



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110551658 A

(43)申请公布日 2019.12.10

(21)申请号 201910865365.3

(22)申请日 2019.09.12

(71)申请人 君维安(武汉)生命科技有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开
发区高新大道666号生物创新园C4栋
505室

(72)发明人 王敏 石长萍

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限
公司 32224

代理人 徐瑛

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

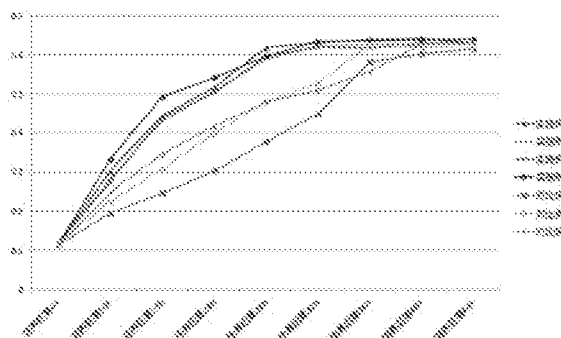
权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54)发明名称

一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的低氧培养方法

(57)摘要

本发明公开一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的低氧培养方法,该方法主要营造了一种低氧的气体环境,混合气体各成分的体积比为:70~94%N₂、1~5%O₂、5~25%CO₂;培养时间为24~36h。本发明提供了一种全新的氧气浓度相对更高,更适于Akk菌生长的低氧混合气体氛围。相比于传统绝对无氧环境和现有的微氧环境,本发明的方法使Akk菌培养进入稳定期的时间大大缩短,这一低氧环境,对于不同的培养基,同样能展现出类似促进作用。



1. 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的低氧培养方法,其特征在于,所述低氧培养的混合气体的体积配比为:70~94% N_2 、1~5% O_2 、5~25% CO_2 。

2. 根据权利要求1所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的低氧培养方法,其特征在于,所述混合气体的体积配比为:84~90% N_2 、2% O_2 、7~14% CO_2 。

3. 根据权利要求3所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的低氧培养方法,其特征在于,所述混合气体的体积配比为:88% N_2 、2% O_2 、10% CO_2 。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的低氧培养方法,其特征在于,在所述混合气体中培养的时间为24~36h。

5. 根据权利要求4所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的低氧培养方法,其特征在于,在所述混合气体中培养的时间为14h。

6. 根据权利要求1~3任一项所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的低氧培养方法,其特征在于,在所述混合气体中培养的温度为37℃恒温培养。

一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的低氧培养方法

技术领域

[0001] 本发明属于嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养技术领域,特别是嗜黏蛋白阿克曼氏菌的低氧培养方法。

背景技术

[0002] 嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*Akkermansia muciniphila*)是目前疣微菌门中第一种被分离的肠道厌氧菌,于2004年分离成功。最新研究发现,*Akkermansia*属的*Akkermansia muciniphila*(以下简称Akk菌)可能是衡量肠道微生态是否平衡的重要标志微生物之一。Akk菌为具有调节血糖稳态等特性的功能菌,在健康人肠道中广泛存在。它具有降解黏蛋白的特性,是生活在宿主肠黏膜黏液表面中的一种重要微生物。近年来研究表明,Akk菌和人类的许多代谢疾病有一定的关联,其含量是衡量肠道微生态是否平衡的重要标志微生物之一,Akk菌的丰度与人类的体重、I型糖尿病和II型糖尿病成负相关,同时与腰围,体重和体质指数呈负相关,很多学者都将其称为下一代益生菌。考虑到Akk菌作为一种新型候选益生菌,其培养显得尤为重要。

[0003] 根据目前的研究成果来看,Akk菌是一种严格厌氧菌,需要使用特殊的厌氧培养基进行培养。例如专利201910265701.0提供了一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基及其使用方法,该方法中选用的厌氧培养环境为85%CO₂、10%N₂和5%H₂,使用的仪器为厌氧箱。又例如Derrien M等人(Derrien M.*Akkermansia muciniphila* gen.nov.sp.nov.a human intestinal mucin-degrading bacterium[J].*Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*2004,54.)公开了在嗜黏蛋白阿克曼氏菌可在含有猪胃粘蛋白作为唯一碳源和氮源的基础厌氧培养基上生长,且其培养气氛为N₂/CO₂(80:20,v/v);发明人在利用上述培养条件以及常规的厌氧箱培养条件(95%N₂、5%H₂)进行摇瓶培养。

[0004] 然而,Janneke P.Ouwerkerk等人(*Adaptation of Akkermansia muciniphila to the Oxic-Anoxic Interface of the Mucus Layer[J].Applied and Environmental Microbiology.*2016.82)中研究了Akk菌的氧气耐受程度,文中提到Akk菌不但能够容忍,甚至还能受益于低水平的氧气。然而,该文章中仅仅研究了Akk菌处于稳定期(the stationary phase)时的氧浓度(0.1%),而对Akk菌生长最旺盛的对数期的低氧培养气氛则未做研究;采用该论文中的氧气水平,Akk菌进入稳定期所需要培养的时间较长,而对于Akk菌的研究,需要使其尽快生长,快速达到稳定期,已获得更多数量的Akk菌,显然该论文的技术不能达到上述效果,不能提高Akk菌的培养效率;此外,0.1%的氧气水平要求,对于Akk菌的培养而言仍较为严格,培养时气体氛围容易产生波动,影响Akk菌生长。

发明内容

[0005] 针对以上现有技术的不足,本发明提供了一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的低氧培养方法,该方法通过对Akk菌的生产氛围进一步研究,发现在O₂体积为1~5%的范围内,Akk菌的生产繁殖不仅没有受到O₂的抑制,反而显著加快,即在该氧气浓度范围内,不仅Akk菌表现

出较好的耐受性,更能够刺激Akk菌的生长。通过测定其在固定时间间隔内OD₆₀₀可知,一般培养24~36h后,均能进入稳定期。具体通过以下技术实现。

[0006] 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的低氧培养方法,所述低氧培养的混合气体的体积配比为:70~94%N₂、1~5%O₂、5~25%CO₂。

[0007] 上述培养方法打破了以往本领域研究人员的常规思维,不同于传统的Akk菌厌氧培养条件,以及现有文献中记载的微氧条件;发现在上述较低浓度氧气条件下,Akk菌同样能够快速生长。通过对低氧环境继续进行深入研究,发现在所用培养基等其他条件均相同时,采用上述混合气体氛围相比于现有绝对厌氧环境,Akk菌的生长更加旺盛,从接种到进入稳定期所需的培养时间大幅缩短至24~36h。这一成果为行业内的技术人员提供了一种全新的Akk菌的培养方法,培养条件相对更加宽松,一定程度避免了因误操作通入氧气造成菌生长的影响,能够缩短基于Akk菌的科学研究的时间,提高研究效率。

[0008] 优选地,所述混合气体的体积配比为:84~90%N₂、2%O₂、7~14%CO₂。。

[0009] 优选地,所述混合气体的体积配比为:88%N₂、2%O₂、10%CO₂。

[0010] 优选地,在所述混合气体中培养的时间为24~36h。

[0011] 更优选地,在所述混合气体中培养的时间为14h。

[0012] 更优选地,在所述混合气体中培养的温度为35~40℃。

[0013] 与现有技术相比,本发明的有益之处在于:

[0014] 1、本专利不同于现有的专利、文献记载的技术方案,发现了一个全新的,氧气浓度更高的,适于Akk菌生长的低氧混合气体氛围,相比于采用绝对厌氧的气体环境,在该特定的氧气浓度下反而能够更加快速生长,Akk菌进入稳定期的培养时间显著缩短;打破了本领域技术人员对Akk菌为严格厌氧菌的常规固定的思维,不仅极大降低了Akk菌的培养难度,更为Akk菌的低氧环境的培养提供了另一套实验设计思路以及理论可行的技术方案,取得了意想不到的技术效果。

[0015] 2、对于采用现有不同的用于Akk菌培养的培养基培养Akk菌,采用本专利技术提供的低氧环境,都能比采用绝对厌氧环境有更明显的促进作用。

附图说明

[0016] 图1为实施例1培养的Akk菌在稳定期的菌落形态图;

[0017] 图2为实施例1培养的Akk菌在稳定期的菌落形态图;

[0018] 图3为实施例1培养的Akk菌在对数期的菌落形态图;

[0019] 图4为实施例1~4和对比例1~3培养的Akk菌在不同时间段的OD₆₀₀值。

具体实施方式

[0020] 下面将结合本发明中的附图,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动条件下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0021] 以下所有实施例和对比例所选用的Akk菌采购自中国典型培养物保藏中心。

[0022] 其中,实施例1~3和对比例1~3采用BHI培养基(brain heart infusion),该培养

基采购自英国OXOID公司,批号CM1135。

[0023] 实施例4采用培养基I,选用与参考文献(Derrien M.Akkermansia muciniphila gen.nov.sp.nov.a human intestinal mucin-degrading bacterium[J].Int.J.Syst.Evol.Microbiol.2004,54.)相同的黏蛋白培养基(mucin medium)。

[0024] 实施例1~3和对比例1~3

[0025] 本实施例所采用的Akk菌的培养方法为:取Akk菌48h活化,按1%的接种量接种到BHI培养基中,37℃恒温培养;混合气体的体积比如下表1所示。

[0026] 表1实施例1~3和对比例1~3采用A培养基的混合气体成分和体积比

[0027]

	N ₂	O ₂	CO ₂
实施例1	88%	2%	10%
实施例2	70%	5%	25%
实施例3	94%	1%	5%
对比例1	90%	0	10%
对比例2	90%	0.1%	9.9%
对比例3	68%	7%	25%

[0028] 实施例4

[0029] 本实施例所采用的Akk菌的培养方法为:取Akk菌48h活化,按1%的接种量接种到培养基I中,37℃恒温培养;混合气体的体积比与实施例1相同。

[0030] 应用例:混合气体成分及体积比对Akk菌生长的影响

[0031] 采用实施例1的低氧混合气体环境培养的Akk菌的菌落情况如图1、2、3所示,将采用实施例1~4和对比例1~3的混合气体培养的Akk菌,在培养后第6h、8h、10h、12h、14h、16h、24h、30h、36h通过分光光度计在600nm波长下测定菌浓度OD₆₀₀。结果如下表1所示。

[0032] 表1混合气体成分及体积比对Akk菌生长的影响(OD_{600nm})

[0033]

	培养后 第4h	培养后 第10h	培养后 第16h	培养后 第24h	培养后 第28h	培养后 第32h	培养后 第36h	培养后 第40h	培养后 第44h
实施例1	0.1192	0.3028	0.4436	0.5179	0.6195	0.6315	0.6394	0.6428	0.6321
实施例2	0.1163	0.2838	0.4289	0.5079	0.5895	0.6246	0.6255	0.6315	0.6321
实施例3	0.1185	0.2749	0.4386	0.5046	0.5974	0.6206	0.6173	0.6283	0.6311
实施例4	0.1159	0.3326	0.4937	0.5428	0.5974	0.6359	0.6373	0.6391	0.6402
对比例1	0.1145	0.1958	0.2472	0.3022	0.3775	0.4481	0.5827	0.6037	0.6158
对比例2	0.1183	0.2258	0.3072	0.3979	0.4826	0.5281	0.6283	0.6193	0.6249
对比例3	0.1151	0.2493	0.3448	0.4168	0.4792	0.5103	0.5579	0.6284	0.6314

[0034] 将上表1绘制成曲线图,如附图4所示。表1中,当OD₆₀₀位于0.2~0.3时,Akk菌刚进入对数期;位于0.35~0.4时,Akk菌正处于对数期;位于0.5~0.6时,Akk菌正处于稳定期。通过表1和图1可知,采用实施例1~5,对比例1~3的混合气体环境,实施例1~4采用了不同的培养基,均能在24h后进入稳定期,且在32或36h后即达到最大值。

[0035] 对比例1~3培养的菌则相对较慢;当处于绝对厌氧环境时(即对比例1),培养超过

32h后才进入稳定期;当处于微氧环境时(即对比例2),培养大约32h后才刚刚进入稳定期,且在约36h后达到最大值。

[0036] 上述数据说明在相同的低氧气体氛围下,采用不同培养基培养Akk菌,都对菌的生长有明显促进作用。而采用现有微氧浓度,或绝对无氧浓度,则Akk菌需要相对较长的时间才能进入稳定期,进入稳定期后OD₆₀₀所能达到的最大值的时间也相应延后;进一步说明了,本专利混合气体的低氧环境相比于传统的无氧环境和现有的微氧环境,对Akk菌生长的促进作用更好,能够更快地进入稳定期。

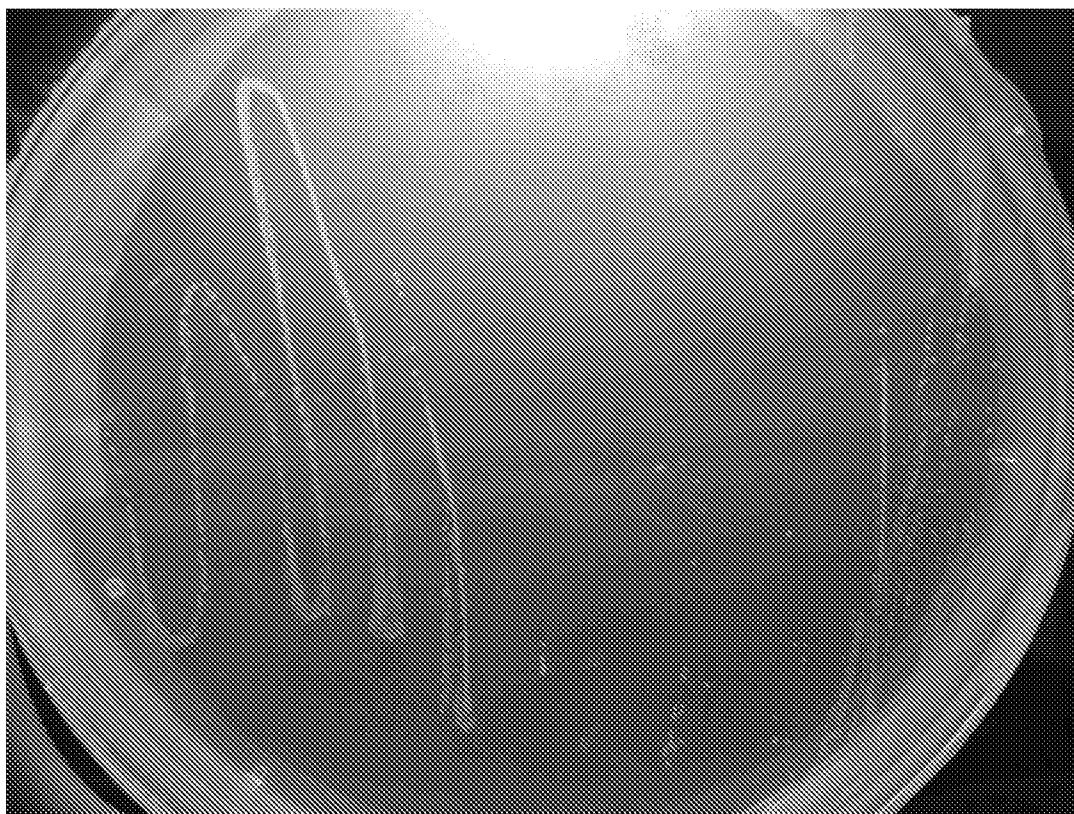


图1

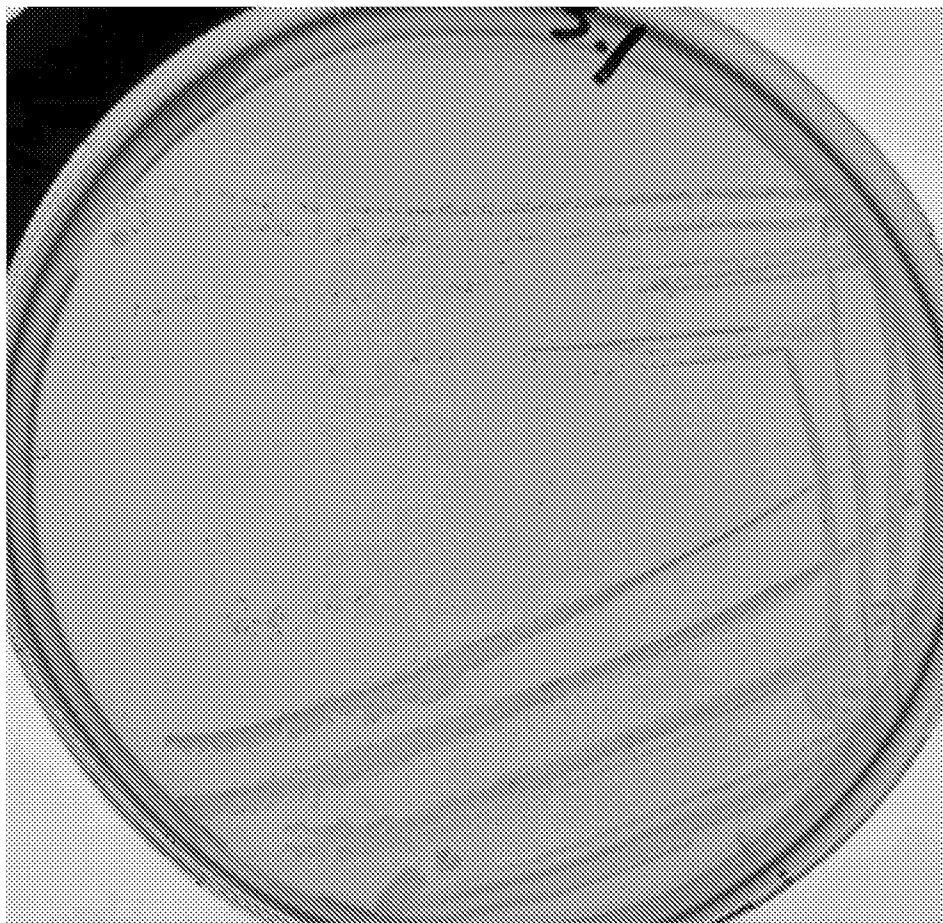


图2

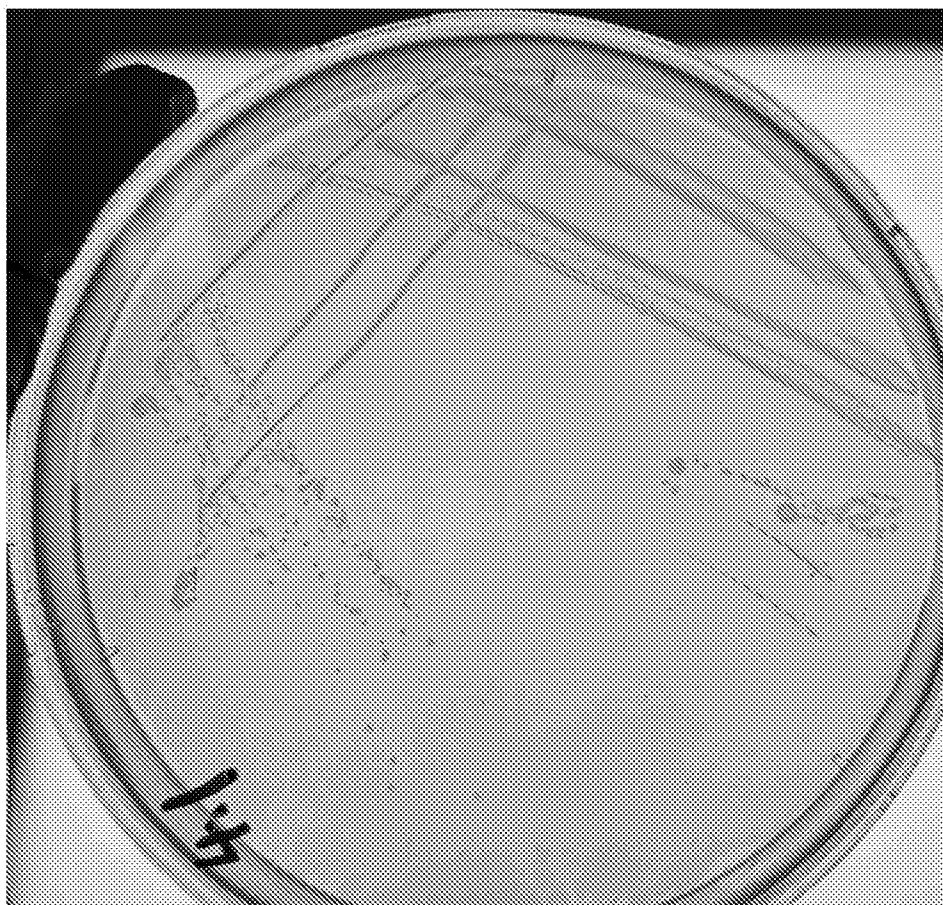


图3

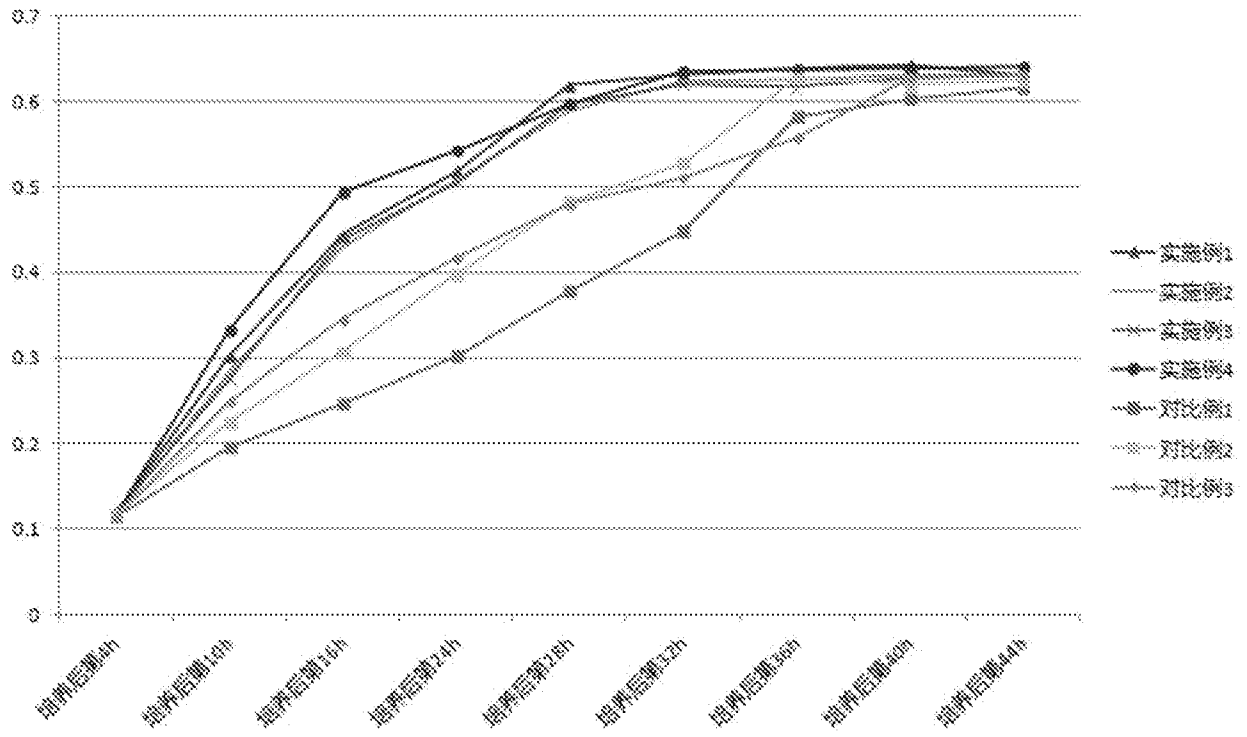


图4