



(21) 申请号 202410910610.9

(22) 申请日 2024.07.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 118497081 A

(43) 申请公布日 2024.08.16

(83) 生物保藏信息
CGMCC NO.30202 2024.03.29(73) 专利权人 云南大学
地址 650504 云南省昆明市呈贡区大学城
东外环南路云南大学

(72) 发明人 陈大华 储晓 孙钦秒 章文信

(74) 专利代理机构 北京利行天下专利代理有限公司 16225
专利代理师 邓琪

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 118421542 A, 2024.08.02

审查员 周小路

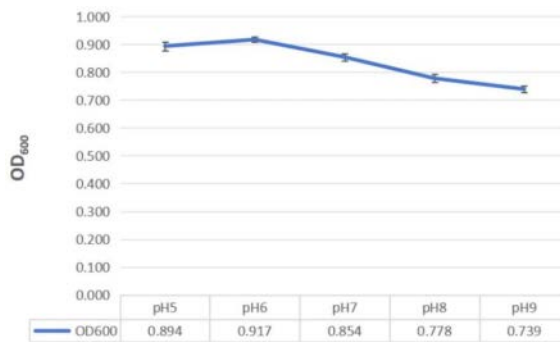
权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种发酵粘液乳杆菌IOBRA9848及其分离方法和应用

(57) 摘要

本发明属于微生物技术领域,提供了一种发酵粘液乳杆菌IOBRA9848及其分离方法和应用,所述菌株已在2024年3月29日依照规定程序成功保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,并被赋予保藏编号CGMCC No.30202;该菌株源自健康人体肠道,具有分泌胆盐水解酶的能力,能够有效降低胆固醇;本发明的菌株因其BSH活性和抗氧化特性,在降低胆固醇水平和抗衰老方面具有潜在的应用价值,此外,该菌株还可作为益生菌的候选菌株,用于开发新型的益生菌产品,如发酵乳制品、健康补充剂等,有助于促进人体健康和改善肠道微生态平衡;本发明的发酵粘液乳杆菌不仅在生物医学领域具有潜在的应用价值,而且在开发新型益生菌产品方面展现了广阔的应用前景。



1. 一种健康人肠道来源细菌, 其特征在于: 所述细菌被鉴定为发酵粘液乳杆菌 (*Limosilactobacillus fermentum*) IOBRA9848, 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为CGMCC No.30202, 保藏日期为2024年3月29日。

一种发酵粘液乳杆菌IOBRA9848及其分离方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,具体地说是一种发酵粘液乳杆菌IOBRA9848及其分离方法和应用。

背景技术

[0002] 发酵粘液乳杆菌(*Limosilactobacillus fermentum*)是一类归属于乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)的益生菌,广泛存在于酸奶、乳酪等发酵食品中。在人体口腔、肠道等部位中也可分离到该类群,研究表明该类群在人体中起到重要作用,如抑制病原菌从而维持菌群平衡等,其代谢产物也影响人体中多种代谢。

[0003] 胆固醇是人体内一种重要的脂质成分,是维持人体正常生理功能所必需的,但其过量的摄入可能导致多种心血管疾病。在当今社会中,心血管疾病等慢性疾病的发病率不断上升,而胆固醇的代谢水平异常是这些疾病的主要危险因素之一。传统药物依赖型的降胆固醇方法的长期使用,导致其可能会伴随一系列的副作用。因此,寻找天然、安全的降胆固醇益生菌为当前健康研究的焦点之一。

[0004] 研究表明,乳酸菌降低胆固醇的作用机制主要包括共沉淀作用、同化作用及胆盐水解酶作用。本专利所述的发酵粘液乳杆菌可通过分泌胆盐水解酶(Bile salt hydrolytic activity, BSH)的方式降低胆固醇水平,其产生的BSH对6种胆盐均有较好的降解作用。该菌株不仅在降胆固醇方面表现出色,还展现出了抗氧化活性,主要表现在其具有较强的DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)及羟清除能力。研究表明,氧化应激与多种慢性疾病的发生密切相关,而抗氧化作用则能够中和自由基,减缓细胞老化,降低患病风险。因此,抗氧化作用也是评价食品和保健品品质的重要标准之一。

[0005] 为此,本领域技术人员提出了一种发酵粘液乳杆菌IOBRA9848及其分离方法和应用,提供的发酵粘液乳杆菌菌株因其降胆固醇及抗氧化作用,其相关制品在食品、药品方面具有广泛的应用前景。

发明内容

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种发酵粘液乳杆菌IOBRA9848及其分离方法和应用,旨在至少一定程度上解决现有技术中存在的技术问题中的至少之一。

[0007] 一种发酵粘液乳杆菌,包括菌株,为一种微生物,所述菌株被鉴定为发酵粘液乳杆菌IOBRA9848,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No. 30202,保藏日期为2024年3月29日。

[0008] 优选的,所述微生物具有如SEQ ID No:1所示的16S rRNA基因序列。

[0009] 优选的,所述菌株能够分泌胆盐水解酶(BSH),且对于多种胆盐均有较强的水解活力。

[0010] 优选的,所述菌株对自由基DPPH有较强的清除能力。

[0011] 优选的,一种发酵液或菌悬液,由微生物制备而来。

[0012] 优选的,本发明筛选出一株具有BSH活性、可降解胆固醇、具有一定肠胃耐受性的非溶血发酵粘液乳杆菌IOBRA9848。

[0013] 本发明第一方面涉及的发酵粘液乳杆菌分离自健康人肠道样品,对其进行了16S rRNA基因比对,鉴定结果表明其属于发酵粘液乳杆菌。

[0014] 保藏信息:

[0015] 菌株名称:发酵粘液乳杆菌*Limosilactobacillus fermentum* IOBRA9848

[0016] 保藏日期:2024年3月29日

[0017] 保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

[0018] 保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号

[0019] 保藏编号:CGMCC No.30202;

[0020] 本发明所分离得到的微生物发酵粘液乳杆菌IOBRA9848的16S rRNA基因核苷酸序列为SEQ ID No:1所示。

[0021] 本发明涉及一种从健康人肠道中分离得到的发酵粘液乳杆菌IOBRA9848,该菌株具有显著的胆盐水解酶(BSH)产生能力和抗氧化特性,适用于生物医学研究及益生菌产品的开发。

[0022] 本发明第一方面涉及的发酵粘液乳杆菌的分离;本发明的菌株通过精心设计的分离程序从健康成年人的肠道样本中分离得到;分离中采用了MRS培养基,该培养基适于乳酸菌的生长,能够为菌株提供最佳的生长条件;分离得到的菌株经过16S rRNA基因序列分析,确认为发酵粘液乳杆菌,确保了菌株的准确性和纯度。

[0023] 本发明所分离得到的微生物发酵粘液乳杆菌IOBRA9848的16S rRNA基因核苷酸为SEQ ID No:1所示,该菌株已提交中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.30202。

[0024] 本发明第二方面涉及发酵粘液乳杆菌IOBRA9848的BSH活性验证。将该菌株在与不同种类胆盐共同孵育,并通过测定胆盐的降解产物来评估BSH活性。结果显示,该菌株能够对包括牛磺酸胆盐、甘氨酸胆盐等在内的六种胆盐表现出显著的降解作用,证实了其BSH活性。

[0025] 本发明第三方面涉及发酵粘液乳杆菌IOBRA9848的抗氧化能力评估。将该菌株与DPPH在室温温度下遮光反应30min,并通过紫外-可见光谱光度计测定DPPH的吸光度变化。实验结果表明,该菌株培养液能够显著降低DPPH的吸光度,表明其具有强大的自由基清除能力。

[0026] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0027] 该菌株源自健康人体肠道,具有分泌胆盐水解酶的能力,能够有效降低胆固醇;本发明的菌株因其BSH活性和抗氧化特性,在降低胆固醇水平和抗衰老方面具有潜在的应用价值,此外,该菌株还可作为益生菌的候选菌株,用于开发新型的益生菌产品,如发酵乳制品、健康补充剂等,有助于促进人体健康和改善肠道微生态平衡;本发明的发酵粘液乳杆菌不仅在生物医学领域具有潜在的应用价值,而且在开发新型益生菌产品方面展现了广阔的应用前景。

附图说明

[0028] 图1为依据16SrRNA基因序列构建的本发明发酵粘液乳杆菌IOBRA9848及部分相关菌株的系统发育树图；

[0029] 图2为本发明的发酵粘液乳杆菌IOBRA9848对胆酸盐的降解测定和自由基清除能力测定示意图,其中,A为对6种胆酸盐的降解测定示意图,其中,①为牛磺脱氧胆酸盐(TCD)、②为牛磺胆酸盐(TC)、③为甘氨酸脱氧胆酸盐(GCD)、④为甘氨酸胆酸盐(GC)、⑤为牛磺鹅脱氧胆酸盐(TCDC)、⑥为甘氨酸鹅脱氧胆酸盐(GCDC)图;其中,B为自由基清除能力测定示意图;

[0030] 图3为本发明的发酵粘液乳杆菌IOBRA9848在不同温度梯度下的生长状况图;

[0031] 图4为本发明的发酵粘液乳杆菌IOBRA9848在不同pH下的生长状况图;折线图中标注为标准误差;

[0032] 图5为本发明的发酵粘液乳杆菌IOBRA9848在有氧及低氧情况下的生长图;其中A为发酵粘液乳杆菌IOBRA9848在有氧及低氧情况下测量的OD₆₀₀值示意图,其中,标注为标准误差;B为发酵粘液乳杆菌IOBRA9848在厌氧及有氧条件下的生长情况示意图。

具体实施方式

[0033] 下面结合附图和实施例对本发明的实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不能用来限制本发明的范围。

[0034] 实施例1

[0035] 发酵粘液乳杆菌IOBRA9848的分离、培养与鉴定

[0036] 收取近三个月内无消化道疾病,未使用过抗生素及未补充过益生菌制品健康志愿者粪便样品;将1g粪便样品加入9mL无菌PBS缓冲液中摇匀;继续梯度稀释,并取0.1mL稀释为10⁻⁴、10⁻⁵及10⁻⁶倍样品涂布于MRS平板培养基上,37°C下培养5天;分离平板上长出菌落后挑取至新鲜MRS平板培养基上进行后续纯化;纯化后的菌株进行16S rRNA基因扩增,测序获得的序列在Ezbiocloud数据库中进行比对(数据库版本:2023.08.23),结果表明其属于发酵粘液乳杆菌,该菌株在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.30202;从Ezbiocloud数据库中选取50条与发酵粘液乳杆菌IOBRA9848的16S rRNA基因序列最相近的序列,采用最大似然法进行建树,中点赋根法定根;发酵粘液乳杆菌IOBRA9848的16S rRNA基因序列构建的系统发育如附图1所示;

[0037] 发酵粘液乳杆菌IOBRA9848的16S rRNA基因序列(SEQ ID No:1)如下:

[0038] GGCCTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGG
CCCATACTCCTACGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAG
TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACG
GTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAT
TTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCAT
CGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGA
AGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCT
AACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAG

CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCCTAGAG
ATAGGGCGTTTTCTTCGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGAC
AAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAC
GGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAAC
TCGCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCTAAGG
TGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT;

[0039] 实施例2

[0040] 发酵粘液乳杆菌IOBRA9848降解胆盐测定

[0041] 采用含有0.5%(wt/vol)的牛磺脱氧胆酸钠的MRS液体培养基培养发酵粘液乳杆菌IOBRA9848;接种比例为2%,培养温度为37°C,培养时间为24h;以12,000rpm,4°C离心30min收集细胞,并用0.1M的PBS缓冲液洗涤两次,重悬后获得OD600=10.0的细菌悬液;将100 μ L该细菌悬液与100 μ L(20mmol/L)胆酸盐在37°C下孵育30分钟;之后立即加入200 μ L的15% TCA(w/v)终止反应,在1200 rpm下离心15min;取出200 μ L上清液,加入1mL显色液,沸水浴14min,冷却2min后加入1mL 95%的乙醇;分别以甘氨酸及牛磺酸作为标准曲线,在570nm处测定吸光度;标准曲线浓度(μ M)为0、0.2、0.4、0.6、0.8及1.0;酶活($\text{umol} \cdot \text{min}^{-1}$)=[aa(mM)] \cdot V反应液体积(mL)/0.3(mL) \cdot 30(min);一个单位的BSH活性(U/mL)定义为每OD600每分钟从底物中释放1 μ mol氨基酸的酶量;

[0042] 结果表明,菌株IOBRA9848对6种胆盐均有较明显的降解作用(如图2中A),该菌株的甘氨酸胆酸盐(GC)、甘氨酸脱氧胆酸盐(GCD)、甘氨酸鹅脱氧胆酸盐(GCDC)、牛磺胆酸盐(TC)、牛磺脱氧胆酸盐(TCD)及牛磺鹅脱氧胆酸盐(TCDC)胆酸盐水解酶的酶活($\text{umol} \cdot \text{min}^{-1}$)分别为:5.165 \pm 0.351、5.296 \pm 0.093、5.560 \pm 0.382、6.381 \pm 0.658、5.501 \pm 0.290、5.351 \pm 0.077。

[0043] 实施例3

[0044] 发酵粘液乳杆菌IOBRA9848自由基清除能力测定

[0045] 将发酵粘液乳杆菌接种于MRS液体培养基中培养24h后,8,000rpm,4°C离心10min收集菌体;用无菌生理盐水清洗菌体两次后重悬,以获得600nm处的光密度为5.0的细菌悬液;取2mL待测菌株的生理盐水悬浮液,加入2mL DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)自由基溶液,混合均匀;置于室温温度下遮光反应30min,然后在转速8,000r/min下离心10min,取上清部分,测定样品在波长517nm处的吸光度;空白对照组样品以等体积无水乙醇代替样品溶液;清除率(%)为对照组减去样品组的吸光值,再比上对照组吸光值;

[0046] 菌株IOBRA9848的自由基DPPH清除测定的颜色反应如图2中B所示,清除率为47.9%。

[0047] 实施例4

[0048] 发酵粘液乳杆菌IOBRA9848的最适温度耐受测定

[0049] 将菌株划线接种于新鲜配制的MRS平板,并将该平板置于15°C、30°C、37°C及45°C培养24h,观察并记录菌株的生长情况;如图3所示,在37°C时菌株展示出最佳生长状态,但在45°C也可生长。

[0050] 实施例5

[0051] 发酵粘液乳杆菌IOBRA9848的最适pH耐受测定

[0052] 将活化的菌液按照2%的接种量,分别接入pH=5、pH=6、pH=7、pH=8及pH=9的MRS液体培养基中,37°C,200rpm摇床培养12h,用酶标仪测定OD600;如图4所示,菌株在5个pH条件下均保持了一定的活力,最适pH为6。

[0053] 实施例6

[0054] 发酵粘液乳杆菌IOBRA9848在有氧及低氧条件下的培养

[0055] 用一次性接种环蘸取MRS琼脂上的单菌落,接入MRS液体培养基中,摇晃均匀,放入37°C,200rpm摇床培养至OD600达到0.8-1.0范围;取2%的接种量接入到MRS液体培养基中,并在有氧及低氧条件下培养,放入摇床,37°C,200rpm培养,每隔4h取出用酶标仪测定OD600,并取培养8h的菌液画线涂布于MRS平板上,分别置于厌氧培养箱及普通恒温培养箱下培养24h;低氧液体培养基的制备:称取适量MRS broth粉末溶解并加热煮沸,将氮气通入该培养液充气20min;于厌氧箱中将培养液分装于Hungate厌氧管,后将该管置入高压灭菌锅中121°C灭菌20min;低氧固体培养基的制备:待MRS agar制备完成后,将其放置在厌氧操作台上,平衡3天后方可用于实验;如图5(A和B)所示,该菌株在两种培养条件下均展示出基本一致的生长曲线,表明其在厌氧及有氧条件下均能正常生长,具有良好适应性。

[0056] 本发明的实施例是为了示例和描述起见而给出的,尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

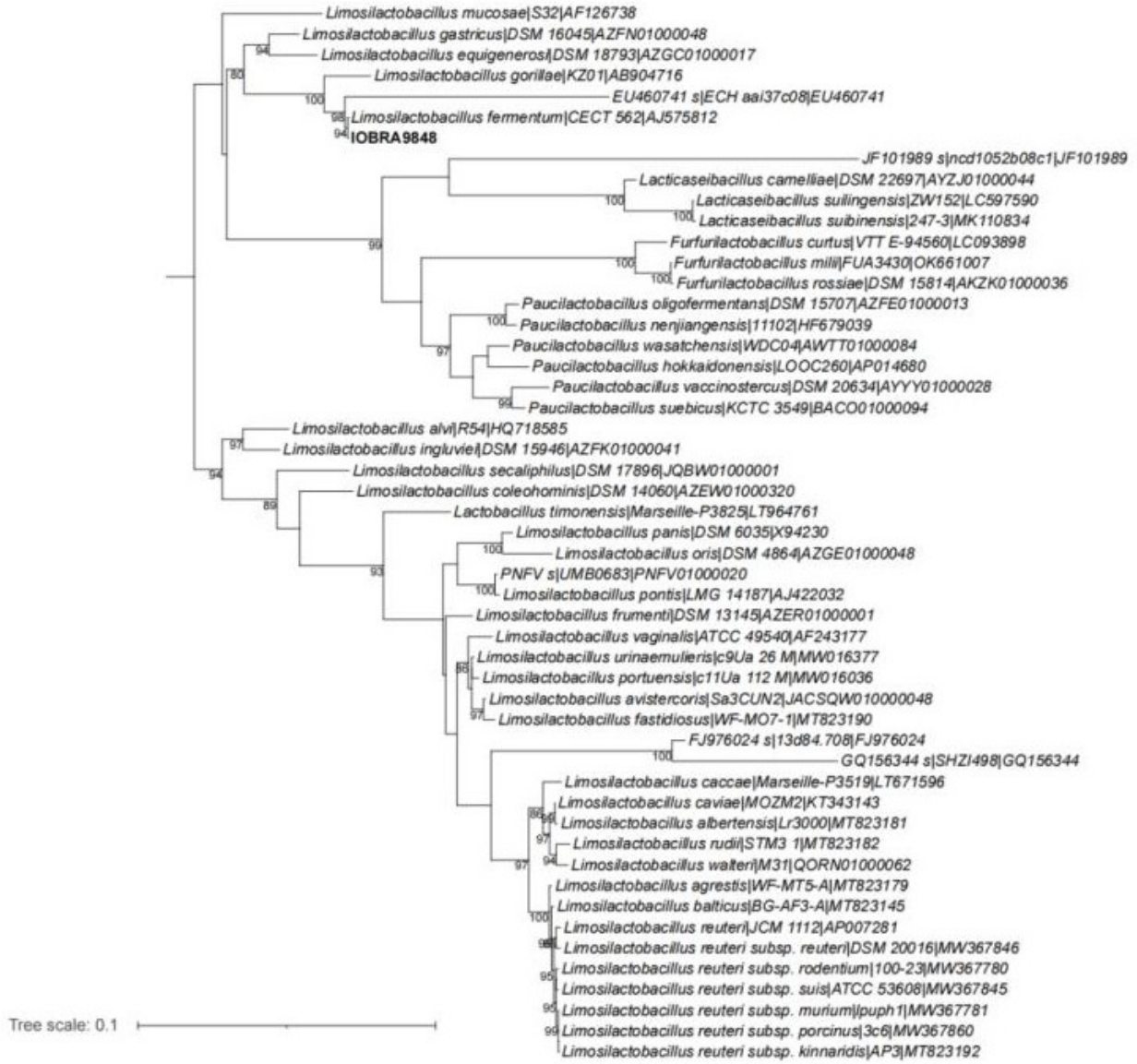


图 1

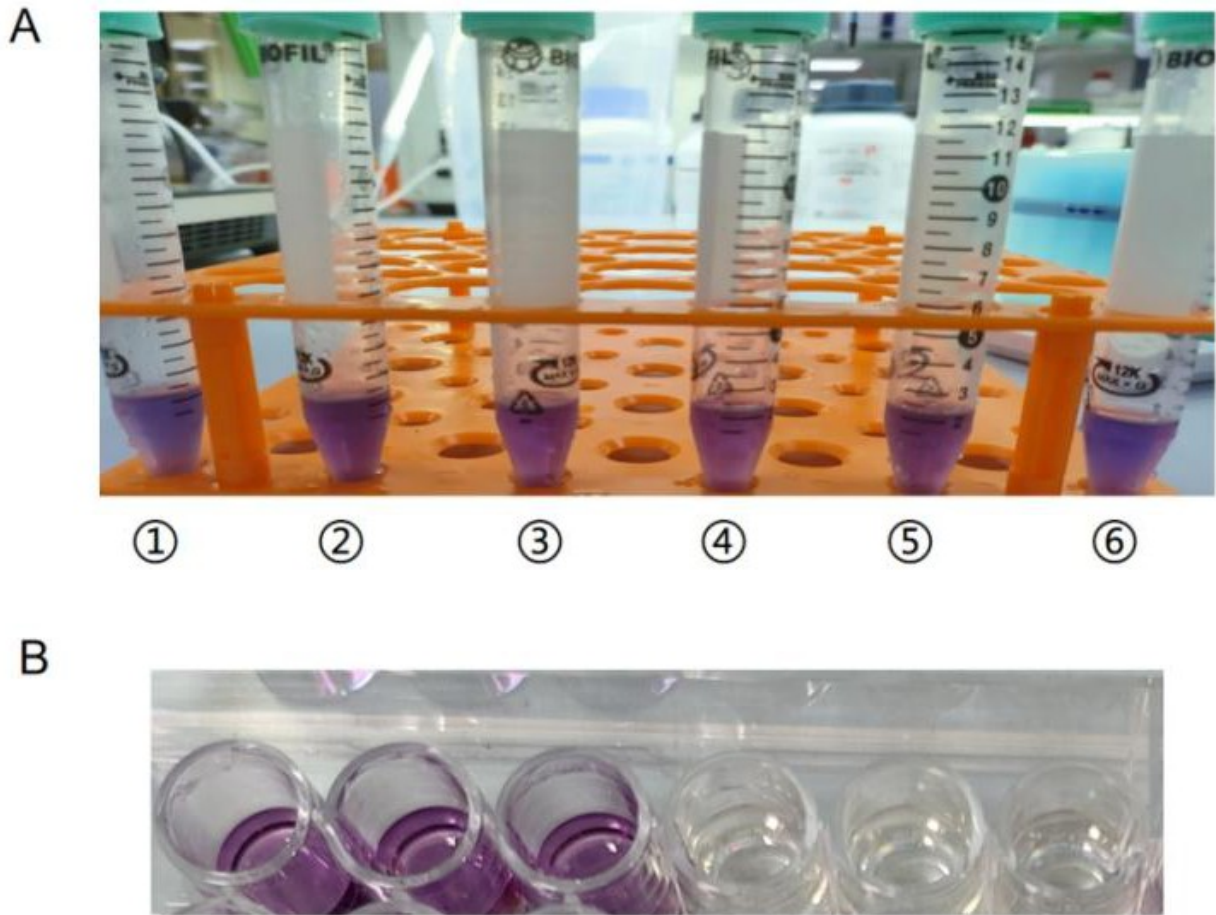


图 2

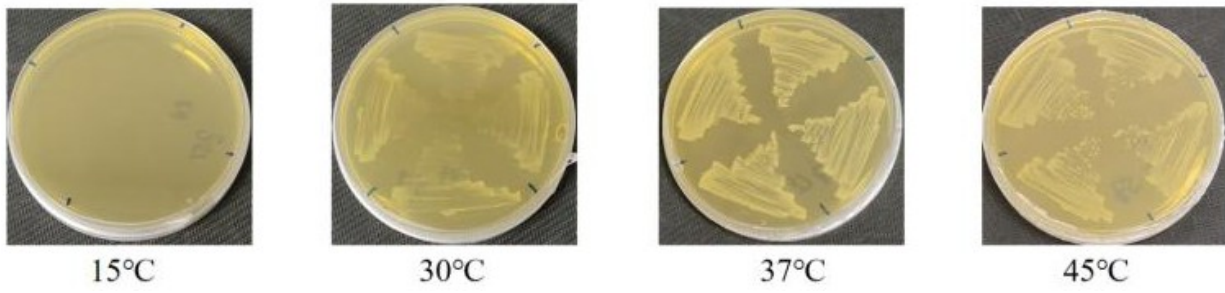


图 3

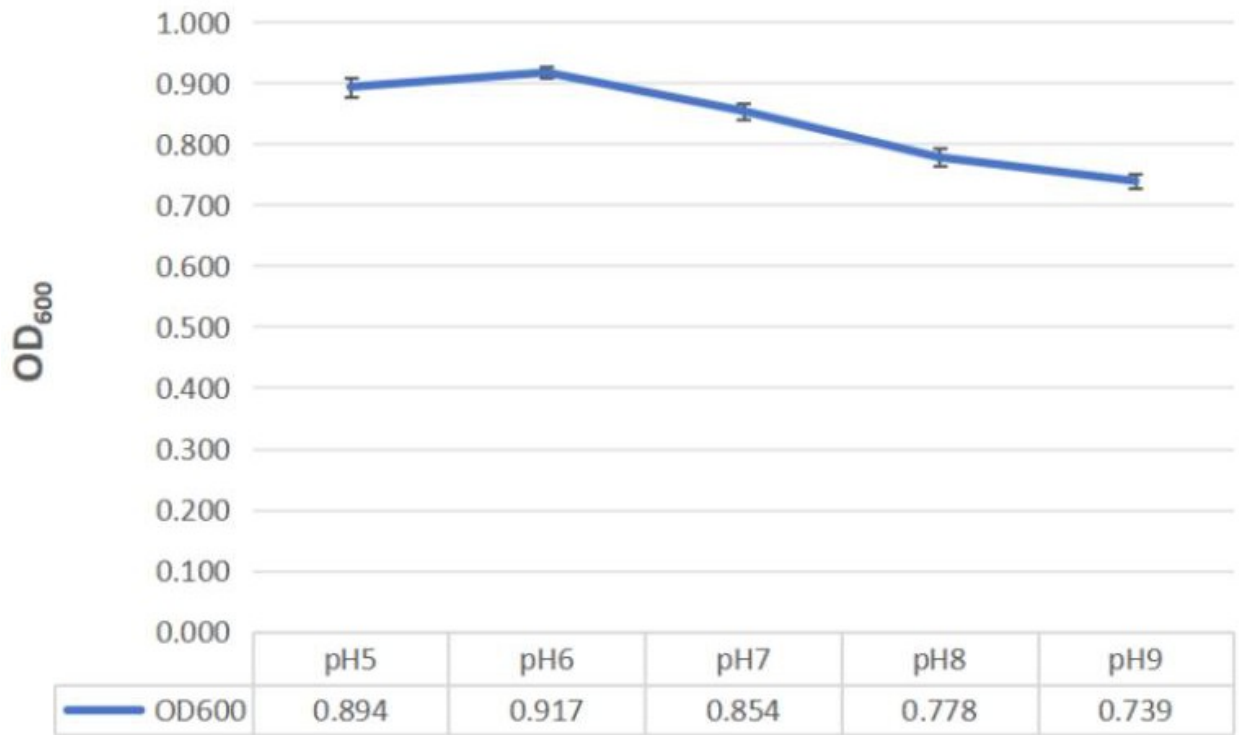
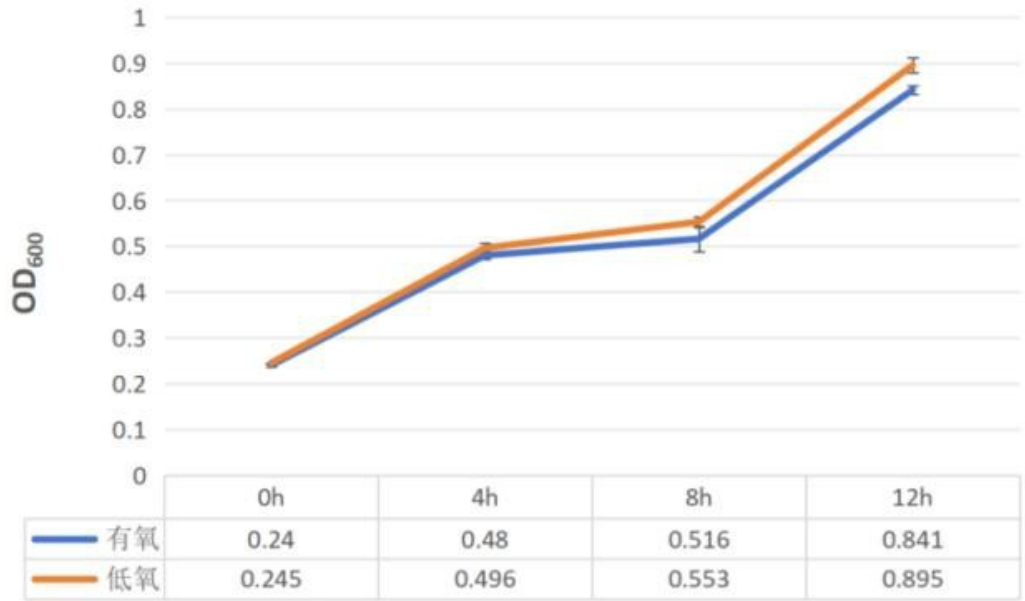
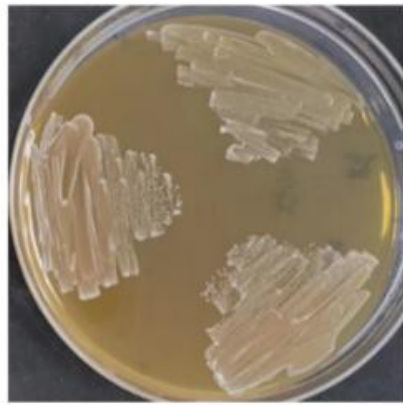


图 4

A



B



有氧



低氧

图 5