\text{C}$ 下处理10min后菌体数量为 $6.4 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$,表明其具有良好的耐高温能力;该菌株接种到pH为2.0的酸性环境培养4h后菌体数量为 $1.21 \times 10^4 \text{CFU}/\text{mL}$,表明该菌株对强酸性环境耐受良好;在含0.4%胆盐的MRS肉汤培养基中培养4h后菌体数量为 $3.0 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$,表明该菌株对胆盐耐受良好;同时,在含有1.4%的胰蛋白酶MRS肉汤培养基中培养4h后菌体数量为 $1.15 \times 10^7 \text{CFU}/\text{mL}$,表明该菌株对胰蛋白酶具有良好的耐受性。

[0032] 有益效果:与现有技术相比,本发明具备以下优点:本发明所筛选的犬源产维生素B12乳酸菌,通过微生物法对其发酵液进行维生素B12含量的测定,产品中的维生素 B12含量可达4.30 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。本发明还提供了产维生素B12乳酸菌的扩增培养方法,使发酵液中菌含量可达 $5.56 \times 10^9 \text{CFU}/\text{mL}$ 。并且优化了产维生素B12乳酸菌的培养条件,在培养基钴离子浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (其他培养条件不变)时,产维生素B12乳酸菌发酵液中维生素B12的产量可达5.17 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。试验表明,本发明所筛选的产维生素B12乳酸菌具有良好的生长及产酸能力,对高温、酸、胆盐及胰蛋白酶都有良好的耐受性。进一步的小白鼠体内急性毒性试验证明,产维生素B12乳酸菌对小白鼠无急性毒性,并且能够调节试验小鼠肠道菌群平衡;通过动物试验证明该菌株能够在犬体内定殖。

附图说明

[0033] 图1、为罗氏乳杆菌 (NJAU LR01) 的形态图 (革兰氏染色, 100X) ;

[0034] 图2为罗氏乳杆菌 (NJAU LR01) 16S rDNA的电泳鉴定图。其中, M为DNA marker; 泳道2为NJAU LR01的PCR产物;

[0035] 图3为维生素B12标准浓度曲线;

[0036] 图4为NJAU LR01生长曲线;

[0037] 图5为NJAU LR01培养条件优化。

具体实施方式

[0038] 下面通过具体的实施例对本发明进一步说明,应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干变型和改进,这些也应视为属于本发明的保护范围。

[0039] 实施例1 乳酸菌的分离与鉴定

[0040] 1、培养基的配制

[0041] MRS琼脂培养基的配方为:1L蒸馏水中含:蛋白胨10g,酵母膏5g,葡萄糖20g,牛肉膏10g,乙酸钠5g,柠檬酸三胺2g,吐温-801mL,七水合硫酸镁0.58g,一水合硫酸锰0.05g,磷酸氢二钾2g,琼脂20g,调节pH=6.8;115 $^{\circ}\text{C}$,高压蒸汽灭菌20min,备用。

[0042] MRS肉汤培养基的配方为,1L蒸馏水中含:蛋白胨10g,酵母膏5g,葡萄糖20g,牛肉膏10g,乙酸钠5g,柠檬酸三胺2g,吐温-801mL,七水合硫酸镁0.58g,一水合硫酸锰0.05g,磷酸氢二钾2g,调节pH=6.8;115 $^{\circ}\text{C}$,高压蒸汽灭菌20min,备用。

[0043] 2、样品来源

[0044] 在某犬场挑选健康比格犬八条,公母各半。所有的犬均是饲喂商品犬粮。所选取的犬均无改变犬粮的历史,并且三个月内没有使用抗生素并且没有发生过腹泻。

[0045] 3、样品采集和分离

[0046] 无菌采取上述犬的粪便。在送至实验室之前,将采取的粪便4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,4小时内完成细菌的分离。称取0.5g犬粪便样品与5mL灭菌生理盐水混合均匀,借助涡旋振荡器充分震荡,取1mL混合液于无菌EP管中连续十倍倍比稀释,得到 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释液。

[0047] 分别吸取100 μL 各个稀释梯度的稀释液均匀涂布至MRS琼脂培养基表面,37 $^{\circ}\text{C}$ 下厌

氧培养48h,观察菌落形态,挑取边缘整齐、圆形、实心、乳白色单菌落接种于5mL MRS肉汤培养基中,在37℃下静置厌氧培养48h后,取无菌接种环蘸取菌液进行MRS 固体平板划线接种纯化。挑单菌落进行涂片、革兰氏染色、镜检,选取革兰氏染色阳性、圆形或卵圆形、单个、成对或短链状排列的菌。同时进行过氧化氢酶接触试验,挑选过氧化氢酶接触试验为阴性的菌。分纯的各株阳性细菌按照50%甘油与菌液1:1混合后冻存于-80℃冰箱低温保存备用,即为犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01。

[0048] 4、犬源产维生素B12乳酸菌的鉴定

[0049] 16S rDNA序列测定进行菌株的鉴定:

[0050] 将犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01按5%接种于MRS肉汤培养基中,37℃下厌氧静置培养48h,按照细菌DNA提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)操作说明提取产维生素B12乳酸菌NJAULR01的DNA。

[0051] 将所得的分离株DNA利用16S rDNA通用引物进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)。上游引物27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';下游引物1492r:5'-GGTTACCTTTGTTACGACTT-3';PCR反应体系组成:模板DNA4μL,PCR预混液(含Taq酶,Buffer,dNTP,Mg²⁺)25μL,上下游引物各1μL,灭菌ddH₂O补足体系50μL,阴性对照使用4μL灭菌ddH₂O代替模板DNA;DNA扩增条件如下:94℃下预变性5min,而后继续变性1min,接着55℃退火1min,72℃下延伸1min,进行30个循环,最后72℃延伸10min,于4℃保存。

[0052] 取分离株DNA扩增产物利用1.0%琼脂糖凝胶电泳试验进行检测,观察其条带大小,送至生工生物工程(上海)股份有限公司,对DNA扩增产物进行测序,将GenBank数据库中的相关序列与所测得的16S rDNA序列结果进行相似性比对,并利用Blast程序进行多重比对。测序结果:该DNA序列长度为1481bp。经序列对比,本发明菌株与罗氏乳杆菌的相似度为99.73%。

[0053] 将该源产维生素B12乳酸菌NJAULR01于2019年12月13日,保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心,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,分类命名为罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*),保藏号为CGMCC NO.19126。

[0054] 实施例2:对实施例1筛选的犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01扩大培养

[0055] 种子培养基的配方为:1L蒸馏水中含:蛋白胨10g,酵母膏5g,葡萄糖20g,牛肉膏10g,乙酸钠5g,柠檬酸三胺2g,吐温-801mL,七水合硫酸镁0.58g,一水合硫酸锰0.05g,磷酸氢二钾2g,调节pH=6.8;115℃,高压蒸汽灭菌20min,备用。

[0056] 将实施例1得到的菌株NJAULR01接种于装有100mL种子培养基的250mL的锥形瓶中,7℃厌氧静置培养48h,获得NJAULR01液体培养物,其中菌体数量为 5.56×10^9 CFU/mL。

[0057] 实施例3:犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01维生素B12产量测定

[0058] 1、制作维生素B12标准曲线

[0059] 精确称取维生素B12标准品,使用体积分数25%的乙醇溶液配制10μg/mL的维生素B12贮备液。随后分别使用体积分数25%的乙醇溶液将贮备液定容至100ng/mL、1 ng/mL的维生素B12中间液和工作液。在临用前将工作液使用二次蒸馏水定容至0.01 ng/mL、0.02ng/mL的维生素B12标准曲线工作液。整个配制过程严格避光,配制好的溶液置于4℃冰箱低温避光保存。

[0060] 将用于测定维生素B12的莱士曼氏乳酸杆菌ATCC7830进行活化,活化后菌液以

5%传代至10mL MRS肉汤培养基中置于37℃恒温培养箱中厌氧静置培养48h。将菌液以5000r/min离心10min离心后,弃去上清液,加入用1mL灭菌生理盐水洗菌三遍并将菌体重悬。以灭菌生理盐水作为空白对照,将紫外分光光度计调至550nm波长下进行测定,调整菌液OD在0.6~0.8之间,作为供试菌液。

[0061] 标准曲线试管中的添加见表1,其中培养基为维生素B12测定培养基,试管No.2-6中加0.01ng/mL的标准溶液;试管No.7-9中加0.02ng/mL的标准溶液。

[0062] 表1维生素B12标准曲线制备

培养管序号	二次蒸馏水 (mL)	VB12 标准溶液 (mL)	培养基 (mL)
[0063] 1	5	0	5
2	4	1	5
3	3	2	5
4	2	3	5
5	1	4	5
6	0	5	5
7	2	3	5
8	1	4	5
[0064] 9	0	5	5

[0065] 将上述试管121℃灭菌5min后迅速冷却至30℃,并使用移液器向上述试管中各加入25μL供试菌液,混匀。在37℃下静置培养20h后测其OD值。以OD值为纵轴,维生素B12含量为横轴,绘制维生素B12标准曲线,维生素B12标准曲线见图3。

[0066] 2、使用微生物法对犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01发酵液中维生素B12的含量进行测定。

[0067] 将实施例1中冻存的犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01进行活化,活化后菌液按5%传代至10mL MRS肉汤培养基中,置于37℃恒温培养箱中厌氧静置培养48h。将菌液以5000r/min离心10min离心后取上清液置于避光瓶中。无水磷酸氢二钠1.3g,无水偏重亚硫酸钠1.0g,柠檬酸1.2g用100mL二次蒸馏水溶解得到溶液,取犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01上清液5mL用10mL上述溶液混合后,再用蒸馏水定容至150mL,置于121℃下水解10min,冷却后调pH至4.5,再用二次蒸馏水按倍比稀释,稀释100倍,制成待测溶液。

[0068] 将待测溶液依次加入试管中,试管中的添加成分参见表2,其中培养基为维生素B12 测定培养基(HB7041维生素B12测定用培养基,青岛海博生物技术有限公司)。

[0069] 表2犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01发酵液测定

试管序号	二次蒸馏水 (mL)	样品 (待测溶液)(mL)	培养基 (mL)
1	4	1	5
[0070] 2	3	2	5
3	2	3	5
4	1	4	5

[0071] 将上述试管121℃灭菌5min后迅速冷却至30℃,并使用移液器向上述试管中各加入25μL供试菌液,混匀。在37℃下静置培养20h后测其OD值。对照维生素B12标准曲线,计算出犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01发酵液中的维生素B12含量。结果表明犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01发酵液中维生素B12的含量为4.30μg/L。

[0072] 实施例4:犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01的生长曲线、体外产酸、耐高温、耐酸、耐胆盐以及耐胰蛋白酶试验测定

[0073] 1、生长曲线测定试验

[0074] 将实施例1中冻存犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01活化,活化后菌液按5%传代至100mLMRS肉汤培养基中,置于37℃恒温培养箱中,厌氧静置培养48h,每间隔 2h吸取1mL菌液进行连续十倍倍比稀释,倍比稀释调节浓度为 10^{-1} 至 10^{-6} ,分别取100 μL稀释度为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 的稀释液涂布于MRS琼脂培养基,37℃厌氧静置培养48h后计数。计算菌液浓度的对数值,并记录,重复三次,取平均值,以培养时间(h) 为横坐标,菌液浓度对数值的平均值为纵坐标,绘制犬源产维生素B12乳酸菌 NJAULR01生长曲线。

[0075] 结果见图4,由结果可知产维生素B12乳酸菌在培养4h后达到对数期,生长速度快,表明其具有良好的生长活性。

[0076] 2、产酸试验

[0077] 将犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01活化,活化后菌液按5%传代至100mL MRS 肉汤培养基中,置于37℃恒温培养箱中,厌氧静置培养48h后,吸取10mL菌液于EP 管中,4℃下5000r/min离心10min,吸取上清液,用pH计测量上清液pH值并记录,重复三次试验,取平均值。

[0078] 结果表明48h后产维生素B12乳酸菌的上清液pH为4.43~4.45,由此可知产维生素B12乳酸菌在培养48h后的pH明显低于MRS肉汤培养基pH值(6.8)。表明其具有良好的产酸能力,在使自身具有良好耐酸能力的同时也降低了肠道中的pH,创造不利于病原菌的生存条件,从而防治由于感染性因素导致的胃肠道疾病的发生。

[0079] 3、耐高温试验

[0080] 将犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01活化,活化后菌液按5%传代至10mL MRS 肉汤培养基中,置于37℃恒温培养箱中,厌氧静置培养48h后,分别于37、45、50、55、60℃下水浴处理10min,而后转移至室温,取1mL菌液进行连续十倍倍比稀释,各取100μl稀释液滴加至MRS琼脂平板上,37℃厌氧静置培养24h后计数。以经37℃处理作为对照,计算菌液中活菌数,并记录,重复三次,取平均值。

[0081] 结果见表4,由结果可知犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01在37℃下处理10min,活菌数为 2.6×10^7 CFU/mL,45℃下处理10min,活菌数为 2.9×10^7 CFU/mL;在50℃下处理10min,

活菌数为 8.0×10^6 CFU/mL;在55℃下处理10min,活菌数为 7.6×10^6 CFU/mL;在60℃下处理10min,活菌数仍可达 3.0×10^6 CFU/mL,表明其对高温有一定的耐受性,在制备益生菌制剂时可耐受高温并保持一定的活菌数。

[0082] 表4犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01耐高温能力筛选

		不同温度下培养 10 min 活菌数 (\log_{10} CFU/mL)				
[0083]	培养温度	37℃	45℃	50℃	55℃	60℃
	NJAULR01	7.40±0.01	7.4±0.002	6.88±0.03	6.84±0.05	6.35±0.22

[0084] 4、耐酸试验

[0085] 试验所需不同pH MRS肉汤培养基的制备:利用1M盐酸溶液处理MRS肉汤培养基,借助pH计将MRS肉汤培养基pH值分别调整至2.0、3.0、4.0、5.0、6.0,分装于试管中并标记,115℃高压灭菌20min备用。

[0086] 将犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01活化,活化后菌液按5%传代至上述不同PH的MRS肉汤培养基中,以等量接种至未调pH值MRS肉汤培养基中作为对照,置于37℃恒温培养箱中,厌氧静置培养4h后,取1mL菌液进行连续十倍倍比稀释,各取100 μ l稀释液滴加至MRS琼脂平板上均匀涂布,37℃厌氧静置培养24h后计数。计算菌液中活菌数,并记录,重复三次,取平均值。

[0087] 结果见表5,由结果可知,犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01接种到pH值为2.0的MRS肉汤培养基中,4h后活菌数为 1.2×10^4 CFU/mL;接种到pH值为3.0的MRS肉汤培养基中,4h后活菌数为 8.4×10^5 CFU/mL;接种到pH值为4.0的MRS肉汤培养基中,4h后活菌数为 3.8×10^7 CFU/mL;接种到pH值为5.0的MRS肉汤培养基中,4h后活菌数为 6.4×10^7 CFU/mL;接种到pH值为6.0的MRS肉汤培养基中,4h后活菌数为 8.2×10^7 CFU/mL。表明其对不同PH的酸性环境均有一定的耐受性。

[0088] 表5犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01耐酸能力筛选

		不同 pH 下培养 4h 活菌数 (\log_{10} CFU/mL)				
[0089]	pH	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0
	NJAULR01	7.90±0.004	7.80±0.004	7.57±0.01	5.88±0.05	4.07±0.001

[0090] 5、耐胆盐试验

[0091] 试验所需不同浓度猪胆盐的MRS肉汤培养基的制备:分别向100mL MRS肉汤培养基中加入0.1、0.2、0.3、0.4g猪胆盐,配制成浓度为0.1%、0.2%、0.3%、0.4% (w/v) 的MRS肉汤培养基,以未添加猪胆盐的MRS肉汤培养基作为对照,分装至试管中并标记,115℃高压灭菌20min备用。

[0092] 将犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01活化,活化后菌液按5%传代至上述不同浓度猪胆盐的MRS肉汤培养基中,以等量接种至未添加猪胆盐的MRS肉汤培养基中作为对照,置于37℃恒温培养箱中,厌氧静置培养4h后,取1mL菌液进行连续十倍倍比稀释,各取100 μ l稀释液滴加至MRS琼脂平板上均匀涂布,37℃厌氧静置培养24h后计数。计算菌液中活菌数,并记录,重复三次,取平均值。

[0093] 结果见表6,由结果可知,产维生素B12乳酸菌菌接种到胆盐浓度为0.1%的MRS肉汤培养基中4h后活菌数为 2.4×10^7 CFU/mL;接种到胆盐浓度为0.2%的MRS肉汤培养基中4h后活菌数为 9.7×10^6 CFU/mL;接种到胆盐浓度为0.3%的MRS肉汤培养基中4h后活菌数为 3.2×10^5 CFU/mL,接种到胆盐浓度为0.4%的MRS培养基中4h后活菌数为 1.6×10^4 CFU/mL。表明其对不同浓度的胆盐环境均有一定的耐受性。

[0094] 表6 NJAULR01耐胆盐能力筛选

		不同胆盐浓度下培养 4h 活菌数(log ₁₀ CFU/mL)			
[0095]	胆盐浓度	0.1 %	0.2 %	0.3 %	0.4 %
	NJAULR01	7.34±0.06	6.90±0.13	5.50±0.004	4.14±0.09

[0096] 6、耐胰蛋白酶试验

[0097] 试验所需含不同浓度胰蛋白酶MRS肉汤培养基的制备:分别向100mL灭菌MRS肉汤培养基中加入1g、1.2g、1.4g胰蛋白酶粉末,充分混合均匀,用0.45μm微孔滤膜过滤除菌,以未添加胰蛋白酶的MRS肉汤培养基作为对照,分装至试管中并标记;

[0098] 将犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01活化,活化后菌液按5%传代至上述不同浓度胰蛋白酶的MRS肉汤培养基中,以等量接种至未添加胰蛋白酶的MRS肉汤培养基中作为对照,置于37℃恒温培养箱中,厌氧静置培养4h后,取1mL菌液进行连续十倍倍比稀释,各取100μL稀释液滴加至MRS琼脂平板上均匀涂布,37℃厌氧静置培养24h后计数。计算菌液中活菌数,并记录,重复三次,取平均值。

[0099] 结果见表7,由结果可知,产维生素B12乳酸菌菌接种到胰蛋白酶浓度为1%的MRS肉汤培养基中4h后活菌数为 3.9×10^7 CFU/mL;接种到胆盐浓度为1.2%的MRS肉汤培养基中4h后活菌数为 1.7×10^7 CFU/mL;接种到胆盐浓度为1.4%的MRS肉汤培养基中4h后活菌数为 1.0×10^7 CFU/mL。表明其对不同浓度的胰蛋白酶环境均有一定的耐受性。

[0100] 表7 NJAULR01耐胰蛋白酶能力筛选

		不同胰蛋白酶浓度下培养 4h 活菌数 (log ₁₀ CFU/mL)		
[0101]	胰蛋白酶浓度	1.0 %	1.2 %	1.4 %
	NJAULR01	7.48±0.001	7.23±0.007	7.00±0.01

[0102] 实施例5 犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01培养条件优化

[0103] 为了获得最佳的维生素B12产量,对NJAULR01的培养温度(30℃、35℃、40℃和45℃)、接种量(3%、5%、7%、9%)、培养基pH(5.0、6.0、7.0和8.0)及培养基中Co²⁺浓度(5、10、15和20μg/mL)进行优化。

[0104] 结果见图5,结果表明,;在培养基中添加不同浓度Co²⁺后,NJAULR01发酵液中维生素B12含量均有不同程度的增加,其中当培养基中Co²⁺浓度为10μg/mL时,发酵液中维生素B12含量最高,可达5.17μg/L(48h);而培养温度、接种量和培养基pH的改变均不能显著增加发酵液中维生素B12的含量。

[0105] 实施例6 产维生素B12乳酸菌NJAULR01的安全性试验

[0106] 为了检测本发明菌株的安全性,进行小鼠安全性试验。试验按照GB159193-2003

寇氏 (KORBOR) 法进行。选择使用健康的ICR小鼠20只,雌雄各半,体重 $20\text{g} \pm 2\text{g}$,分别饲养于灭菌鼠笼内,垫等量木屑,饲喂等量鼠粮,保证充足饮水及温度适宜,置于安静、通风环境中,注意及时清理粪便,保持环境卫生,饲喂一周后确保小鼠健康、无应激现象出现。

[0107] 将犬源产维生素B12乳酸菌NJAU LR01活化,活化后菌液按5%传代至100mL MRS肉汤培养基中,置于 37°C 恒温培养箱中,厌氧静置培48h后,进行菌落计数。调整菌液浓度为 $10^{10}\text{CFU}/\text{mL}$ 。按照菌液浓度 $1 \times 10^{10}\text{CFU}/\text{只}$ 对小鼠进行灌胃给药,以灌服等量灭菌MRS肉汤培养基作为对照。灌胃后正常饲喂并观察小鼠呼吸、进食、相关体貌特征以及病死情况并记录,观察期为两周。

[0108] 给药后小鼠未出现不适症状,小鼠活动正常,在整个观察期间精神状态良好、毛色光洁、活动自如、呼吸均匀、口鼻内无异常分泌物,动物饮食量正常,便软,小便无异常。于2周后脱颈椎处死小鼠,并对所有小鼠进行尸检,肉眼观察心、肝、脾、肺、肾等内脏器官均未见任何异常。

[0109] 实施例7 犬源产维生素B12乳酸菌NJAU LR01对小鼠肠道菌群调节试验

[0110] 选择使用健康的ICR小鼠18只,雌雄各半,体重 $20\text{g} \pm 2\text{g}$,分为MRS灌胃对照组、常规剂量($2 \times 10^8\text{CFU}/\text{只}$)灌胃组和高剂量($2 \times 10^{10}\text{CFU}/\text{只}$)灌胃组,分别饲养于灭菌鼠笼内,垫等量木屑,饲喂等量鼠粮,保证充足饮水及温度适宜,置于安静、通风环境中,注意及时清理粪便,保持环境卫生,饲喂一周后确保小鼠健康、无应激现象出现。

[0111] 将犬源产维生素B12乳酸菌NJAU LR01活化,活化后菌液按5%传代至100mL MRS肉汤培养基中,置于 37°C 恒温培养箱中,厌氧静置培48h后,进行菌落计数,调整菌液浓度,按照 $100\mu\text{L}/\text{只}/\text{天}$ 的剂量按照上述浓度对各组小鼠连续灌胃14d。分别于试验第0、7、14d无菌经直肠收集各组小鼠粪便,收集到的粪便精确称重 0.1g ,以 $900\mu\text{L}$ 灭菌生理盐水涡旋混匀后,进行连续十倍倍比稀释,倍比稀释调节浓度为 10^{-1} 至 10^{-6} ,取 $100\mu\text{L}$ 稀释度为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 的稀释液分别涂布于麦康凯琼脂, 37°C 培养24h后计数;取 $100\mu\text{L}$ 稀释度为 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 的稀释液分别涂布于MRS琼脂培养基, 37°C 厌氧静置培养48h后计数,最终计算每克粪便中的细菌数含量。

[0112] 结果见表8,由结果可知,在灌服产维生素B12乳酸菌NJAU LR01的第0天,各组小鼠之间每克粪便中乳酸菌活菌数无明显差异;与对照组相比,试验第7天常规剂量灌胃组与高剂量灌胃组小鼠粪便中乳酸菌数量显著提高($p < 0.05$),粪便中大肠杆菌数量显著降低($p < 0.05$);与对照组相比,试验灌胃第14天常规剂量灌胃组小鼠粪便中乳酸菌数量显著提高($p < 0.05$),粪便中大肠杆菌数量显著降低($p < 0.05$);与常规剂量灌胃组相比,高剂量灌胃组小鼠粪便中乳酸菌数量显著提高($p < 0.05$),粪便中大肠杆菌数量显著降低($p < 0.05$),证明犬源产维生素B12乳酸菌NJAU LR01具有调节肠道菌群的作用,可以显著提高肠道中乳酸菌的数量,显著降低肠道中大肠杆菌的数量。

[0113] 表8犬源产维生素B12乳酸菌NJAU LR01对小鼠肠道菌群的影响

时间 (d)	乳酸菌 (\log_{10} CFU/g)			大肠杆菌 (\log_{10} CFU/g)		
	0	7	14	0	7	14
[0114] 对照组	7.83±0.05 ^a	7.85±0.01 ^a	7.76±0.01 ^a	5.89±0.02 ^a	5.58±0.01 ^a	5.95±0.01 ^a
常规剂量组	7.77±0.03 ^a	8.56±0.04 ^b	8.73±0.009 ^b	5.90±0.04 ^a	5.66±0.01 ^b	5.33±0.05 ^b
高剂量组	7.86±0.11 ^a	8.65±0.3 ^b	8.99±0.004 ^c	5.94±0.01 ^a	4.58±0.002 ^c	4.29±0.03 ^c

[0115] 注:同列数据凡是具有同一个小写字母者,表示差异不显著 ($p>0.05$)

[0116] 实施例8:犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01在犬体内定殖试验

[0117] 将犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01活化,活化后菌液按5%传代至100mL MRS 肉汤培养基中,置于37℃恒温培养箱中,厌氧静置培养48h后在MRS琼脂平板上划线纯化。分别配制利福平质量浓度为0、6.25、12.5、25、50和100 μ g/mL的MRS肉汤培养基,取纯化好的NJAULR01单菌落接种到含利福平质量浓度为6.25 μ g/mL的MRS 肉汤培养基中,37℃厌氧静置培养48h,待MRS肉汤培养基出现混浊后,用稀释平板法将稀释后的菌液涂匀在含相同质量浓度利福平的平板上,待长出单菌落后,挑菌转入下一高浓度MRS肉汤培养基中培养,至出现菌体,依次类推。最终在100 μ g/mL MRS 琼脂平板上长出的菌株则为耐利福平菌株。将耐利福平的菌株使用50%的甘油生理盐水保存液于-80℃冻存。使用前将菌株接种于含有100 μ g/mL利福平的MRS琼脂平板,37℃厌氧培养48h进行活化。

[0118] 选用8条体重8±2kg、年龄在18个月左右的本地犬,公母各半。试验前后所有犬环境条件、基础日粮、饲养管理都相同。预饲7d,饲喂基础犬粮,预饲结束后进入试验期,对照组饲喂基础犬粮,试验组饲喂基础犬粮,并每日补给5mL 1×10^9 CFU/mL产维生素B12乳酸菌NJAULR01的耐利福平菌株,时间14d,常规管理。

[0119] 分别于实验第0、7、14、21天,无菌经直肠采取犬粪便。收集到的粪便精确称重0.1g并使用900 μ L灭菌生理盐水涡旋混匀后,进行连续十倍倍比稀释,倍比稀释调节浓度为 10^{-1} 至 10^{-6} ,各取100 μ L稀释液接种于含有100 μ g/mL利福平的MRS琼脂平板上37℃厌氧培养48h,以观察产维生素B12乳酸菌NJAULR01在犬体内的定殖情况。

[0120] 表9耐利福平NJAULR01体内定殖实验

时间 (d)	犬粪便中分离到耐利福平 NJAULR01 活菌数 (\log_{10} CFU/g)			
	0	7	14	21
[0121] NJAULR01	0 ^a	6.03±0.15 ^b	6.14±0.05 ^b	4.41±0.04 ^c

[0122] 由表9可知,在饲喂耐利福平菌株的第0天,犬粪便中没有发现能够在含100 μ g/mL利福平的MRS琼脂平板上生长的犬源产维生素B12乳酸菌NJAULR01。饲喂第7天,所有犬粪便中能检测到耐利福平的NJAULR01菌株。在饲喂期间的第7、14、21天检测犬粪便中耐利福平NJAULR01菌株的活菌数。在饲喂期间,菌株在动物体内的活菌数均能达到 10^6 CFU/g。停止饲喂后,仍能在犬粪便中检测到耐利福平NJAULR01菌株,可达 10^4 CFU/g,但与饲喂期间有显著差异 ($p<0.05$)。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 南京农业大学
- [0003] <120> 犬源产维生素B12乳酸菌及应用
- [0004] <160> 2
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 20
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] agagtttgat cctggctcag 20
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 20
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] ggttaccttt gttacgactt 20

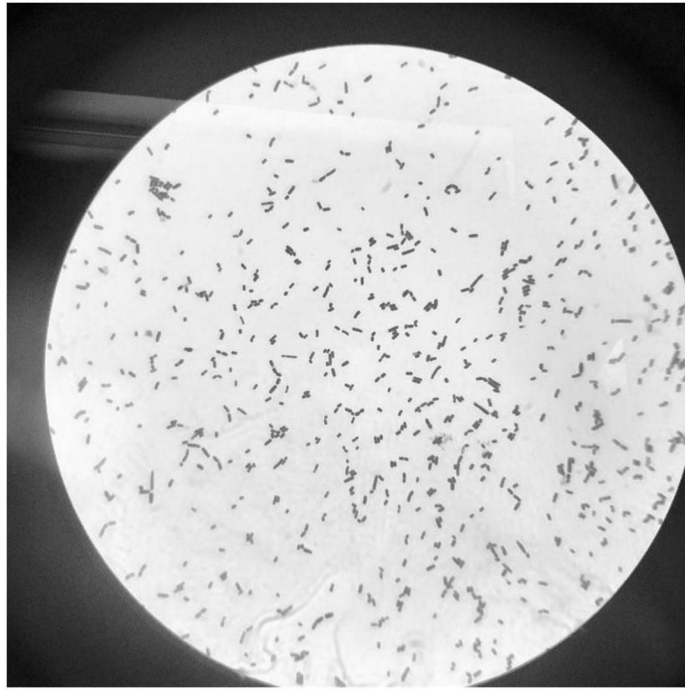


图1

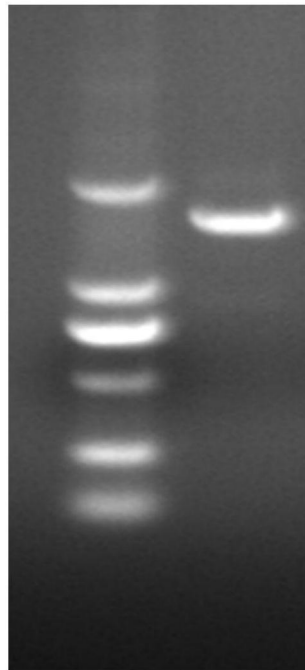


图2

维生素B12标准浓度曲线

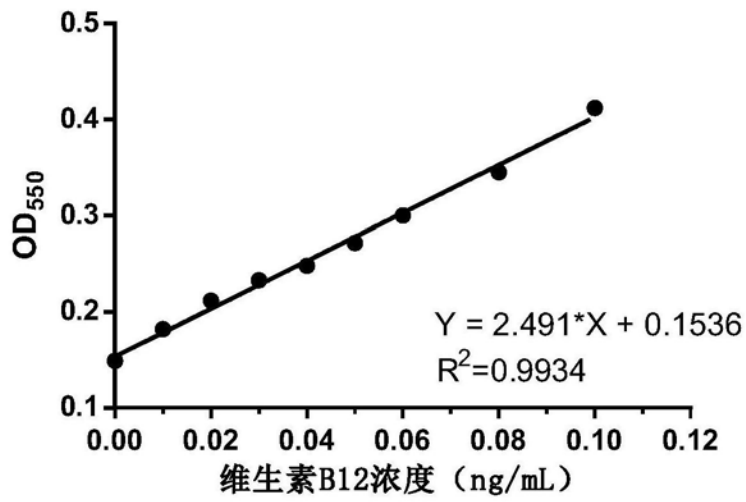


图3

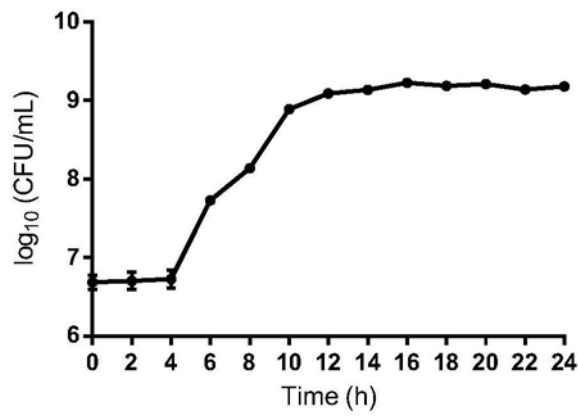
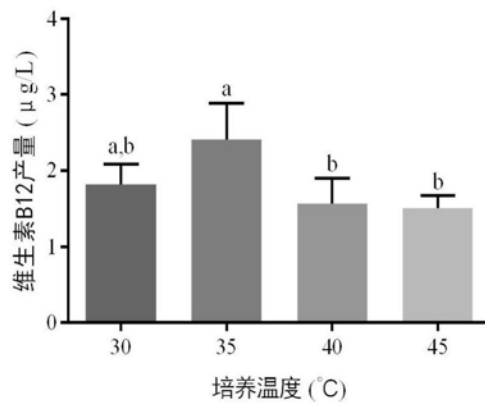


图4



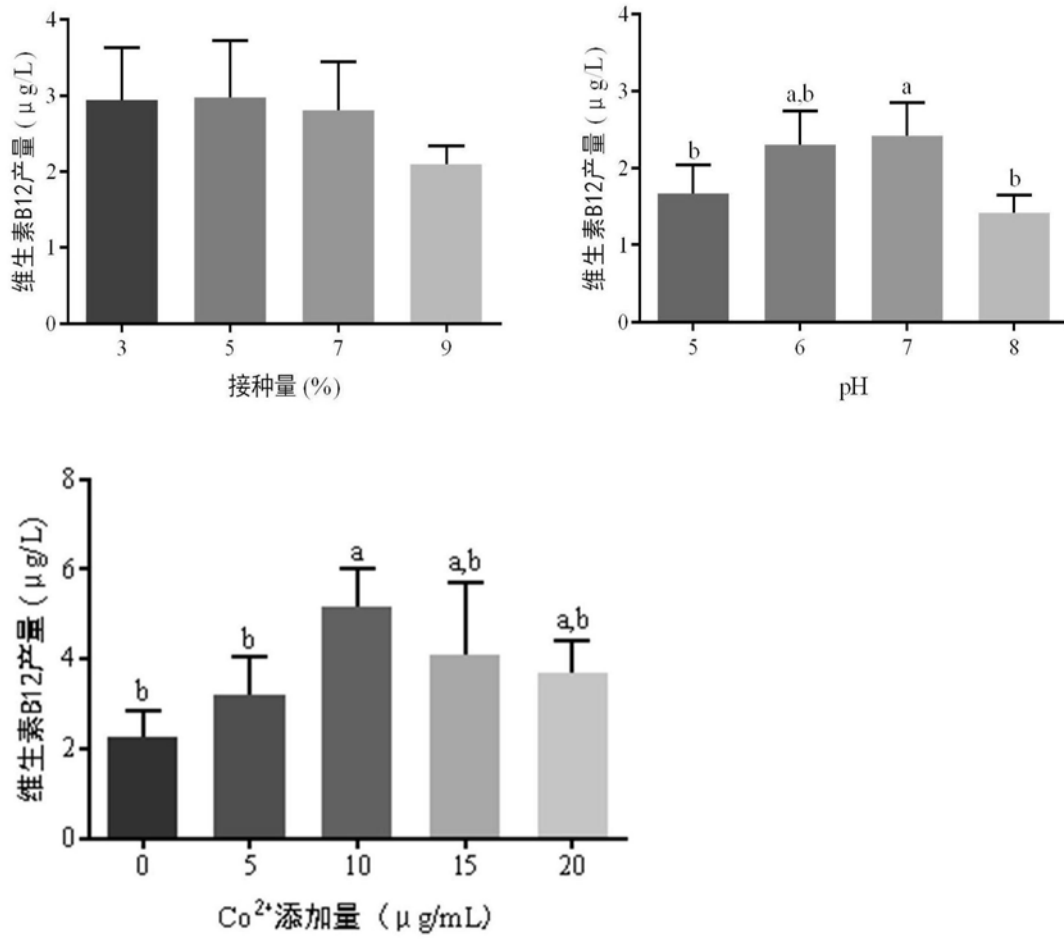


图5