



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103642716 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 19

(21) 申请号 201310587738. 8

A23L 1/29 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 11. 21

C12R 1/25 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 8072 2013. 08. 26

(71) 申请人 河北一然生物科技有限公司

地址 050800 河北省石家庄市中华北大街京
昆高速正定段出口西行 100 米鲲鹏路 1
号

(72) 发明人 赵林森 龄南 葛春美 马新颖
齐世华

(74) 专利代理机构 石家庄新世纪专利商标事务
所有限公司 13100

代理人 董金国 徐瑞丰

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006. 01)

A61K 35/74 (2006. 01)

A61P 1/00 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

A61P 3/06 (2006. 01)

A61P 37/04 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种植物乳杆菌及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种植物乳杆菌及其应用,具体涉及一种新的植物乳杆菌 LP45 (YMC1005),CGMCC NO. 8072 ;还涉及植物乳杆菌 LP45 在降低胆固醇、提高免疫力,抑制肠道有害菌方面的应用。

1. 一种植物乳杆菌 LP45,该植物乳杆菌已经于 2013 年 8 月 26 日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物菌种保藏中心进行了保藏,保藏号为 :CGMCC No. 8072。
2. 根据权利要求 1 所述的一种菌植物乳杆菌 LP45,其具有胃肠道吸附能力。
3. 根据权利要求 1 所述的一种菌植物乳杆菌 LP45,其具有抑制胃肠道致病菌的功能。
4. 根据权利要求 1 所述的一种菌植物乳杆菌 LP45,其具有降低胆固醇的功能。
5. 根据权利要求 1 所述的一种菌植物乳杆菌 LP45,其具有提高免疫力的功能。
6. 一种如权利要求 1-5 任一项所述的植物乳杆菌 LP45 的应用,其特征在于 :用于制备抑制胃肠道致病菌的药品或食品。
7. 一种如权利要求 1-5 任一项所述的植物乳杆菌 LP45 的应用,其特征在于 :用于制备降低动物或人类体内胆固醇浓度的药品或食品。
8. 一种如权利要求 1-5 任一项所述的植物乳杆菌 LP45 的应用,其特征在于 :用于制备提高免疫力的药品或食品。

一种植物乳杆菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种乳杆菌属的新菌株,更准确地说,本发明描述了植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的一个新菌株 LP45,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 益生菌对人类的健康有很大帮助,科学家们已对其进行了几十年的研究,现已证明在肠胃调节、抗氧化、降胆固醇、预防胃肠道癌症、免疫调节等方面均起到很好的作用。但是,益生菌的菌株种属范围非常广,即便同一种属的不同菌株之间个体差异都非常大,所以筛选工作非常困难,现在益生菌的应用中普遍存在摄入人体后生存率不高,对胃肠的吸附能力不强,在增强人体免疫力和抑制致病菌能力方面的表现不理想。因此,是否研究筛选到益生功能最优越的菌株作为益生菌应用就成为了如今益生菌研究的关键所在。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种商业编号为 LP45,保藏编号为 YMC1005 的植物乳杆菌,它具备在人体胃肠中具有很高的生存率、较强的胃肠粘附力,提高人体免疫力的功能,能显著抑制胃、肠道致病菌,具备降低胆固醇的潜力,另一方面提供上述新菌株的用途。

[0004] 为实现上述目的,本发明所采取的技术方案为:

一种植物乳杆菌 LP45,该植物乳杆菌已经于 2013 年 8 月 26 日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物菌种保藏中心进行了保藏,保藏号为 :CGMCC No. 8072。

[0005] 植物乳杆菌 LP45 具有胃肠道吸附能力。

[0006] 植物乳杆菌 LP45 具有抑制胃肠道致病菌的功能。

[0007] 植物乳杆菌 LP45 具有降低胆固醇的功能。

[0008] 植物乳杆菌 LP45 具有提高免疫力的功能。

[0009] 植物乳杆菌 LP45 用于制备抑制胃肠道致病菌的药品或食品。

[0010] 植物乳杆菌 LP45 用于制备降低动物或人类体内胆固醇浓度的药品或食品。

[0011] 植物乳杆菌 LP45 用于制备提高免疫力的药品或食品。

[0012] 上述食品主要包括普通食品、减肥食品、保健食品。

[0013] 在发明所提供的体外试验证实,植物乳杆菌 LP45 (YMC1005 或 L45)具备良好的耐酸性及耐胆盐性,在胃肠道中生存率较高,并具备较强的胃肠道吸附能力,具备提高免疫力的功能,可有效抑制有害菌的繁殖,本发明所提供的菌株可显著降低胆固醇含量,在对心血管疾病的预防或治疗中具备较大潜力。

附图说明

[0014] 图 1 为本发明植物乳杆菌 LP45 (YMC1005 或 L45) 的基因指纹图谱。

[0015] 在图 1 中 :M 为 Maker、1 为植物乳杆菌 LP45 (YMC1005 或 L45)、2 为植物乳杆菌 ATCC14917。

[0016] 菌种保存

本发明菌种命名为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) LP45, 于 2013 年 8 月 26 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物菌种保藏中心, 保藏号为 :CGMCC No. 8072。保藏地址为 :北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号。

具体实施方式

[0017] 下面将结合附图和实施例对本发明进行进一步详细的说明。

[0018] 实施例 1 菌株的筛选和保藏

本发明的植物乳杆菌 LP45 (YMC1005 或 L45) 是自内蒙古乌兰察布市四子王旗乌兰哈达苏木站乌兰哈达嘎查的传统酸奶酪中分离筛选获得, 具体分离鉴定步骤如下:

将内蒙古四子王旗酸奶酪样品溶解于灭菌生理盐水试管中, 充分震荡混匀, 混匀后使用接菌环蘸取混合液体并于 MRS 平板上划线培养 (37°C 72h), 分离菌株。用接菌环从第一代平板挑取单菌落, 在新 MRS 平板上划线培养 (37°C 72h), 进行纯化。同样方法再纯化 2 次, 使最终平板上为同一形态菌落为止。挑取单菌落接菌于 MRS 液体培养基中 37°C 培养 18h, 以备保藏和鉴定使用。

[0019] 将液体培养基菌悬液收集至灭菌离心管中, 清洗离心 2 次, 进行基因组 DNA 的提取, 提取完毕后, 利用通用引物 27f :5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1495r :5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3' 进行 16S rDNA 的 PCR 实验, 完成 PCR 后将最终 PCR 产物进行测序, 并将测序结果与 Gene Bank 中相关序列进行比较, 比较结果显示 LP45 (YMC1005 或 L45) 属于植物乳杆菌。

[0020] 将 LP45 (YMC1005 或 L45) 及 ATCC14917 (植物乳杆菌) 菌株的纯培养液进行清洗离心, 将获得的菌体进行基因组 DNA 的提取, 提取完毕后, 利用随机引物 5'-GACGGATCAG-3' 进行 RAPD 实验, 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并进行凝胶成像, 对比两株植物乳杆菌的电泳条带, 结果显示, 植物乳杆菌 LP45 (YMC1005 或 L45) 与植物乳杆菌 ATCC14917 属于同一种属的不同菌株, 结果见附图 1。将植物乳杆菌 LP45 (YMC1005 或 L45) 于 2013 年 8 月 26 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物菌种保藏中心, 保藏号为 :CGMCC No. 8072。

[0021] 实施例 2 胃肠道生存率试验

采用人工消化液实验 (胃酸抵抗性以及胆汁酸抵抗性) 来研究植物乳杆菌 LP45 (YMC1005) 在人的肠道环境下的生存性。

[0022] 1、耐酸性试验

植物乳杆菌 LP45 (YMC1005 或 L45) 由冻存管活化, 经 3 次活化 (第一次活化 24h, 第二次活化 14h, 第三次活化 18h) 后 3% 接种于 4 支 pH3.0 (使用盐酸调 pH) 的液体 MRS 培养基试管, 每支试管装有 10ml 的液体 MRS 培养基。取 1 支 pH3.0 的液体 MRS 培养基试管 3% 接种后用于测 0h 的活菌数; 另三支 pH3.0 的液体 MRS 培养基试管 3% 接种后用于测 4h 的 OD600, 取其中两支测活菌数。

[0023] 存活率 = 4h 活菌数 / 0h 活菌数 * 100%

2、耐胆盐试验

植物乳杆菌 LP45 (YMC1005 或 L45) 由冻存管活化, 经 3 次活化 (第一次活化 24h, 第二

次活化 14h,第三次活化 18h)后 3%接种于 4 支 0.3%胆盐(sigma 胆盐)的液体 MRS 培养基试管,每支试管装有 10ml 的液体 MRS 培养基。取 1 支 0.3%胆盐的液体 MRS 培养基试管 3%接种后用于测 0h 的活菌数;另三支 0.3%胆盐的液体 MRS 培养基试管 3%接种后用于测 4h 的 OD600,取其中两支测活菌数。

[0024] 存活率=4h 活菌数 /0h 活菌数 *100%

结果和结论:经试验得到 LP45(YMC1005 或 L45)在 pH3.0 的液体培养基中,4 小时后的存活率达到了 122.4%,高于竞品鼠李糖乳杆菌 LGG (98.9%)及嗜酸乳杆菌 NCFM (51.2%);在 0.3%胆汁酸的液体培养基中,4 小时后生存率达到了 47.8%。高于竞品菌株 LGG (1.3%)及 NCFM (2.1%)。

[0025] 众所周知,益生菌在被摄取后需经受消化液的考验才能到达肠道,本实验结果证明了 LP45 (YMC1005 或 L45)具备较高的胃肠道生存率,也显示了菌株作为益生菌开发的潜力。

[0026] 实施例 3 胃肠道吸附能力试验

采用 LP45 (YMC1005 或 L45)菌株吸附 Caco-2 细胞来研究 LP45 (YMC1005 或 L45)菌株对胃肠道上皮细胞的吸附能力,发现 LP45 (YMC1005 或 L45)粘附力为 72。

[0027] 具体的操作步骤为:

1、将人体肠道细胞株 Caco-2 以 1ml 0.05%胰岛素处理 5min 后,将细胞轻轻拍下,分装于 96 孔的培养盘中,每个孔洞中加入 10000cells,每天换 200 μ l 新鲜的 DMEM 培养基。

[0028] 2、植物乳酸杆菌 LP45 (YMC1005 或 L45)分别以 MRS 活化两次后,接种至 5ml MRS broth 进行培养,于 24 小时后取 1ml 以 6000rpm 离心 10 分钟后,以 PBS (pH 7.2)清洗两次得到乳酸菌菌液。加入 20 μ l 乳酸菌菌液于步骤 1 的细胞中,接着培养 1 小时使乳酸菌附着,

3、乳酸菌附着 1 小时后,倒除培养基,以 PBS 缓冲液洗 5 次以去除未附着的乳酸菌,加入 100 μ l,10%福尔马林,30 分钟,固定细胞及细菌,再以 PBS 缓冲液洗 3 次,最后以 100 μ l 结晶紫进行染色,五分钟后以少量 75%酒精快速冲洗,去除细胞上的染色剂。

[0029] 4、利用相位差显微镜观察乳酸菌对肠道上皮细胞的吸附性,随机在不同的显微镜视野下,观察并计算 50 个细胞的乳酸菌吸附情形,最后计算每个细胞平均吸附的乳酸菌数量。

[0030] 经试验结果可知,本发明植物乳杆菌 LP45 (YMC1005 或 L45)的粘附力 72,粘附力较强。筛选益生菌的一个重要指标就是其对胃肠道上皮细胞和粘膜的粘附力。粘附力强的益生菌在肠粘膜的定植时间也相应有所延长,这对于发挥益生菌的免疫调节作用和刺激修复肠道损伤部位具有重要意义。

[0031] 实施例 4 免疫力试验

采用 Caco-2 细胞,10%FBS 的 RPMI1640 培养基在 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下与 LP45 (YMC1005 或 L45)菌株共培养,发现 LP45 (YMC1005 或 L45)菌株无论是活菌还是加热失活后都能够显著调节 Caco-2 细胞中 IL-6 和 IL-8 的表达。

[0032] 采用小鼠巨噬细胞(J774.1),10%FBS 的 RPMI1640 培养基在 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下与 LP45 (YMC1005 或 L45)菌株共培养,发现 LP45 (YMC1005 或 L45)菌株明显促进了 IL-6 的分泌,使 IL-6 表达量由 0 提高到了 110ng/ml。

[0033] 由试验结果可见,植物乳杆菌 LP45 (YMC1005 或 L45) 具备增强免疫力的功能。

[0034] 实施例 5 胆固醇含量测定试验

1、绘制标准曲线

精确量取胆固醇标准液 0.2 ml、0.4 ml、0.6 ml、0.8 ml、1.0 ml、1.2 ml、1.4ml、1.6ml 置于干燥试管中,并用无水乙醇定容至 2.0ml,再沿壁缓慢加入 2.0ml 硫酸铁铵显色液,震荡混匀,待冷却至室温,与紫外分光光度计 560nm 处测定吸光度。以胆固醇浓度为横坐标,OD560 为纵坐标,绘制标准曲线。

[0035] 2、胆固醇测定

a. 物乳酸杆菌 LP45 (YMC1005) 在 MRS 液体培养基中活化 3 代,按麦氏比浊法调菌浓度为 3.0×10^9 CFU/ml 按 2% 的接种量接种到含胆固醇的 MRS 液体培养基中 37 °C 培养,分别培养 24 h、48h。

[0036] b. 取培养液 0.2 mL 置于干燥离心管中,先加 0.8 mL 无水乙醇,摇匀后,再加 4 mL 无水乙醇(无水乙醇分 2 次加入,目的使蛋白质以分散很细的沉淀析出),加盖,快速混匀器混匀,离心(10000 r/min,15 min)。

[0037] c. 用微量移液器准确移取上清液 2 mL 加入到比色管内,再加入 2 mL 硫酸铁铵显色液,加入时要沿管壁缓慢加入,使两液间保持明显界面,加完后充分振摇混匀(不能边加边摇),以便产生高热(大于 80 °C)促进显色。

[0038] d. 将各管放置 15 min,待管内反应液冷却至室温,在 30 ~ 60 min 内在分光光度计上于 560 nm 处测定吸光度。以 2 mL 无水乙醇加 2 mL 硫酸铁试剂为空白管,以未接菌的含胆固醇的 MRS 液体培养 A0560 为标准值。

[0039] e. 胆固醇降解率 = $(A0560 - A560) / A0560 \times 100\%$ 。

[0040] 结果和结论:经试验,LP45 (YMC1005 或 L45) 胆固醇降解率为 80.2%,略低于竞品菌株 NCFM (89.6%),高于菌株 LGG (34.7%),说明其具有很强的胆固醇脱除能力。

[0041] 实施例 6 抑菌试验

包括大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌实验。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌使用 LB 液体培养基活化 18h 后,稀释到 10^5 - 10^6 cfu/ml 取 200ul 均匀涂抹到 LB 固体培养基培养皿中,半小时后摆放牛津杯,每个培养皿摆放 3 个,分别标为 A、B、C, A 代表培养液原液、B 代表调 pH5.5 后的培养液原液、C 代表调 pH5.5 后的培养液原液稀释 10 倍。每个牛津杯加入 300ul,37°C 培养 24h 后测量抑菌圈。

[0042] 经检测,该菌株大肠杆菌抑菌圈为 11.98mm,对金黄色葡萄球菌抑菌圈为 24.8mm。结果显示 LP45 (YMC1005 或 L45) 对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌具有较好的抑菌作用。

[0043] 以上所述实施方式仅为本发明的优选实施例,而并非本发明可行实施的穷举。对于本领域一般技术人员而言,在不背离本发明原理和精神的前提下对其所作出的任何显而易见的改动,都应当被认为包含在本发明的权利要求保护范围之内。

<110> 河北一然生物科技有限公司

<120> 一种植物乳杆菌及其应用

<130> 2013

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1000

<212> DNA

<213> 植物乳杆菌 LP45

<400> 1

catctgtcac ttagcggctg gttcctaaaa ggttaccca cgcactttgg gtgttacaaa	60
ctctcatggt gtgacgggcg gtgtgtacaa ggcccgggaa cgtattcacc gcggcatgct	120
gatccgcgat tactagcgat tccgacttca tntagggcag ttgcagccta caatccgaac	180
tgagaatggc ttttaagagat tagcttactc tcgcgagttc gcaactcgtt gtaccatcca	240
ttgtagcacg tgtgtagccc aggtcataag gggcatgatg atttgacgtc atccccacct	300
tcctccggtt tgtcaccggc agtctcacca gagtgcccaa cttaatgctg gcaactgata	360
ataagggttg cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacaa	420
ccatgcacca cctgtatcca tgtccccgaa gggaacgtct aatctcttag atttgcatag	480
tatgtcaaga cctggtaagg ttcttcgcgt agcttcgaat taaaccacat gctccaccgc	540
ttgtgcgggc ccccgtcaat tcctttgagt ttcagccttg cggccgtact ccccgaggc	600
aatgcttaat gcgtagctg cagcactgaa gggcggaaac cctccaacac ttagcattca	660
tcgtttacgg tatggactac cagggtatct aatcctgttt gctaccata ctttcgagcc	720
tcagcgtcag ttacagacca gacagccgcc ttcgccactg gtgttcttcc atatatctac	780
gcatttcacc gctacacatg gagtccact gtcctcttct gcaactcaagt ttcccagttt	840
ccgatgcact tcttcggttg agccgaaggc tttcacatca gacttaaaaa accgcctgcg	900
ctcgttttac gcccaataaa tccggacaac gcttgccacc tacgtattac cgcggctgct	960
ggcacgtagt tagccgtggc tttctggtta aataccgtca	1000

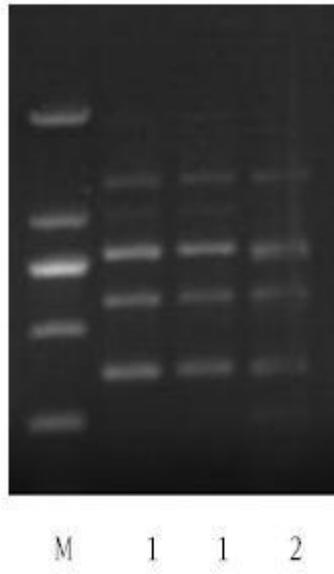


图 1