



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110846229 A

(43)申请公布日 2020.02.28

(21)申请号 201911316054.8

(22)申请日 2019.12.19

(71)申请人 广州傲农生物科技有限公司

地址 511300 广东省广州市增城区朱村街
南岗村(缸瓦匠)路

(72)发明人 张诗 张志榕 兰玉华 杨伟春
周通 吴有林

(74)专利代理机构 北京超成律师事务所 11646
代理人 董佳

(51) Int. Cl.

C12N 1/04(2006.01)

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/07(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

(54)发明名称

一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法和保藏剂

(57)摘要

本发明公开了一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法和保藏剂。该保藏方法包括将形成有芽孢的凝结芽孢杆菌菌液与保藏剂混合保藏,所述保藏剂包括0.35~1g/mL还原剂、20~40g/mL保护剂、5~12g/mL蔗糖和5~8g/mL填充剂,提高了凝结芽孢杆菌自身的抗逆性,同时配合保藏剂的使用,有效延长了凝结芽孢杆菌的保藏质量和保藏时限。

1. 一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,其特征在于,其包括将凝结芽孢杆菌与保藏剂混合保藏;

所述凝结芽孢杆菌为形成含有芽孢的菌液;

所述保藏剂包括以下组分:0.35~1g/mL还原剂、5~8g/mL填充剂、5~12g/mL蔗糖、以及20~40g/mL保护剂。

2. 根据权利要求1所述的提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,其特征在于,所述保藏剂包括以下组分:0.45~0.65g/mL还原剂、5~7g/mL填充剂、5~8g/mL蔗糖、以及30~40g/mL保护剂。

3. 根据权利要求1所述的提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,其特征在于,所述填充剂包括甘露醇;

优选地,所述保护剂包括甘油和/或海藻糖;

优选地,所述还原剂为半胱氨酸盐酸盐、维生素D、硫代硫酸钠和乙二胺四乙酸中的至少一种;

优选地,所述还原剂为半胱氨酸盐酸盐。

4. 根据权利要求1所述的提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,其特征在于,所述菌液与所述保藏剂按(0.5~1.5):1的体积比混合。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,其特征在于,所述含有芽孢的菌液中芽孢的体积百分比为70%~90%。

6. 根据权利要求5所述的提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,其特征在于,所述形成含有芽孢的菌液的培养条件为:37~40℃,180~200r/min摇床培养3~7d。

7. 根据权利要求5所述的提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,其特征在于,所述菌液的培养基为MRS液体培养基。

8. 根据权利要求7所述的提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,其特征在于,所述MRS液体培养基包括:10~14g/L蛋白胨、10~14g/L牛肉膏、3~8g/L酵母粉、15~25g/L葡萄糖、3~8g/L乙酸钠、1~3g/L柠檬酸二铵、0.5~1.5g/L Tween80、1~3g/L K_2HPO_4 、0.38~0.88g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和0.1~0.5g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ 。

9. 根据权利要求5所述的提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,其特征在于,所述菌液为将形成芽孢的菌液离心后制得;

优选地,所述离心的条件为4000~6000r/min,4℃离心10~15min;

优选地,所述菌液为将形成芽孢的菌液离心洗脱后制得的菌悬液;

优选地,所述洗脱的条件为:采用离心后菌泥体积45~55倍的生理盐水洗脱离心后的菌泥。

10. 一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏剂,其特征在于,所述保藏剂包括以下组分:0.35~1g/mL还原剂、5~8g/mL填充剂、5~12g/mL蔗糖、以及20~40g/mL保护剂;

优选地,所述保藏剂按包括以下组分:0.45~0.65g/mL还原剂、5~7g/mL填充剂、5~8g/mL蔗糖、以及30~40g/mL保护剂;

优选地,所述填充剂包括甘露醇;

优选地,所述保护剂包括甘油和/或海藻糖;

优选地,所述还原剂为半胱氨酸盐酸盐、维生素D、硫代硫酸钠和乙二胺四乙酸中的至

少一种；

优选地,所述还原剂为半胱氨酸盐酸盐。

一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法和保藏剂

技术领域

[0001] 本发明涉及凝结芽孢杆菌技术领域,具体而言,涉及一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法和保藏剂。

背景技术

[0002] 益生菌通过抑制胃肠道病原菌,维持菌群生态平衡来发挥益生作用,安全无害,是运用较广的产品之一。

[0003] 凝结芽孢杆菌是一种革兰氏阳性菌,胞体呈杆状,两端钝圆,单个、成对或短链状,无鞭毛,芽孢端生,兼性厌氧,能分解糖类生成乳酸。菌体生长的最适温度为37℃~45℃,最适pH为6.6-7.0。其不但具有乳酸菌和双歧杆菌的益生作用,还具有芽孢杆菌的显著特点:耐高温,耐酸,耐胆盐。

[0004] 由于其兼具乳酸菌和芽孢菌共同的特点,以及良好的安全性,凝结芽孢杆菌被越来越广泛的应用于畜牧行业中。

[0005] 冷冻干燥是生产益生菌发酵剂最常用的工艺,但大多数益生菌在冷冻和干燥后其正常的生理功能和代谢活性会遭受不同程度的损伤,导致细胞活性和发酵活力下降甚至丧失。

[0006] 鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法和保藏剂。该保藏方法将形成有芽孢的凝结芽孢杆菌进行保藏,同时配合保藏剂的使用,能有效延长凝结芽孢杆菌的保藏质量和保藏时限。

[0008] 本发明是这样实现的:

[0009] 第一方面,本发明实施例提供一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,其包括将凝结芽孢杆菌与保藏剂混合保藏;

[0010] 所述凝结芽孢杆菌为形成含有芽孢的菌液;

[0011] 所述保藏剂包括以下组分:0.35~1g/mL还原剂、5~8g/mL填充剂、5~12g/mL蔗糖、以及20~40g/mL保护剂。

[0012] 目前,保藏凝结芽孢杆菌的方法是通常将凝结芽孢杆菌于琼脂平板培养24h~48h,再收集菌株,直接用一定浓度的甘油与菌株混合均匀后放入-20℃条件下冷藏。

[0013] 而在本申请中,首先将凝结芽孢杆菌培养成包含有芽孢的菌液后,再进行保藏,利用芽孢自身的抗逆性,延长凝结芽孢杆菌在低温环境的保藏时限。同时,保藏时配合采用本申请提供的保藏剂。

[0014] 保藏剂中的还原剂,能消耗培养基中的氧气,使菌体处于厌氧状态,减少菌体的氧化作用;保藏剂中的保护剂具有亲水性,可通过氢和离子键对水和细胞所产生的亲和力来稳定细胞成分的构型,以防止因冷冻或水分不断升华对细胞的损害。而填充剂在慢速冻结

时会结晶,从而为细胞提供支撑结构,且不会与细胞内活性组分发生反应。

[0015] 在可选的实施方式中,所述保藏剂包括以下组分:0.45~0.65g/mL还原剂、5~7g/mL填充剂、5~8g/mL蔗糖、以及30~40g/mL保护剂。在该组分配比下,能进一步延长凝结芽孢杆菌的保藏质量,保持凝结芽孢杆菌冷藏后的生理功能和代谢活性,有效延缓冷藏后细胞活性和发酵活力的丧失或下降。

[0016] 在可选的实施方式中,所述填充剂包括甘露醇。

[0017] 优选地,所述保护剂包括甘油和/或海藻糖。

[0018] 在可选的实施方式中,所述还原剂为半胱氨酸盐酸盐、维生素D、硫代硫酸钠和乙二胺四乙酸中的至少一种。

[0019] 在可选的实施方式中,所述还原剂为半胱氨酸盐酸盐。

[0020] 在可选的实施方式中,所述菌液与所述保藏剂按(0.5~1.5):1的体积比混合。

[0021] 在可选的实施方式中,所述含有芽孢的菌液中芽孢的体积百分比为70%~90%。

[0022] 在可选的实施方式中,所述形成含有芽孢的菌液的培养条件为:37~40℃、180~200r/min摇床培养3~7d。

[0023] 在可选的实施方式中,所述菌液的培养基为MRS液体培养基。

[0024] 在可选的实施方式中,所述MRS液体培养基包括:10~14g/L蛋白胨、10~14g/L牛肉膏、3~8g/L酵母粉、15~25g/L葡萄糖、3~8g/L乙酸钠、1~3g/L柠檬酸二铵、0.5~1.5g/L Tween80、1~3g/L K_2HPO_4 、0.38~0.88g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和0.1~0.5g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ 。

[0025] 在可选的实施方式中,所述菌液为将上述形成芽孢的菌液离心后制得。

[0026] 在可选的实施方式中,所述离心的条件为4000~6000r/min,4℃离心10~15min;

[0027] 在可选的实施方式中,所述菌液为将形成芽孢的菌液离心洗脱后制得的菌悬液;

[0028] 在可选的实施方式中,所述洗脱的条件为:采用离心后菌泥体积45~55倍的生理盐水洗脱离心后的菌泥。

[0029] 第二方面,本发明实施例还提供了一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏剂,所述保藏剂包括以下组分:0.35~1g/mL还原剂、5~8g/mL填充剂、5~12g/mL蔗糖、以及20~40g/mL保护剂。具体地,该保藏剂同上述任一实施方式所述保藏方法中的保藏剂,在此不再赘述。

[0030] 本发明具有以下有益效果:

[0031] 本发明实施例提供了一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法和保藏剂。该保藏方法包括将形成有芽孢的凝结芽孢杆菌菌液与保藏剂混合保藏,提高了凝结芽孢杆菌自身的抗逆性,同时配合保藏剂的使用,保藏剂中的还原剂能消耗培养基中的氧气,使菌体处于厌氧状态,减少菌体的氧化作用;保藏剂中的保护剂具有亲水性,可通过氢和离子键对水和细胞所产生的亲和力来稳定细胞成分的构型,以防止因冷冻或水分不断升华对细胞的损害;而填充剂在慢速冻结时会结晶,从而为细胞提供支撑结构,且不会与细胞内活性组分发生反应,有效延长了凝结芽孢杆菌的保藏质量和保藏时限。

具体实施方式

[0032] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建

议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0033] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0034] 实施例1

[0035] 一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,其包括以下步骤:

[0036] (1) 凝结芽孢杆菌菌悬液的制备:

[0037] 将分纯且复壮好的凝结芽孢杆菌接种于MRS液体培养基(组成如表1所示)中,接种量为5%,于40℃、200r/min摇床培养5d,镜检菌液可见视野中芽孢率达80%以上,则该菌液状态可待保存。

[0038] 表1 MRS液体培养基

| 组分 | (g/L) |
|-----|-------|
| 蛋白胨 | 10.00 |

| | |
|--------------------------------------|-------|
| 牛肉膏 | 10.00 |
| 酵母粉 | 5.00 |
| 葡萄糖 | 20.00 |
| 乙酸钠 | 5.00 |
| 柠檬酸二铵 | 2.00 |
| Tween80 | 1.00 |
| K ₂ HPO ₄ | 2.00 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.58 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 0.25 |

[0041] 将得到的形成有大量芽孢的菌液进行离心,离心条件为4000r/min,4℃离心10min;然后采用菌泥体积50倍的0.85%无菌生理盐水将菌泥洗脱,制得凝结芽孢杆菌的菌悬液。

[0042] (2) 保藏剂的制备:

[0043] 保藏剂的组分由表2所示。

[0044] 表2 保藏剂的组成

| 组分 | (g/mL) |
|---------|--------|
| 甘油 | 40.00 |
| 蔗糖 | 5.00 |
| 甘露醇 | 6.00 |
| 半胱氨酸盐酸盐 | 0.50 |

[0046] (3) 将形成芽孢的凝结芽孢杆菌的菌悬液与保藏剂混合保藏:

[0047] 将步骤(1)制备的菌悬液与步骤(2)制备的保藏剂按照体积比为1:1混合,然后分装于冻存管中,-20℃保存。

[0048] 实施例2

[0049] 本实施例提供了一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,保藏方法大致与实施例1相同,区别在于参数的不同,区别如下:

[0050] (1) 凝结芽孢杆菌菌悬液的制备:

[0051] 将分纯且复壮好的凝结芽孢杆菌接种于MRS液体培养基(组成如表1所示)中,接种量为10%,于40℃、200r/min摇床培养3d,镜检菌液可见视野中芽孢率达70%以上,则该菌液状态可待保存。

[0052] 实施例3

[0053] 本实施例提供了一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,保藏方法大致与实施例1相同,区别在于参数的不同,区别如下:

[0054] (1) 凝结芽孢杆菌菌悬液的制备:

[0055] 将分纯且复壮好的凝结芽孢杆菌接种于MRS液体培养基(组成如表1所示)中,接种量为5%,于40℃、200r/min摇床培养9d,镜检菌液可见视野中芽孢率达90%以上,则该菌液状态可待保存。

[0056] 实施例4

[0057] 本实施例提供了一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,保藏方法大致与实施例1相同,区别在于保藏剂的不同,区别如下:

[0058] 保藏剂包括:0.35g/mL半胱氨酸盐酸盐、20g/mL甘油、5g/mL甘露醇和5g/mL蔗糖。

[0059] 实施例5

[0060] 本实施例提供了一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,保藏方法大致与实施例1相同,区别在于保藏剂的不同,区别如下:

[0061] 保藏剂包括:1g/mL半胱氨酸盐酸盐、40g/mL甘油、8g/mL甘露醇和12g/mL蔗糖。

[0062] 实施例6

[0063] 本实施例提供了一种保藏方法,保藏方法大致与实施例1相同,区别在于培养基的不同,将MRS培养基替换为YPD培养基(胰蛋白胨20.00g/L,酵母粉10.00g/L,葡萄糖20.00g/L,琼脂粉20.00g/L,pH 7.2)。

[0064] 对比例1

[0065] 本实施例提供了一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,保藏方法大致与实施例1相同,区别在凝结芽孢杆菌的培养条件:

[0066] 凝结芽孢杆菌的培养条件为:将凝结芽孢杆菌于琼脂平板培养24h~48h,收集菌株。

[0067] 对比例2

[0068] 本实施例提供了一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,保藏方法大致与实施例1相同,区别在保藏剂的制备,区别为:保藏剂为甘油。

[0069] 对比例3

[0070] 本实施例提供了一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法,保藏方法大致与实施

例1相同,区别在于保藏剂的制备,区别如下:

[0071] 保藏剂中将甘油替换为同等质量的聚乙二醇。

[0072] 对比例4

[0073] 本实施例提供了一种保藏方法,保藏方法大致与实施例1相同,区别在于保藏剂的制备,区别如下:

[0074] 保藏剂中将半胱氨酸盐酸盐替换为同等质量的半胱氨酸。

[0075] 对比例5

[0076] 本实施例提供了一种保藏方法,保藏方法大致与实施例1相同,区别在于保藏剂的制备,区别如下:

[0077] 保藏剂中将甘露醇替换为同等重量份的甘油。

[0078] 验证例1

[0079] 验证本申请提供保藏方法对凝结芽孢杆菌存活率的影响。

[0080] 采用实施例1~6以及对比例1~5提供的保藏方法对于同一凝结芽孢杆菌(菌种保藏于福建傲农生物科技集团股份有限公司研究院动物保健研究所二楼菌种室)进行保藏。

[0081] 分别于第1天、第30天、第60天、第90天、第120天、第150天以及第180天对冷藏样品进行活菌计数,并计算存活率,结果如表3所示。

[0082] 表3 凝结芽孢杆菌存活率

| 项目天数 活菌量 (CFU/ml) | 第 1 天 | 第 30 天 | 第 60 天 | 第 90 天 | 第 120 天 | 第 150 天 | 第 180 天 |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 实施例 1 | 1.03×10^9 | 9.85×10^8 | 9.61×10^8 | 9.22×10^8 | 9.00×10^8 | 8.91×10^8 | 8.79×10^8 |
| 实施例 2 | 9.67×10^8 | 9.32×10^8 | 9.05×10^8 | 8.82×10^8 | 8.58×10^8 | 8.29×10^8 | 8.00×10^8 |
| 实施例 3 | 9.55×10^8 | 9.41×10^8 | 9.32×10^8 | 9.18×10^8 | 8.00×10^8 | 7.84×10^8 | 7.73×10^8 |
| 实施例 4 | 1.03×10^9 | 9.79×10^8 | 9.30×10^8 | 9.11×10^8 | 8.97×10^8 | 8.72×10^8 | 8.58×10^8 |
| 实施例 5 | 1.03×10^9 | 9.80×10^8 | 9.43×10^8 | 9.16×10^8 | 8.95×10^8 | 8.75×10^8 | 8.55×10^8 |
| 实施例 6 | 9.89×10^8 | 9.57×10^8 | 9.35×10^8 | 9.06×10^8 | 8.85×10^8 | 8.60×10^8 | 8.25×10^8 |
| 对比例 1 | 8.70×10^8 | 8.25×10^8 | 7.89×10^8 | 7.70×10^8 | 7.55×10^8 | 7.33×10^8 | 6.50×10^8 |
| 对比例 2 | 1.03×10^9 | 9.25×10^8 | 8.70×10^8 | 8.17×10^8 | 7.55×10^8 | 6.90×10^8 | 6.43×10^8 |
| 对比例 3 | 1.03×10^9 | 9.30×10^8 | 8.13×10^8 | 7.57×10^8 | 6.20×10^8 | 4.65×10^8 | 3.10×10^8 |
| 对比例 4 | 1.03×10^9 | 9.25×10^8 | 8.46×10^8 | 7.19×10^8 | 6.03×10^8 | 4.89×10^8 | 4.00×10^8 |
| 对比例 5 | 1.03×10^9 | 9.17×10^8 | 8.39×10^8 | 7.10×10^8 | 6.25×10^8 | 4.58×10^8 | 3.11×10^8 |

[0085] 由表3可知,实施例1~6所得实验结果均证明,在高芽孢率的情况下配合使用本发明实施例提供的保藏剂进行菌种冷冻保藏,能有效地长时间保证菌种的活菌量及活性不下降。

[0086] 对比例1~5从改变不同的培养基、保藏剂种类和组份等与本发明进行实验对比,其对菌种的保存效果均低于实施例1。可见,本发明提供的保藏方法及保藏剂能有效保持凝结芽孢杆菌在冷冻低温下的活力,其中,实施例1为最佳的保藏效果。

[0087] 综上,本发明实施例提供了一种提高凝结芽孢杆菌存活率的保藏方法和保藏剂,该保藏方法包括将形成有芽孢的凝结芽孢杆菌菌液与保藏剂混合保藏,提高了凝结芽孢杆菌自身的抗逆性,同时配合保藏剂的使用,保藏剂中的还原剂能消耗培养基中的氧气,使菌体处于厌氧状态,减少菌体的氧化作用;保藏剂中的保护剂具有亲水性,可通过氢和离子键对水和细胞所产生的亲和力来稳定细胞成分的构型,以防止因冷冻或水分不断升华对细胞的损害;而填充剂在慢速冻结时会结晶,从而为细胞提供支撑结构,且不会与细胞内活性组分发生反应,有效延长了凝结芽孢杆菌的保藏质量和保藏时限。

[0088] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。