



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115851529 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 28

(21) 申请号 202211533661.1

C12N 1/38 (2006.01)

(22) 申请日 2022.12.02

C12R 1/01 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CCTCC No:M 20221499 2022.09.27

(71) 申请人 广东悦创生物科技有限公司

地址 528000 广东省佛山市禅城区张槎街
道张槎一路117号二座自编1号楼六层
K012 (住所申报)

申请人 陆勇军

(72) 发明人 陆勇军 葛振煌 许敏青

(74) 专利代理机构 深圳市创富知识产权代理有
限公司 44367

专利代理师 冯炜国

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

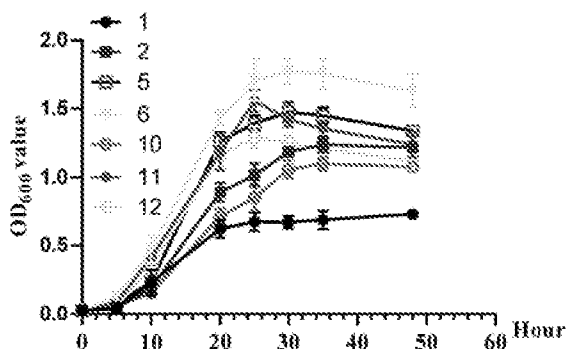
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansia muciniphila* 改良培养基

(57) 摘要

本发明属于细菌培养基技术领域,具体涉及嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansia muciniphila* 改良培养基。本发明公开的 *Akkermansia muciniphila* 改良培养基包括酵母提取物、EGCG、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、葡萄糖、N-乙酰-葡萄糖胺、N-乙酰-D-半乳糖胺、尿素、苏氨酸、脯氨酸、L-半胱氨酸盐酸盐、丙酮酸钠、焦磷酸铁、维生素K3 (可不添加N-乙酰-D-半乳糖胺和尿素)。该改良培养基由植物源成分组成,不含有动物源成分,安全性高,既能保持 *A. muciniphila* 体外的优异生长,又不改变菌体正常形态,同时适用于体外大体积培养 *A. muciniphila*。



1. 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansiamuciniphila* 改良培养基, 其特征在于, 所述培养基包括酵母提取物、EGCG、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、葡萄糖、N-乙酰-葡萄糖胺、N-乙酰-D-半乳糖胺、尿素、苏氨酸、脯氨酸、L-半胱氨酸盐酸盐、丙酮酸钠、焦磷酸铁、维生素K3。

2. 根据权利要求1所述的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansiamuciniphila* 改良培养基, 其特征在于, 所述培养基包括25-35g/L酵母提取物, 0.4-0.6g/L EGCG, 0.4-0.6g/L磷酸二氢钾, 1-2g/L磷酸氢二钠, 0.5-1.5g/L氯化钠, 4-5g/L葡萄糖, 5-6g/L N-乙酰-葡萄糖胺, 20-30g/L N-乙酰-D-半乳糖胺, 7-15g/L尿素, 3-5g/L苏氨酸, 3-5g/L脯氨酸, 4-6mg/L L-半胱氨酸盐酸盐, 0.5-1.5g/L丙酮酸钠, 0.4-0.6g/L焦磷酸铁, 4-6mg/L维生素K3。

3. 根据权利要求2所述的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansiamuciniphila* 改良培养基, 其特征在于, 所述培养基包括30g/L酵母提取物, 0.5g/L EGCG, 0.5g/L磷酸二氢钾, 1.5g/L磷酸氢二钠, 1.0g/L氯化钠, 4.5g/L葡萄糖, 5.53g/L N-乙酰-葡萄糖胺, 25g/L N-乙酰-D-半乳糖胺, 10g/L尿素, 4g/L苏氨酸, 4g/L脯氨酸, 5mg/L L-半胱氨酸盐酸盐, 1g/L丙酮酸钠, 0.5g/L焦磷酸铁, 5mg/L维生素K3。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansiamuciniphila* 改良培养基, 其特征在于, 所述培养基的pH为6-7。

5. 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansiamuciniphila* 改良培养基, 其特征在于, 所述培养基包括酵母提取物、EGCG、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、葡萄糖、N-乙酰-葡萄糖胺、苏氨酸、脯氨酸、L-半胱氨酸盐酸盐、丙酮酸钠、焦磷酸铁、维生素K3。

6. 根据权利要求5所述的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansiamuciniphila* 改良培养基, 其特征在于, 所述培养基包括25-35g/L酵母提取物, 0.4-0.6g/L EGCG, 0.4-0.6g/L磷酸二氢钾, 1-2g/L磷酸氢二钠, 0.5-1.5g/L氯化钠, 4-5g/L葡萄糖, 5-6g/L N-乙酰-葡萄糖胺, 3-5g/L苏氨酸, 3-5g/L脯氨酸, 4-6mg/L L-半胱氨酸盐酸盐, 0.5-1.5g/L丙酮酸钠, 0.4-0.6g/L焦磷酸铁, 4-6mg/L维生素K3。

7. 根据权利要求6所述的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansiamuciniphila* 改良培养基, 其特征在于, 所述培养基包括30g/L酵母提取物, 0.5g/L EGCG, 0.5g/L磷酸二氢钾, 1.5g/L磷酸氢二钠, 1.0g/L氯化钠, 4.5g/L葡萄糖, 5.53g/L N-乙酰-葡萄糖胺, 4g/L苏氨酸, 4g/L脯氨酸, 5mg/L L-半胱氨酸盐酸盐, 1g/L丙酮酸钠, 0.5g/L焦磷酸铁, 5mg/L维生素K3。

8. 根据权利要求5-7任一项所述的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansiamuciniphila* 改良培养基, 其特征在于, 所述培养基的pH为6-7。

嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansia muciniphila* 改良培养基

技术领域

[0001] 本发明属于细菌培养基技术领域,具体涉及嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansia muciniphila* 改良培养基。

背景技术

[0002] 嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A. muciniphila*) 是一种肠道严格厌氧细菌,属于疣微菌门, G^- , 为非运动的、不产芽孢的椭圆形菌,菌体长度为 $0.6-1\mu m$,能够在人类及许多动物胃肠道粘液层中定居,被广泛报道与肥胖、炎症性肠炎、高血压、动脉粥样硬化等疾病相关,有望成为下一代益生菌药物。然而,嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A. muciniphila*) 的体外培养并不容易。2004年,有学者使用含有猪胃黏蛋白成分的培养基首次实现了嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A. muciniphila*) 的体外培养。此后,更是发现嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A. muciniphila*) 能够在多种富集培养基中生长,例如:哥伦比亚培养基 (Columbia Broth) 【蛋白胨、玉米淀粉、氯化钠、脱纤维羊血】、脑心浸液培养基 (Brain Heart Infusion) 【脑心浸粉、D-葡萄糖、蛋白胨、氯化钠、磷酸氢二钠】等。然而,由于这些可用于体外培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A. muciniphila*) 的培养基都含有动物来源成分,这些成分可能含有病毒、细菌,或过敏源、致病因子等,会使嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A. muciniphila*) 后续作为益生菌的应用受到制约。为此,有研究提出了一种可以体外培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A. muciniphila*) 的非来源于动物产品的培养基,该培养基的主要成分包括大豆蛋白胨、葡萄糖和氨基酸等。但是这种培养基会使菌体的形态发生变化,包括形状不均匀、菌体变长,甚至出现“三脚架”形状等,这可能会影响后续的菌株活力。

[0003] 因此,有必要开发一种不包含动物源成分的培养基,不具有过敏源,能有效保持嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A. muciniphila*) 体外的优异生长,同时不改变菌体的正常形态,适合于嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A. muciniphila*) 后续的大规模发酵培养,使其能够作为下一代益生菌被广泛开发使用。

发明内容

[0004] 为了克服上述现有技术的不足,本发明提出了一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansia muciniphila* 改良培养基,该培养基不包含动物源成分,既能保持嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A. muciniphila*) 体外的优异生长,又不改变菌体正常形态,同时适用于大体积培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A. muciniphila*)。

[0005] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0006] 本发明提供了一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansia muciniphila* 改良培养基,所述培养基包括酵母提取物、EGCG、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、葡萄糖、N-乙酰-葡萄糖胺、N-乙酰-D-半乳糖胺、尿素、苏氨酸、脯氨酸、L-半胱氨酸盐酸盐、丙酮酸钠、焦磷酸铁、维生素K3。

[0007] 本发明的改良培养基所包含的组分均为非动物来源成分,安全性高,且仅添加

0.5g/L焦磷酸铁(嗜黏蛋白阿克曼氏菌基因组中有15.9%毒力基因被注释到与铁离子相关)和5mg/L维生素K3,没有使用其他元素及维生素。其中,酵母提取物在培养基中添加量达到30g/L,能保持嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila*体外的优异生长;使用尿素替代蛋白胨类成分,可以在保持嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila*的体外优异生长的同时,也维持菌体的正常形态;添加绿茶提取物EGCG可显著提高嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila*的体外生长速度和生长量。即在改良培养基中的酵母提取物、N-乙酰-D-半乳糖胺、尿素和EGCG的协同作用下,能显著增加嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila*的体外生长速度和生长量。

[0008] 优选地,所述培养基包括25-35g/L酵母提取物,0.4-0.6g/L EGCG,0.4-0.6g/L磷酸二氢钾,1-2g/L磷酸氢二钠,0.5-1.5g/L氯化钠,4-5g/L葡萄糖,5-6g/L N-乙酰-葡萄糖胺,20-30g/L N-乙酰-D-半乳糖胺,7-15g/L尿素,3-5g/L苏氨酸,3-5g/L脯氨酸,4-6mg/L L-半胱氨酸盐酸盐,0.5-1.5g/L丙酮酸钠,0.4-0.6g/L焦磷酸铁,4-6mg/L维生素K3。

[0009] 更优选地,所述培养基包括30g/L酵母提取物,0.5g/L EGCG,0.5g/L磷酸二氢钾,1.5g/L磷酸氢二钠,1.0g/L氯化钠,4.5g/L葡萄糖,5.53g/L N-乙酰-葡萄糖胺,25g/L N-乙酰-D-半乳糖胺,10g/L尿素,4g/L苏氨酸,4g/L脯氨酸,5mg/L L-半胱氨酸盐酸盐,1g/L丙酮酸钠,0.5g/L焦磷酸铁,5mg/L维生素K3。

[0010] 优选地,所述培养基的pH为6-7。更优选地,所述培养基的pH为6.5。

[0011] 本发明还提供了另一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌*Akkermansia muciniphila*改良培养基,所述培养基包括酵母提取物、EGCG、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、葡萄糖、N-乙酰-葡萄糖胺、苏氨酸、脯氨酸、L-半胱氨酸盐酸盐、丙酮酸钠、焦磷酸铁、维生素K3。

[0012] 在上述第一种改良培养基的基础上,虽然不添加N-乙酰-D-半乳糖胺和尿素会导致嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila*体外生长的下降,但酵母提取物和EGCG相结合仍可以促进嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila*在体外大体积培养下的生长,使其维持优异的生长速度和生长量,其生长速度和生长量依然优于现有的培养基。而且,不添加N-乙酰-D-半乳糖胺和尿素还可以大大降低培养基的成本,更有利于工业应用。

[0013] 优选地,所述培养基包括25-35g/L酵母提取物,0.4-0.6g/L EGCG,0.4-0.6g/L磷酸二氢钾,1-2g/L磷酸氢二钠,0.5-1.5g/L氯化钠,4-5g/L葡萄糖,5-6g/L N-乙酰-葡萄糖胺,3-5g/L苏氨酸,3-5g/L脯氨酸,4-6mg/L L-半胱氨酸盐酸盐,0.5-1.5g/L丙酮酸钠,0.4-0.6g/L焦磷酸铁,4-6mg/L维生素K3。

[0014] 更优选地,所述培养基包括30g/L酵母提取物,0.5g/L EGCG,0.5g/L磷酸二氢钾,1.5g/L磷酸氢二钠,1.0g/L氯化钠,4.5g/L葡萄糖,5.53g/L N-乙酰-葡萄糖胺,4g/L苏氨酸,4g/L脯氨酸,5mg/L L-半胱氨酸盐酸盐,1g/L丙酮酸钠,0.5g/L焦磷酸铁,5mg/L维生素K3。

[0015] 优选地,所述培养基的pH为6-7。更优选地,所述培养基的pH为6.5。

[0016] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0017] 本发明公开了一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌*Akkermansia muciniphila*改良培养基,包括酵母提取物、EGCG、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、葡萄糖、N-乙酰-葡萄糖胺、N-乙酰-D-半乳糖胺、尿素、苏氨酸、脯氨酸、L-半胱氨酸盐酸盐、丙酮酸钠、焦磷酸铁、维生素K3(可不添加N-乙酰-D-半乳糖胺和尿素)。该改良培养基由植物源成分组成,不含有动物源成分,安全性高,既能保持嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*A.muciniphila*)体外的优异生长,又不改变菌体

正常形态,同时适用于体外大体积培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*A.muciniphila*)。

附图说明

[0018] 图1为1、2、7、8和9号培养基体外测定嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3的生长曲线图;

[0019] 图2为1、2和6号培养基中嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3在对数期和稳定期的菌体形态;

[0020] 图2中,A和D:1号培养基中嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3在对数期和稳定期时菌体形态;B和E:2号培养基中嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3在对数期和稳定期时菌体形态;C和F:6号培养基中嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3在对数期和稳定期时菌体形态;G:1、2和6号培养基中嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3在对数期和稳定期的菌体长度统计图(随机选取10个视野,随机测量菌体长度);H:2号培养基中嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3在透射电镜下菌体形态。

[0021] 图3为1、2、6和9号培养基体外测定嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3生长曲线图;

[0022] 图4为1、2、5、6、10、11和12号培养基体外测定嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3生长曲线图;

[0023] 图5为10和11号培养基中嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3在对数期和稳定期的菌体形态;

[0024] 图5中,A和C:10号培养基中嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3在对数期和稳定期时菌体形态;B和D:11号培养基中嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3在对数期和稳定期时菌体形态;E:1、2、6、10和11号培养基中嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3在对数期和稳定期的菌体长度统计图(随机选取10个视野,随机测量菌体长度)。

具体实施方式

[0025] 下面对本发明的具体实施方式作进一步说明。在此需要说明的是,对于这些实施方式的说明用于帮助理解本发明,但并不构成对本发明的限定。此外,下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

[0026] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为可通过常规的商业途径购买得到。

[0027] 下列实施例所涉及的培养基的pH均为6.5。

[0028] 下列实施例所用的嗜黏蛋白阿克曼菌JF3的保藏信息如下:

[0029] 保藏时间:2022年9月27日;

[0030] 保藏单位名称:中国典型培养物保藏中心(CCTCC);

[0031] 保藏编号:CCTCC No:M 20221499;

[0032] 保藏单位地址:中国.武汉.武汉大学;

[0033] 分类命名:*Akkermansia muciniphila*。

[0034] 实施例1嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*A.muciniphila*)非动物来源成分培养基探索

[0035] 据已有报道,嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*A.muciniphila*)能在含有单糖、单糖含氮衍生

物和氨基酸源组合物培养基上生长,可替换黏蛋白或其他动物来源成分,提示嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*A.muciniphila*)的发酵培养可使用安全性更高的非动物来源成分培养基进行。为此,本实施例在现有培养基(1号和2号)的基础上(表1),对嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*A.muciniphila*)体外生长培养基进行进一步改良,以更有效地提高嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*A.muciniphila*)的体外生长速度和生长量,改良培养基基础成分见表2。

[0036] 作为一种异养微生物,嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*A.muciniphila*)的体外生长需要有机碳和氮源成分,为符合非动物来源成分,选择酵母提取物和大豆蛋白胨为有机碳和氮源。在本实施例中,使用嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3(保藏号为CCTCC No:M 20221499)进行体外生长曲线测定。在基础培养基的基础上(表2),再添加其他成分,进一步优化培养基。酵母提取物(图1、表3:7号和9号培养基)和大豆蛋白胨(图1、表3:7号和8号培养基)均能促进嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3的体外生长速度和体外生长量,其中酵母提取物的效果更好。当酵母提取物的用量为30g/L时(图1、表3:9号培养基;),嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3的生长速度和生长量高于现有培养基培养后的生长速度和生长量(图1:1号、2号和9号培养基;表3)。

[0037] 尽管能实现嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*A.muciniphila*)的体外培养,但体外培养环境与菌株在肠道环境中的真实情况有差异。为此,本实施例中的嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3由北京百迈客生物科技有限公司进行全基因组测序,分析其基因组信息,预测到嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3中有15.9%的毒力基因与铁离子相关,这提示铁离子对嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3的生长有一定关系(表4)。尽管不是必需成分,但为了更贴近嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3在肠道内环境的真实情况,本实施例往改良培养基中添加0.5g/L焦磷酸铁。此外,本实施例还添加了苏氨酸、脯氨酸,L-半胱氨酸盐酸盐和和维生素K3(表2)。

[0038] 表1 1和2号培养基(现有培养基)成分表

成分 \ 用量	1 号培养基	2 号培养基
黏蛋白	4.0 g/L	-
BHI 粉末	36.0 g/L	-
大豆蛋白胨	-	16.0 g/L
苏氨酸	-	4.0 g/L
半胱氨酸盐酸盐	5 mg/L	5.0 mg/L
N-乙酰-葡萄糖胺	-	5.53 g/L
葡萄糖	-	4.5 g/L

[0040] 表2 改良培养基基础成分表

[0041]

类别	成分	用量
氨基酸	苏氨酸	4.0 g/L
	L-半胱氨酸盐酸盐	5.0 mg/L
	脯氨酸	4.0 g/L

[0042]

糖类	N-乙酰-葡糖胺	5.53 g/L
	葡萄糖	4.5 g/L
无机盐类	磷酸二氢钾	0.5 g/L
	磷酸氢二钠	1.5 g/L
	氯化钠	1.0 g/L
	焦磷酸铁	0.5 g/L
维生素类	维生素 K3	5.0 mg/L
其他化合物	丙酮酸钠	1.0 g/L

[0043] 表3 7、8和9号培养基新增成分比较表(在改良培养基基础成分的基础上增加)

[0044]

成分 \ 用量	7 培养基	8 培养基	9 培养基
大豆蛋白胨	16.0 g/L	-	8.0 g/L
酵母粉	7.0 g/L	7.0 g/L	30.0 g/L
N-乙酰-D-半乳糖胺	25.0 g/L	25.0 g/L	25.0 g/L
尿素	-	-	-

[0045] 表4 嗜黏蛋白阿克曼氏菌A.muciniphila JF3与铁离子相关的毒力因子

[0046]

Virulence_factor_id	vf_name	vf_Keyword	gene_list
VF0095	Pyochelin	Iron uptake; Siderophore	GE001410
VF0160	FecAB	Iron uptake; Ferrous iron uptake	GE001196; GE002164; GE002165
VF0227	Chu	Iron uptake; Heme uptake	GE000082; GE001004
VF0228	Enterobactin	Iron uptake; Siderophore	GE000335; GE001069
VF0268	HitABC	Iron uptake; ABC transporter	GE000063; GE000187; GE000191; GE000743; GE000744; GE001074; GE001232; GE001755; GE002103
VF0269	HxuABC	Iron uptake; Heme uptake	GE000571
VF0272	FbpABC	Iron uptake; ABC	GE000052; GE000180; GE000327; GE001176; GE001393; GE001409;

[0047]

		transporter	GE001432; GE001476; GE001481; GE001748
VF0293	IraAB	Iron uptake	GE000482
VF0467	Acinetobactin	Iron uptake; Siderophore	GE000610; GE000819; GE000820; GE000821; GE000822; GE000840; GE002071
VF0562	Ent	Iron acquisition; Siderophore	GE000763
VF0564	Ybt	Iron acquisition; Siderophore	GE000415

[0048] 实施例2替换蛋白胨类成分培养基探索

[0049] 虽然蛋白胨类成分是较为理想的有机氮源,但此成分会导致嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*A.muciniphila*)的体外菌体形态改变,主要表现为:菌株形状不均匀、菌体变长,但至今未有解决方法。而本实施例的嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3也观察到这种情况,含蛋白胨成分培养基(1、2号培养基)培养的嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3的菌体长度显著长于不含蛋白胨成分和黏蛋白培养基培养的(图2:A,B,D,E,G,H)。嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*A.muciniphila*)菌体形态的改变有可能会改变菌体的代谢能力,及其在肠道内的定植能力。因此,本实施例在选择替换蛋白胨类成分的氮源方面,优选尿素。当尿素以10g/L的量替换蛋白胨(图3、表5:6号培养基)时,嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3的生长速度和生长量虽然低于含有蛋白胨成分培养基(图3、表5:9号培养基)培养的菌株,但仍高于现有培养基培养的菌株(图3、表1:1号和2号培养基)。同时,尿素成分不会导致嗜黏蛋白

阿克曼氏菌 *A.muciniphila* JF3 的菌体形态显著变长,能维持嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *A.muciniphila* JF3 的正常菌体形态(图2:A-H)。

[0050] 此外,表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG)对体内 *A.muciniphila* 的生长刺激作用已得到充分证明。EGCG 是从中国绿茶中提取的一种成份,它是绿茶主要的活性和水溶性成份,具有非常强的抗氧化活性,在抗癌和抗炎方面担当了重要的角色。且 EGCG 来源于植物绿茶提取,非动物源性,可食用,无毒副作用。通过将 EGCG 添加到 JF3 的培养基中(图3:6号培养基;表5),结果显示 EGCG 可以显著地促进 JF3 菌株的生长速度和生长量。

[0051] 表5 6和9号培养基新增成分比较表(在改良培养基基础成分的基础上增加)

成分	用量	6 培养基	9 培养基
[0053]	大豆蛋白胨	-	8.0 g/L
	酵母粉	30.0 g/L	30.0 g/L
	N-乙酰-D-半乳糖胺	25.0 g/L	25.0 g/L
	尿素	10.0 g/L	-
	EGCG	0.5 g/L	-

[0054] 实施例3降低生长培养基成本

[0055] 嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A.muciniphila*) 作为一种潜在的益生菌开发利用时,除了考虑体外培养基的安全性和菌株生理功能的全面性外,还需要考虑开发成本问题。而本实施例的6号培养基成分中,N-乙酰-D-半乳糖胺(D-GalNAc)是较为昂贵的,这大大增加了培养基成本。基于以上考虑,本实施例探究了D-GalNAc成分对嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *A.muciniphila* JF3 的体外生长的必要性。当D-GalNAc以25g/L的量添加到培养基中时,嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *A.muciniphila* JF3 的生长速度和生长量高于无D-GalNAc成分培养基培养的菌株(图4、表6:11号和12号培养基),但添加EGCG后,即使在无D-GalNAc培养基中,嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *A.muciniphila* JF3 的生长速度和生长量也不会低于现有培养基(图4、表1和表6:1、2和11号培养基)。

[0056] 此外,除了D-GalNAc成分外,尿素也不是必需的。当本实施例的培养基中含有D-GalNAc成分时,尿素的添加能有效提高嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *A.muciniphila* JF3 的生长速度和生长量(图4、表6:6和10号培养基);但当本实施例的培养基中不含有D-GalNAc成分时,尿素的添加反而会降低嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *A.muciniphila* JF3 的生长速度和生长量(图4、表6:10和11号培养基)。同时,无论是否添加D-GalNAc和/或尿素,EGCG并不会影响嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *A.muciniphila* JF3 的菌体形态(图5:A-E)。

[0057] 表6 5、6、10、11和12号培养基新增成分比较表(在改良培养基基础成分的基础上增加)

成分 \ 用量	6 号培养基	10 号培养基	11 号培养基	12 号培养基	5 号培养基
[0058] 酵母粉	30.0 g/L	30.0 g/L	30.0 g/L	30.0 g/L	30.0 g/L
N-乙酰-D-半乳糖胺	25.0 g/L	-	-	25.0 g/L	25.0 g/L
尿素	10.0 g/L	10.0 g/L	~	~	10.0 g/L
EGCG	0.5 g/L	~	0.5 g/L	~	~

[0059] 实施例4嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A.muciniphila*) 的大体积培养

[0060] 为了证明改良后的11号培养基具有大规模培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*A.muciniphila*) 的能力。本实施例将起始浓度 $OD_{600}=0.025$ 的嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *A.muciniphila* JF3接种到pH为6.5的500mL 11号培养基中,11号培养基含有30g/L酵母提取物,0.5g/L EGCG,0.5g/L磷酸二氢钾,1.5g/L磷酸氢二钠,1.0g/L氯化钠,4.5g/L葡萄糖,5.53g/L N-乙酰-葡糖胺,4g/L苏氨酸,4g/L脯氨酸,5mg/L L-半胱氨酸盐酸盐,1g/L丙酮酸钠,0.5g/L焦磷酸铁,5mg/L维生素K3。培养24h后,嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila* JF3的 OD_{600} 值能达到1.5,同时保持菌体正常的形态。这表明,11号培养基能成为嗜黏蛋白阿克曼氏菌*A.muciniphila*体外生长的一款理想培养基,既能促进JF3菌株优质生长,又能维持菌体正常形态。

[0061] 以上对本发明的实施方式作了详细说明,但本发明不限于所描述的实施方式。对于本领域的技术人员而言,在不脱离本发明原理和精神的情况下,对这些实施方式进行多种变化、修改、替换和变型,仍落入本发明的保护范围内。

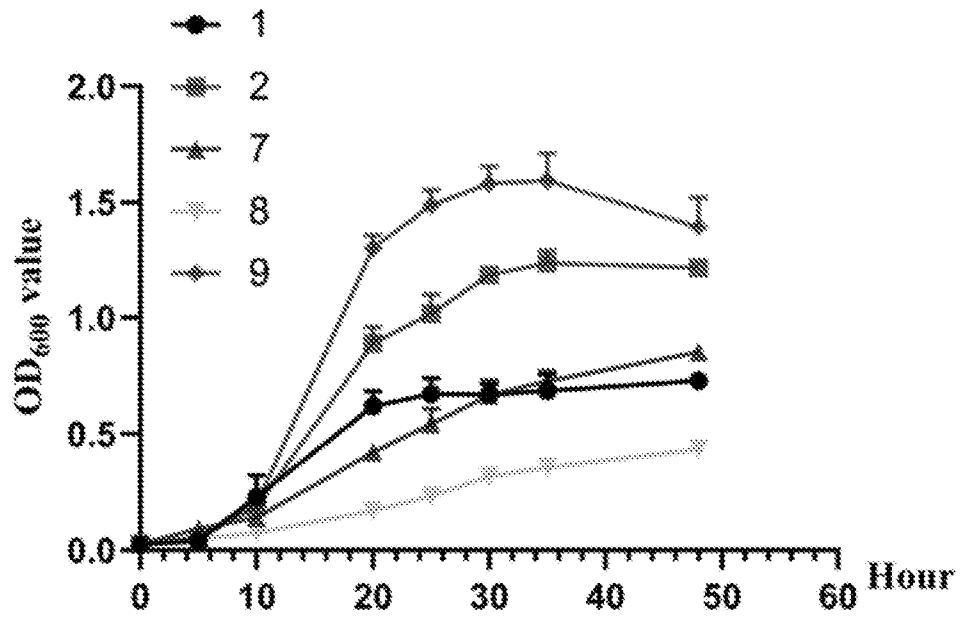


图1

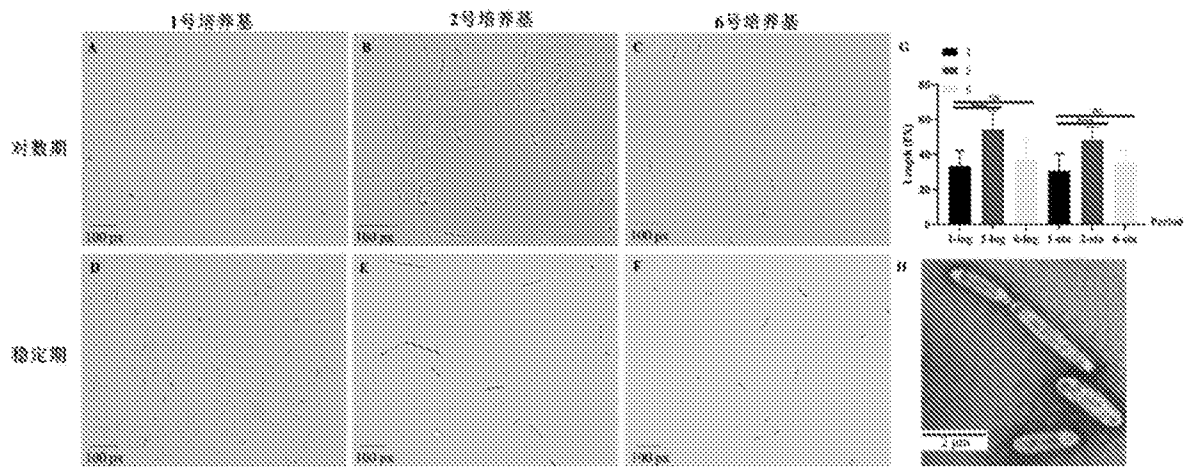


图2

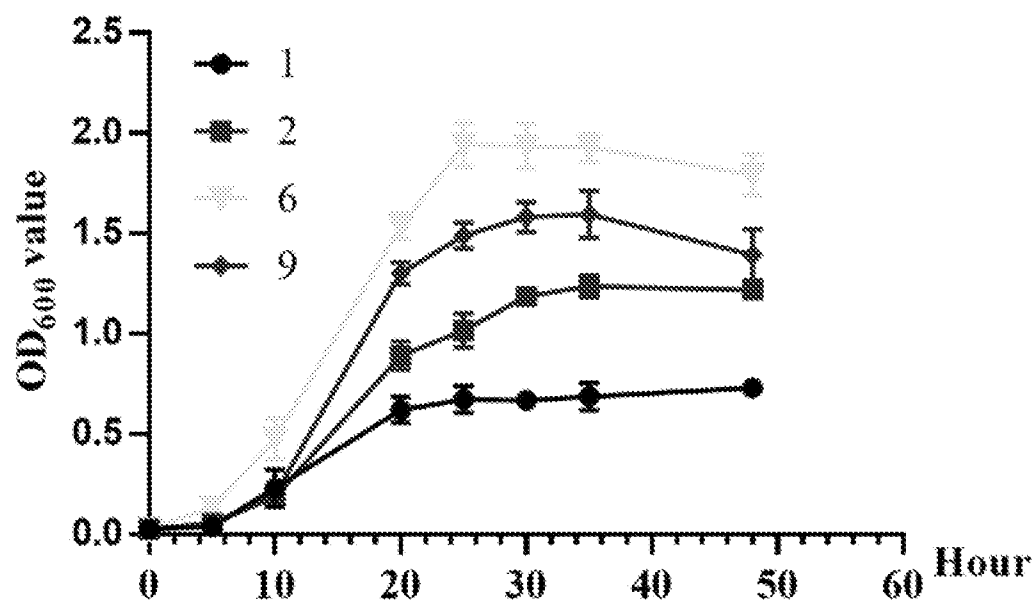


图3

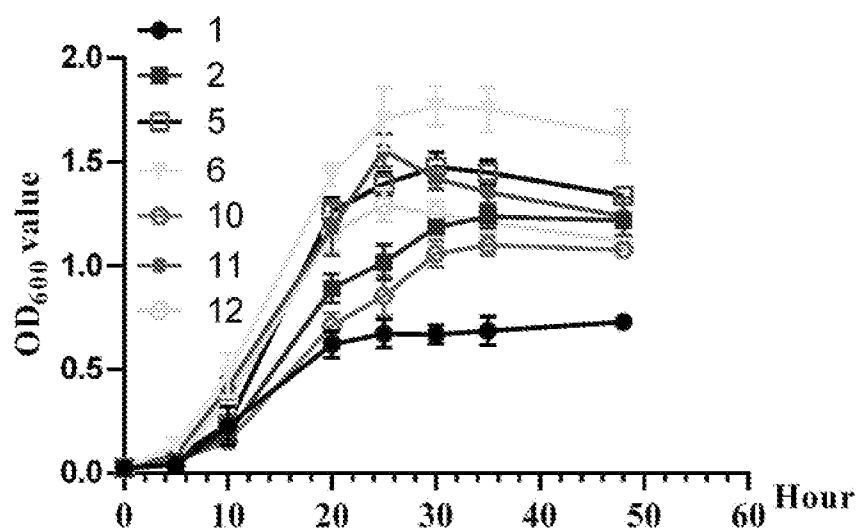


图4

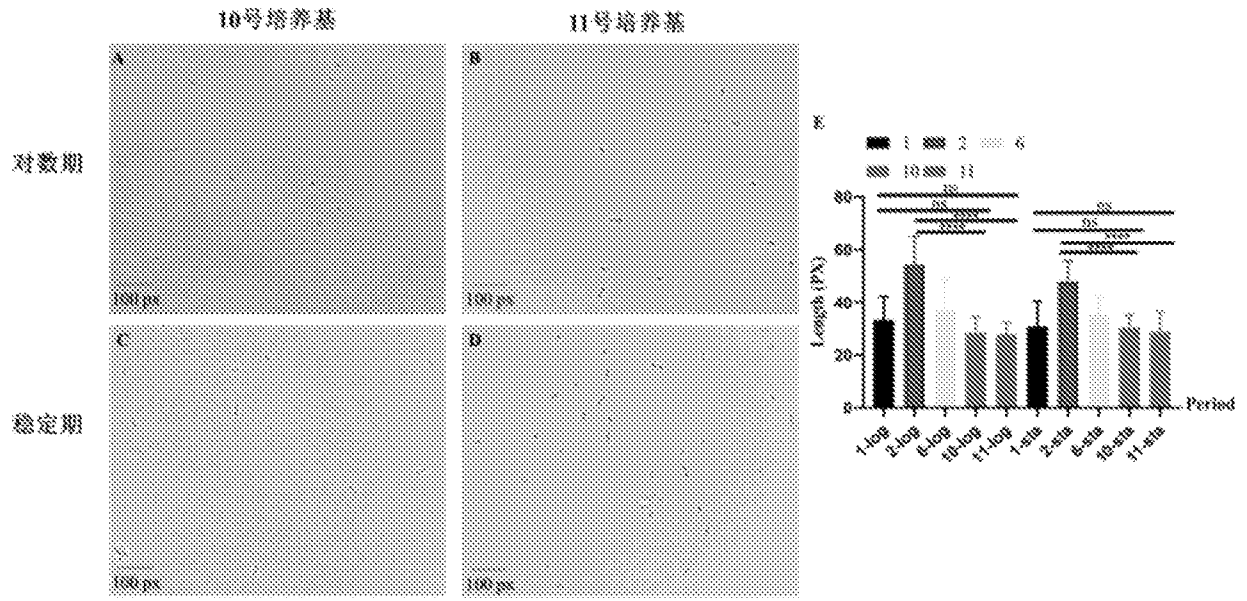


图5