



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110945116 A

(43)申请公布日 2020.03.31

(21)申请号 201880048611.X

(72)发明人 摩西·谢米什

(22)申请日 2018.05.29

(74)专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所

(30)优先权数据

PCT/IL2017/050603 2017.05.29 IL

代理人 翟羽

62/588,365 2017.11.19 US

(51)Int.Cl.

62/644,528 2018.03.18 US

C12N 1/20(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 1/38(2006.01)

2020.01.20

A61K 35/744(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C12R 1/125(2006.01)

PCT/IL2018/050588 2018.05.29

C12R 1/25(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/220630 EN 2018.12.06

(71)申请人 以色列国家农业部、农村发展农业

权利要求书2页 说明书34页 附图26页

研究组织·沃尔卡尼中心

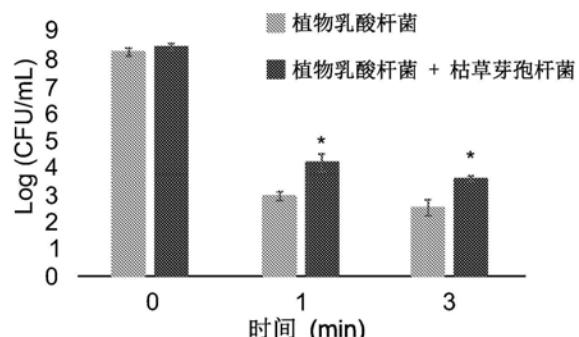
地址 以色列里雄莱锡安市

(54)发明名称

产生包含具有有益细菌的生物膜的细菌组合物的方法

(57)摘要

本发明公开了一种制备一细菌组合物的方法,所述方法包括:(a)在产生包含有益细菌及非病原性细菌的一生物膜的多个条件下,将所述有益细菌与制造生物膜的细菌在体外共培养在一生长基质中;及(b)从所述生长基质中分离所述生物膜。



1. 一种制备一细菌组合物的方法,其特征在于:所述方法包括:
 - (a) 在产生包含有益细菌及非病原性细菌的一生物膜的多个条件下,将所述有益细菌与制造生物膜的细菌在体外共培养在一生长基质中;及
 - (b) 从所述生长基质中分离所述生物膜,从而制备所述细菌组合物。
 2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述制造生物膜的细菌为非病原性细菌。
 3. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述制造生物膜的细菌为芽孢杆菌属。
 4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于:所述制造生物膜的细菌为枯草芽孢杆菌种。
 5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于:所述制造生物膜的细菌为127185/2菌株。
 6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述有益细菌为益生菌。
 7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述有益细菌经基因修饰以表达一治疗性多肽。
 8. 如权利要求6所述的方法,其特征在于:所述益生菌为乳酸杆菌目。
 9. 如权利要求6或8所述的方法,其特征在于:所述制造生物膜的细菌为枯草芽孢杆菌种。
 10. 如权利要求6或8所述的方法,其特征在于:所述益生菌为植物乳酸杆菌种。
 11. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述有益细菌用于生物修复。
 12. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述制造生物膜的细菌表达KinD-Spo0A途径的基因。
 13. 如权利要求1至10任一项所述的方法,其特征在于:所述生长基质包括一生长培养基。
 14. 如权利要求1至13任一项所述的方法,其特征在于:所述生长基质包括锰。
 15. 如权利要求1至14任一项所述的方法,其特征在于:所述生长基质包括右旋葡萄糖。
 16. 如权利要求13所述的方法,其特征在于:所述生长培养基是选自于由LB、LBGM、牛奶及MRS所组成的一群组。
 17. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:当所述制造生物膜的细菌为芽孢杆菌属而所述有益细菌为乳酸杆菌目时,所述生长基质为LBGM、牛奶或MRS。
 18. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:当所述制造生物膜的细菌为芽孢杆菌属时,所述生长基质包括锰。
 19. 如权利要求12、17或18任一项所述的方法,其特征在于:所述生长基质为MRS。
 20. 如权利要求17或19所述的方法,其特征在于:所述多个条件包括一pH值为约6.5至8。
 21. 如权利要求20所述的方法,其特征在于:所述多个条件包括一pH值为约6.8至7.5。
 22. 如权利要求1至21任一项所述的方法,其特征在于:所述生长基质包括乙偶姻。
 23. 如权利要求1至22任一项所述的方法,其特征在于:所述方法进一步包括:在所述分离后对所述生物膜进行脱水。
 24. 如权利要求1至23任一项所述的方法,其特征在于:所述有益细菌包括不超过50个细菌物种。
 25. 如权利要求1至24任一项所述的方法,其特征在于:所述制造生物膜的细菌为单一物种的制造生物膜的细菌。

26. 一种细菌组合物,其特征在于:所述细菌组合物可根据如权利要求1至23任一项所述的方法获得。

27. 如权利要求26所述的细菌组合物,其特征在于:所述组合物中的至少50%的细菌为活的。

28. 如权利要求26所述的细菌组合物,其特征在于:所述细菌组合物包括不超过50个细菌物种的有益细菌。

29. 如权利要求26或28所述的细菌组合物,其特征在于:所述细菌组合物包括一单一物种的非病原性细菌。

30. 如权利要求26所述的细菌组合物,其特征在于:所述细菌组合物为可食用的。

31. 如权利要求26所述的细菌组合物,其特征在于:所述细菌组合物为一益生菌组合物。

32. 如权利要求26或30所述的细菌组合物,其特征在于:所述细菌组合物被配制为粉末、一液体或一片剂。

33. 一种食物/饲料产品,其特征在于:所述食物/饲料产品包括如权利要求31所述的细菌组合物。

34. 一种改善或维持一对象的健康的方法,其特征在于:所述方法包括:向所述对象以一治疗有效量的如权利要求31所述的益生菌组合物进行给药,从而改善或维持所述对象的健康。

35. 一种选择有利于制备一细菌组合物的一试剂或一培养条件的方法,其特征在于:所述方法包括:在所述试剂存在下或在所述培养条件下,将有益细菌与制造生物膜的细菌共同培养在一生长基质中,从而产生包含所述有益细菌及所述制造生物膜的细菌的一生物膜,其中所述生物膜的一性质中的一变化指示所述试剂或所述培养条件对于制备所述细菌组合物为有利的。

36. 如权利要求35所述的方法,其特征在于:所述制造生物膜的细菌为芽孢杆菌属。

37. 如权利要求36所述的方法,其特征在于:所述制造生物膜的细菌为枯草芽孢杆菌种。

38. 如权利要求37所述的方法,其特征在于:所述有益细菌为益生菌。

39. 如权利要求38所述的方法,其特征在于:所述益生菌为乳酸杆菌目。

40. 如权利要求35所述的方法,其特征在于:所述试剂改变所述系统的一培养基的pH值。

产生包含具有有益细菌的生物膜的细菌组合物的方法

[0001] 技术领域及背景技术

[0002] 本发明在其一些实施例中涉及多种产生多个细菌组合物的方法,更具体但不限于涉及多个益生菌组合物、有益于环境的多个益生菌组合物及工业上使用的多个益生菌组合物。

[0003] 以多个足够数量进行施用的多个活微生物细胞赋予宿主一有益的生理作用,被称为“益生菌”。研究表明益生菌可以为所述宿主提供维持一健康的肠道及控制多种胃肠道感染的多个治疗效果。由于益生菌的多个健康益处,在过去的几十年中,益生菌已越来越多地掺入各种食品及饮料产品中。被用作益生菌的一些最常见的微生物类型为乳酸菌(LAB),主要属于乳酸杆菌及双歧杆菌属。这两个属都是人类肠道中的主要栖息者,具有一悠久的安全使用历史,并且被认为是GRAS(被普遍认为是安全的)。为了确保益生菌在体内的多个有益作用,所述多个生物必须在食品加工、储存及通过上消化道(GIT)的过程中存活下来,并存活到抵达所述益生菌的作用部位。然而,先前的研究表明,最终食品中益生菌的存活程度较低,并且所述益生菌在胃的多个高酸性条件及小肠中高胆汁浓度中的生存力大大降低。此外,益生菌通常以多个干燥的细菌粉末的形式提供,主要通过冷冻干燥制备,这已被确定为可能对多个细胞造成致命伤害的一程序。因此,需要开发旨在改善促进健康的细菌在食物生产过程以及通过所述储存及摄取过程中的存活的新技术,以维持向人类递送益生菌。

[0004] 在大多数的自然生态系统中,细菌偏好在被称为生物膜的复杂多细胞性细胞群落中生长,而不是作为多个自由生活(浮游生物)的细胞。生物膜的生长模式对于居住在肠道中的细菌也是优选的。在一生物膜中的多个细胞通过一细胞外基质结合在一起,所述细胞外基质主要由多糖及其他大分子(例如:蛋白质、DNA、脂质及核酸)组成,所述细胞外基质是由所述多个细胞自身产生的。嵌入所述生物膜的所述多个物种与其环境之间的相互作用导致形成一复杂的结构,能够抵抗环境压迫及暴露于多个抗菌剂。因此,生物膜的形成代表了在不同环境中的多个不利条件下的持续力的一策略。

[0005] 最为广泛研究的生物膜形成者中的一个为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),一种形成孢子的非病原性细菌,枯草芽孢杆菌的特征在于能够产生一坚固的生物膜。芽孢杆菌属主要是枯草芽孢杆菌,最近已作为益生菌微生物而受到关注,因为芽孢杆菌属主要通过在胃肠道中保持一良好的菌群平衡而对宿主健康状况产生积极的影响。由于枯草芽孢杆菌的多个孢子能够在多个极端的pH条件及低氧条件下生存,因此,大量休眠但有活力的微生物可能到达较低的肠道,这可能会通过分泌多个活性物质而产生一些有益的作用。此外,已发现枯草芽孢杆菌细胞可能通过产生过氧化氢酶及枯草杆菌蛋白酶(*subtilisin*)来增强乳酸杆菌属的生长及生存力(Hosoi、Ametani、Kiuchi及Kaminogawa,2000)。也有报道称由枯草芽孢杆菌产生的 γ 聚谷氨酸作为一细胞外基质的一部分可用于提高益生菌在冷冻干燥(A.R.Bhat等,2013)及储存期间(A.R.Bhat等,2015年)的存活。同样地,在模拟胃的酸性条件下的模拟胃液期间(A.R.Bhat等,2015)。

[0006] 额外的背景技术包括美国申请第20100203581号及Salas Jara等,《微生物》2016,4,35;及数字对象标识符(doi):10.3390。

发明内容

- [0007] 根据本发明的一方面,提供了一种制备一细菌组合物的方法,所述方法包括:
- [0008] (a) 在产生包含有益细菌及非病原性细菌的一生物膜的多个条件下,将所述有益细菌与制造生物膜的细菌在体外共培养在一生长基质中;及
- [0009] (b) 从所述生长基质中分离所述生物膜,从而制备所述细菌组合物。
- [0010] 根据本发明的一方面,提供了一种根据本说明书所述的多个方法可获得的细菌组合物。
- [0011] 根据本发明的一方面,提供了一种包含如本说明书所述的细菌组合物的食物/饲料产品。
- [0012] 根据本发明的一方面,提供了一种改善或维持一对象的健康的方法,所述方法包括:向所述对象以一治疗有效量的如本说明书所述的益生菌组合物进行给药,从而改善或维持所述对象的健康。
- [0013] 根据本发明的一方面,提供了一种选择有利于制备一细菌组合物的一试剂或一培养条件的方法,所述方法包括:在所述试剂存在下或在所述培养条件下,将有益细菌与制造生物膜的细菌共同培养在一生长基质中,从而产生包含所述有益细菌及所述制造生物膜的细菌的一生物膜,其中所述生物膜的一性质中的一变化指示所述试剂或所述培养条件对于制备所述细菌组合物为有利的。
- [0014] 根据本发明的多个实施例,所述制造生物膜的细菌为非病原性细菌。
- [0015] 根据本发明的多个实施例,所述制造生物膜的细菌为芽孢杆菌属。
- [0016] 根据本发明的多个实施例,所述制造生物膜的细菌为枯草芽孢杆菌种。
- [0017] 根据本发明的多个实施例,所述制造生物膜的细菌为127185/2菌株。
- [0018] 根据本发明的多个实施例,所述生长基质包括锰。
- [0019] 根据本发明的多个实施例,所述生长基质包括右旋葡萄糖。
- [0020] 根据本发明的多个实施例,当所述制造生物膜的细菌为芽孢杆菌属时,所述生长基质包括锰。
- [0021] 根据本发明的多个实施例,所述有益细菌为益生菌。
- [0022] 根据本发明的多个实施例,所述有益细菌经基因修饰以表达一治疗性多肽。
- [0023] 根据本发明的多个实施例,所述益生菌为乳酸杆菌目。
- [0024] 根据本发明的多个实施例,所述制造生物膜的细菌为枯草芽孢杆菌种。
- [0025] 根据本发明的多个实施例,所述益生菌为植物乳酸杆菌种。
- [0026] 根据本发明的多个实施例,所述有益细菌用于生物修复。
- [0027] 根据本发明的多个实施例,所述制造生物膜的细菌表达KinD-Spo0A途径的基因。
- [0028] 根据本发明的多个实施例,所述生长基质包括一生长培养基。
- [0029] 根据本发明的多个实施例,所述生长培养基是选自于由LB、LBGM、牛奶及MRS所组成的一群组。
- [0030] 根据本发明的多个实施例,当所述制造生物膜的细菌为芽孢杆菌属而所述有益细菌为乳酸杆菌目时,所述生长基质为LBGM、牛奶或MRS。
- [0031] 根据本发明的多个实施例,所述生长基质为MRS。
- [0032] 根据本发明的多个实施例,所述多个条件包括一pH值为约6.5至8。

- [0033] 根据本发明的多个实施例,所述多个条件包括一pH值为约6.8至7.5。
- [0034] 根据本发明的多个实施例,所述生长基质包括乙偶姻。
- [0035] 根据本发明的实施方式,所述方法进一步包括:在所述分离后对所述生物膜进行脱水。
- [0036] 根据本发明的多个实施例,所述有益细菌包括不超过50个细菌物种。
- [0037] 根据本发明的多个实施例,所述制造生物膜的细菌为一单一物种的制造生物膜的细菌。
- [0038] 根据本发明的多个实施例,所述组合物中的至少50%的细菌为活的。
- [0039] 根据本发明的多个实施例,所述细菌组合物包括不超过50个细菌物种的有益细菌。
- [0040] 根据本发明的多个实施例,所述细菌组合物包括一单一物种的非病原性细菌。
- [0041] 根据本发明的多个实施例,所述细菌组合物为可食用的。
- [0042] 根据本发明的多个实施例,所述细菌组合物为一益生菌组合物。
- [0043] 根据本发明的实施方式,所述细菌组合物被配制为一粉末、一液体或一片剂。
- [0044] 根据本发明的多个实施例,所述制造生物膜的细菌为芽孢杆菌属。
- [0045] 根据本发明的多个实施例,所述制造生物膜的细菌为枯草芽孢杆菌种。
- [0046] 根据本发明的多个实施例,所述有益细菌为益生菌。
- [0047] 根据本发明的多个实施例,所述益生菌为乳酸杆菌目。
- [0048] 根据本发明的多个实施例,所述试剂改变所述系统的一培养基的pH值。
- [0049] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术术语和/或科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的意义。虽然本发明的实施方式可以通过类似或等同于本发明的实施方式所述的任何方法和材料实施或测试,本发明的实施方式、列举的方法和/或材料已在下面描述。在冲突的情况下,将以本专利说明书并且包括定义为准。此外,材料、方法和实施方式仅是举例性质,并且不必然用以限制。

附图说明

[0050] 本发明的一些实施例在此仅通过举例的方式并参考多个附图来描述,通过详细说明附图具体的参考资料,应当强调所示的细节仅为举例,用以说明本发明实施例的目的。基于这点,结合所述附图及描述使得本领域技术人员能清楚的实施本发明的实施例。

[0051] 在附图中:

[0052] 图1A至1B是比较在中枯草芽孢杆菌及植物乳酸杆菌在共培养中生长的多个图表,共培养的产生对植物乳酸杆菌及枯草芽孢杆菌的生长没有影响(与在纯培养中生长相比),表示所述多个细菌之间没有拮抗作用。

[0053] 图2示出了经修饰的MRS培养基触发由枯草芽孢杆菌形成的生物膜的多个照片,使用立体显微镜分析MRS的所述pH修饰对枯草芽孢杆菌NCIB3610生物膜形成的影响。

[0054] 图3示出了LB与MRS培养基的组合触发枯草芽孢杆菌进行生物膜发育的多个照片,富含有多个不同浓度的MRS (pH 7) 的LB培养基对菌落(上排)及菌醭(下排)生物膜形成的影响。

[0055] 图4A至4B示出了LB与MRS培养基的组合触发枯草芽孢杆菌进行细胞外基质产生的

多个图表,增加MRS浓度会诱导 tapA-sipW-tasA (A) 及 epsA-0 (B) 操纵子的转录。

[0056] 图5A示出了MRS的所述生物膜刺激作用是由枯草芽孢杆菌中的先前描述的基质合成及生物膜形成信号传导途径调节的多个照片。比较了野生型 (WT) 及各种突变菌株在MRS (pH 7) 上的菌落发育及菌醭形成。此处使用的所述多个菌株如下:野生型 (NCIB3610)、 ΔkinCD (RL4577)、 ΔkinAB (RL4573)、 Δspo0A (RL4620)、 $\Delta \text{eps} \Delta \text{tasA}$ (RL4566)、 ΔabrB (YC668)。

[0057] 图5B示出了MRS在多个WT细胞中的作用相当于枯草芽孢杆菌中的所述多个过量产生基质的突变细胞 (ΔabrB) 的多个照片。

[0058] 图6示出了MRS在不同的芽孢杆菌属物种中诱导菌落生物膜形成的多个照片,MRS (pH 7) 培养基强烈地诱导了副地衣芽孢杆菌MS303、地衣芽孢杆菌MS310、地衣芽孢杆菌S127、枯草芽孢杆菌MS1577及蜡状芽孢杆菌10987的菌落型生物膜形成。

[0059] 图7示出了MRS在不同的芽孢杆菌属物种中诱导菌醭形成的多个照片,MRS (pH 7) 培养基强烈地诱导了副地衣芽孢杆菌MS303、地衣芽孢杆菌MS310、地衣芽孢杆菌S127、枯草芽孢杆菌MS1577及蜡状芽孢杆菌10987的菌醭形成。

[0060] 图8A至8B示出了枯草芽孢杆菌产生细胞外基质,同时与植物乳酸杆菌形成一双物种生物膜的多个图像。8A:在37°C及50每分钟转数 (rpm) 下的MRS pH 7中,枯草芽孢杆菌及植物乳酸杆菌共培养生物膜的多个CLSM图像。从左到右:使用荧光灯、诺马斯基 (Nomarski) 微分干涉对比 (DIC) 及合并后的图像所制作的图像,上排示出了荧光标记的枯草芽孢杆菌细胞持续性表达GFP的表达。下排示出了在 tapA 启动子的控制下,产生基质的枯草芽孢杆菌细胞表达CFP的表达。在所有图像中,多个植物乳酸杆菌细胞均未染色。8B:在LBGM培养基中枯草芽孢杆菌及植物乳酸杆菌的共培养生物膜的多个CLSM图像。从左到右:使用荧光灯、诺马斯基微分干涉对比 (DIC) 及合并后的图像所制作的图像。上排示出了荧光标记的枯草芽孢杆菌细胞持续性表达GFP的表达。下排示出了在 tapA 启动子控制下,产生基质的枯草芽孢杆菌细胞表达CFP的表达。在所有图像中,多个植物乳酸杆菌细胞均未染色。

[0061] 图9A至9C为 (A) 多个枯草芽孢杆菌细胞、(B) 多个植物乳酸杆菌细胞及 (C) 由枯草芽孢杆菌及植物乳酸杆菌组成的双物种生物膜的多个SEM图像。

[0062] 图10A至10B示出了双重物种生物膜促进暴露于多个不利条件下的植物乳酸杆菌的存活的多个图表。在 (A) 63°C下进行热处理1至3分钟及 (B) 在4°C下储存21天的过程中,确定植物乳酸杆菌细胞在枯草芽孢杆菌生物膜存在或不存在 (对照组) 时的存活,所示出的多个数值为以二重覆进行的至少三个独立实验的平均。 $*p < 0.05$

[0063] 图11A至11B为示出了枯草芽孢杆菌的所述细胞外基质在热处理的过程中促进植物乳酸杆菌的增加的存活的多个图表。A:测试了在63°C的温度下进行热处理3分钟对于WT 枯草芽孢杆菌及其衍生物、细胞外基质 ($\Delta \text{eps} \Delta \text{tasA}$) 的胞外多糖组分及蛋白组分中的一突变体缺失以及在多个基质基因的一阻遏物中的一突变体缺失的影响 (ΔabrB ; 过量产生生物膜基质)。所述多个示出的结果为以二重覆进行的至少三个独立实验的平均。 $*p < 0.05$ 。B:将所述多个样品在30°C、20每分钟转数的牛奶中生长18小时。然后将所述多个样品在63°C下进行热处理1至3分钟。多个对照组样品未经热处理,使用CFU方法确定多个存活的植物乳酸杆菌细胞的数目。 $*p < 0.05$

[0064] 图12示出了枯草芽孢杆菌生物膜的存在增加了植物乳酸杆菌在体外的胃及肠消

化(模型系统)期间存活的一图表。在体外的胃肠消化过程中确定植物乳酸杆菌细胞在存在或不存在(对照组)枯草芽孢杆菌生物膜的存活,所示出的多个结果是以二重覆进行的至少三个独立实验的平均。 $*p<0.05$

[0065] 图13为枯草芽孢杆菌3610NCIB在MRS (pH 7) 及LB中的多个生长曲线的一图表。

[0066] 图14为示出了在MRS pH 7中多个组氨酸激酶的多个突变对菌落表面结构及菌醭形成的影响的多个照片。

[0067] 图15A至15C为在存在及不存在丙酮酸的情况下,在LB培养基中温育24小时后,多个荧光标记的枯草芽孢杆菌细胞(Pspank-gfp)的多个CLSM图像。

[0068] 图16A至16B示出了乙偶姻触发枯草芽孢杆菌进行菌落型生物膜形成的多个照片。

[0069] 图17A至17D示出了乙偶姻导致负责枯草芽孢杆菌中的所述基质产生的所述tapA操纵子的转录发生高度上调的多个照片,在不促进生物膜形成的LB培养基中温育24小时后,带有所述PtapA-cfp转录融合的多个枯草芽孢杆菌细胞的多个CLSM图像。

[0070] 图18A至18B为描述分别由枯草芽孢杆菌菌株NCIB3610及127185/2产生的所述生物膜的多个照片。

[0071] 图19示出了在所述消化系统的在体外模型的过渡期间,植物乳酸杆菌在与枯草芽孢杆菌的共培养生物膜中生长的存活率的一图表。 $t=0$ 的多个培养物是所述实验的所述对照组。在所述类似胃的液体中温育后,植物乳酸杆菌+枯草芽孢杆菌127185/2的所述共培养显示出多个最高的存活率,植物乳酸杆菌+枯草芽孢杆菌NCIB3610的所述共培养的存活率显示出略高于单独的植物乳酸杆菌的存活率,进一步温育后,当维持多个不同的培养物中的多个存活率的趋势时,在类似肠的液体中会发生一显著的下降。

[0072] 图20示出了植物乳酸杆菌在高酸度水平下与枯草芽孢杆菌共培养的生物膜中生长的存活的一图表,在所述多个被测试的培养物中,符号“+”表示以50每分钟转数的振荡时的一生长,而符号“-”表示没有振荡时的生长。通常地,在从一pH 7到一pH 3的生长培养基的过渡中存活的植物乳酸杆菌的数量急剧减少,植物乳酸杆菌及枯草芽孢杆菌的所述多个共培养示出了过渡到一酸性环境及不摇动的情况下,植物乳酸杆菌的所述多个存活率的一降低幅度较小(与植物乳酸杆菌的单培养相比)。

[0073] 图21为示出了在改良的MRS中多个 Mn^{2+} 离子与枯草芽孢杆菌进行生物膜形成有关的多个照片,观察到排除一些MRS培养基成分(Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、乙酸钠、磷酸氢二钾、右旋葡萄糖、柠檬酸铵)对所述多个野生型枯草芽孢杆菌细胞的菌落发育及菌醭形成的多个影响。

具体实施方式

[0074] 本发明在其一些实施例中涉及多种产生细菌组合物的方法,更具体但不限于涉及多个益生菌组合物、有益于所述环境的多个益生菌组合物及工业上使用的多个益生菌组合物。

[0075] 在详细解释本发明的至少一个实施方式之前,应当理解本发明不一定限定于本发明的构造的细节,以及在以下描述和/或附图图示/或实施方式所阐述的组件和/或方法的排列。本发明能够以其他实施方式或以各种方法来实施或应用。

[0076] 细菌在经济上很重要,因为所述多个微生物被人们用于许多目的。细菌的多个有益用途包括:生产酸奶、奶酪及醋等多个传统食品;生物技术及基因工程、生产多个药物及

多个维生素等多个物质；农业；纤维脱胶；甲烷生产；多个有害生物的生物修复及生物防治。

[0077] 为了实现其目的，细菌常常暴露于多个苛刻的条件下，降低了细菌的生存力，并因此降低了细菌的有效性。

[0078] 例如，为了确保一益生菌在体内的有益作用，所述多个生物必须在食品加工、储存及通过上消化道 (GIT) 的过程中存活下来，并且存活到抵达其作用部位。然而，多个先前的研究表明，所述最终食品中的益生菌的存活程度较低，并且益生菌对胃的高酸性条件及小肠中高胆汁浓度的生存力大大降低。此外，益生菌通常以干燥的细菌粉末形式提供，主要通过冷冻干燥来制备，这已被确定为可能对多个细胞造成致命伤害的一程序。

[0079] 在对多个细菌生物膜进行研究的同时，本发明人注意到在多个合适的条件下，一制造生物膜的细菌可将一非制造生物膜的细菌并入其生物膜中，从而使所述非制造生物膜的细菌对多个极端温度具有更强的抵抗力 (冷及热；分别为图10A至10B及图11A至11B)。

[0080] 具体而言，本发明人将所述多个枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 物种的细菌与所述益生菌的植物乳酸杆菌 (*L. plantarum*) 一起共培养。本发明人示出在多个特定条件下，所述枯草芽孢杆菌产生了一生物膜，在所述生物膜中，所述植物乳酸杆菌被并入其细胞外基质中 (图9A)。与对照的未并入生物膜的植物乳酸杆菌相比，所述并入生物膜的植物乳酸杆菌已显示为更耐热、更耐寒及更耐酸。

[0081] 综上所述，本发明人提出可以将制造生物膜的细菌用于包封一非制造生物膜的细菌。因此，所述制造生物膜的细菌用于有益的非制造生物膜的细菌的一保护性载体。

[0082] 因此，根据本发明的第一方面，提供了一种制备一细菌组合物的方法，所述方法包括：

[0083] (a) 在产生包含有益细菌及非病原性细菌的一生物膜的多个条件下，将所述有益细菌与制造生物膜的细菌在体外共培养在一生长基质中；及

[0084] (b) 从所述生长基质中分离所述生物膜，从而制备所述细菌组合物。

[0085] 如本说明书所用，术语“细菌”是指一原核微生物，包括：古细菌。所述细菌可以是革兰氏阳性或革兰氏阴性，所述细菌也可以是光合细菌 (例如：蓝细菌)。

[0086] 如本说明书所用，术语“有益细菌”是指对人类产生一积极影响的任何细菌。

[0087] 在一实施例中，当所述有益细菌在多个标准的培养条件下作为一单培养物在一生长培养基中繁殖时不产生一生物膜。

[0088] 在另一实施例中，当所述有益细菌在最适于其繁殖的多个培养条件下作为一单培养物在一生长培养基中繁殖时不产生一生物膜。

[0089] 在另一实施例中，所述有益细菌利用KinD-Spo0A途径 (例如：表达组氨酸激酶 *kinD*、*spo0F*、*spo0B* 及/或 *spo0A* 的所述多个基因) - 参见例如：Shemesh及Chai, 2013细菌学杂志, 2013, 第195卷, 第2747至2754号, 第12页, 其内容通过引用合并于此。

[0090] 所述有益细菌可以是通常在Man、Rogosa 及 Sharpe 培养基、MRS (使用琼脂或MRS肉汤进行凝固) 中培养的细菌。

[0091] 有益细菌通常不应阻止 (即拮抗) 所述制造生物膜的细菌 (例如：枯草芽孢杆菌) 的所述生物膜形成能力。确定细菌当一起培养时是否具有对其他细菌的拮抗活性的方法是本领域已知的 (参见例如：图1A至1B)。在一实施例中，所述有益细菌不是土壤细菌。

[0092] 在本发明的所述方面的所述共培养物中可以培养任何数量的有益细菌的菌株。在

一实施例中,在一单一培养物中培养不超过500个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过250个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过100个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过90个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过80个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过70个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过60个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过50个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过40个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过30个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过20个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过10个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过9个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过8个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过7个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过6个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过5个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过4个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过3个不同菌株的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过2个不同菌株的有益细菌、在每一单一培养物中仅培养1个菌株的有益细菌。

[0093] 本发明的所述方面的一单一培养物的所述多个有益细菌菌株可以属于一单一物种或可以属于多个物种。优选地,一培养物的所述多个有益细菌菌株属于一单一细菌物种。在其他实施例中,多个有益细菌在一单一培养物中培养。优选地,在一单一培养物中培养不超过10个不同物种的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过9个不同物种的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过8个不同物种的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过7个不同物种的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过6个不同物种的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过5个不同物种的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过4个不同物种的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过3个不同物种的有益细菌、在一单一培养物中培养不超过2个不同物种的有益细菌、在一单一培养物中并培养1个物种的有益细菌。

[0094] 在一实施例中,所述有益细菌在被摄入时促进一人类的健康。在另一个实施方案中,所述有益细菌在工业上用于产生对人类有用的一产物(例如:甲烷、石油、杀虫剂等)。在另一实施例中,所述有益细菌用于食品工业。在另一实施例中,所述有益细菌用于青贮饲料接种物中。在又一实施例中,所述有益细菌用于在农业中支持多个植物的生长。在另一实施例中,所述有益细菌用于生物修复。

[0095] 在一实施例中,所述有益细菌为益生菌。

[0096] 本文所用的术语“益生菌”是指当以多个足够的数量进行施用时对宿主(例如:人们)具有一健康益处的活菌。

[0097] 在益生菌作用的多个主要机理中,有可能通过产生乳酸、过氧化氢及细菌素来抑制多个肠道病原体。通过阻断多个黏附位点、竞争多个营养物质及调节免疫系统(包括:减轻炎症)来竞争性排除多个肠道病原体。益生菌还为所述宿主提供多个益处,例如:减轻乳糖不耐症;通过同化作用降低胆固醇、肠道正常菌群的维持、改善毒素产生的抑制作用、肠中毒素受体的降解、正常肠道pH值的保留、增加肠道蠕动、并且有助于维持肠通透性的完整性。

[0098] 在一实施例中,所述有益细菌属于乳酸杆菌目(通常称为乳酸菌(LAB)),所述多个细菌为革兰氏阳性、低GC、耐酸、通常为无孢子、无呼吸的杆状或球菌状细菌,具有多个共同

的代谢及生理特征,所述多个细菌产生乳酸,作为碳水化合物发酵的主要代谢终产物。

[0099] 优选地,所述乳酸杆菌目的所述有益细菌是生长(并且通常被培养)在MRS琼脂(MRS)中的细菌。

[0100] 乳酸杆菌目的多个示例性、预期的属包括但不限于:乳酸杆菌属、明串珠菌属、片球菌属、乳球菌属、链球菌属、气球菌属、肉杆菌属、肠球菌属、羊球菌属、芽孢乳酸杆菌属、四联球菌属、徘徊球菌属及魏斯氏菌属。

[0101] 根据一优选的实施例,本发明的所述方面的所述有益细菌属于乳酸杆菌属。本发明预期的乳酸杆菌的多个示例性物种包括但不限于:*L.acetotolerans*、*L.acidifariniae*、*L.acidipiscis*、*L.acidophilus*、*L.agilis*、*L.algidus*、*L.alimentarius*、*L.amylolyticus*、*L.amylophilus*、*L.amylotrophicus*、*L.amylovorus*、*L.animalis*、*L.antri*、*L.apodemi*、*L.aviarius*、*L.bifermentans*、*L.brevis*、*L.buchneri*、*L.camelliae*、*L.casei*、*L.catenaformis*、*L.ceti*、*L.coleohominis*、*L.collinoides*、*L.composti*、*L.concavus*、*L.coryniformis*、*L.crispatus*、*L.crustorum*、*L.curvatus*、*L.delbrueckii* subsp.*bulgaricus*、*L.delbrueckii* subsp.*delbrueckii*、*L.delbrueckii* subsp.*lactis*、*L.dextrinicus*、*L.diolivorans*、*L.equi*、*L.equigenerosi*、*L.farraginis*、*L.farciminis*、*L.fermentum*、*L.fornicalis*、*L.fructivorans*、*L.frumenti*、*L.fuchuensis*、*L.gallinarum*、*L.gasseri*、*L.gastricus*、*L.ghanensis*、*L.hilgardii*、*L.homohiochii*、*L.iners*、*L.ingluviei*、*L.intestinalis*、*L.jensenii*、*L.johnsonii*、*L.kalixensis*、*L.kefirano faciens*、*L.kefiri*、*L.kimchii*、*L.kitasatonis*、*L.kunkeei*、*L.leichmannii*、*L.lindneri*、*L.malefermentans*、*L.mali*、*L.manihotivorans*、*L.mindensis*、*L.mucosae*、*L.murinus*、*L.nagelii*、*L.namurensis*、*L.nantensis*、*L.oligofermentans*、*L.oris*、*L.panis*、*L.pantheris*、*L.parabrevis*、*L.parabuchneri*、*L.paracasei*、*L.paracollinoides*、*L.parafarraginis*、*L.parakefiri*、*L.paralimentarius*、*L.paraplantarum*、*L.pentosus*、*L.perolens*、*L.plantarum*、*L.pontis*、*L.protectus*、*L.psittaci*、*L.rennini*、*L.reuteri*、*L.rhamnosus*、*L.rimae*、*L.rogosae*、*L.rossiae*、*L.ruminis*、*L.saerimneri*、*L.sakei*、*L.salivarius*、*L.sanfranciscensis*、*L.satsumensis*、*L.secaliphilus*、*L.sharpeae*、*L.siliginis*、*L.spicheri*、*L.suebicus*、*L.thailandensis*、*L.ultunensis*、*L.vaccinostercus*、*L.vaginalis*、*L.versmoldensis*、*L.vini*、*L.vitulinus*、*L.zeae*及*L.zymae*。

[0102] 在一个特定的实施例中,所述乳酸杆菌的物种为植物乳酸杆菌。

[0103] 本发明的所述方面的所述有益细菌可以产生一发酵产物。多个发酵产物的多个示例包括但不限于:益生元、生物燃料、甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、酒精燃料、蛋白质、重组蛋白质、维生素、氨基酸、有机酸(例如:乳酸、丙酸、乙酸、琥珀酸、苹果酸、谷氨酸、天冬氨酸及3-羟基丙酸)、酶、抗原、抗生素、有机化学药品、生物修复剂、防腐剂及代谢产物。

[0104] 因此,所述有益细菌可以被遗传修饰以表达一有益的多肽。

[0105] 所述多个有益的多肽可以是多个细胞内多肽(例如:一胞质蛋白)、跨膜多肽或分泌的多肽。多个蛋白质的异源性生产被广泛地用于研究及工业环境中,例如:用于生产治疗剂、疫苗、诊断剂、生物燃料以及许多其他感兴趣的应用。可以通过采用本发明的所述组合物及方法产生的多个示例性治疗性蛋白质包括但不限于:一些天然及重组的人类激素(例

如:胰岛素、生长激素、类胰岛素生长因子1、促卵泡激素及绒毛膜促性腺激素)、造血蛋白(例如:促红细胞生成素、C-CSF、GM-CSF及IL-11)、血栓形成及止血蛋白(例如:组织纤溶酶原激活剂及活化蛋白C)、免疫蛋白(例如:白介素)、抗体及其他酶(例如:脱氧核糖核酸酶I)。可以通过本发明的所述组合物及方法生产的多个示例性疫苗包括但不限于:针对各种流感病毒(例如:A、B及C型及针对每一类型的各种血清型,例如:针对A型流感的H5N2、H1N1、H3N2)病毒)、HIV、肝炎病毒(例如:A、B、C或D型肝炎)、莱姆病及人乳头瘤病毒(HPV)的疫苗。多个异源性生产的蛋白质诊断剂的多个示例包括但不限于:促胰液素、甲状腺刺激激素(TSH)、HIV抗原及C型肝炎抗原。

[0106] 异源多肽产生的蛋白质或肽可以包括但不限于:细胞因子、趋化因子、淋巴因子、配体、受体、激素、酶、抗体及抗体片段以及生长因子。多个受体的多个非限制性示例包括:第I型TNF受体、第II型IL-1受体、IL-1受体拮抗剂、IL-4受体及任何化学或遗传修饰的可溶性受体。多个酶的多个示例包括:乙酰胆碱酯酶、乳糖酶、活化的蛋白C、VII因子、胶原酶(例如:由先进生物制品公司以商品名Santyl销售);阿加糖酶β(例如:由Genzyme以商品名Fabrazyme销售);链道酶α(例如:基因泰克(Genentech)以商品名Pulmozyme销售);阿替普酶(例如:基因泰克以商品名Activase销售);聚乙二醇化的天冬酰胺酶(例如:由恩松(Enzon)以商品名Oncaspar销售);天冬酰胺酶(例如:默克公司以商品名Elspar销售);及伊米昔酶(例如:Genzyme以商品名Ceredase销售)。多个特定的多肽或蛋白质的多估示例包括但不限于:粒细胞巨噬细胞群落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞群落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞群落刺激因子(M-CSF)、群落刺激因子(CSF)、干扰素β(IFN-beta)、干扰素γ(IFN-gamma)、干扰素γ诱导因子I(IGIF)、转化生长因子β(IGF-beta)、RANTES(激活后被调节、正常T细胞表达且可能分泌)、巨噬细胞炎症蛋白(例如:MIP-1-α及MIP-1-β)、雷什曼尼亞(Leishmania)延伸起始因子(LEIF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、生长因子、例如:表皮生长因子(EGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、纤维母细胞生长因子(FGF)、神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养蛋白2(NT-2)、神经营养蛋白3(NT-3)、神经营养蛋白4(NT-4)、神经营养蛋白5(NT-5)、胶质细胞源性营养因子(GDNF)、睫状神经营养因子(CNTF)、TNFα第II型受体、促红细胞生成素(EPO)、胰岛素及可溶性糖蛋白,例如:gp120及gp160糖蛋白。

[0107] 所述gp120糖蛋白为一人类免疫缺陷病毒(WIV)包膜蛋白,而所述gp160糖蛋白为gp120糖蛋白的一已知的前体,其他示例包括:促胰液素、奈西立肽(nesiritide)(人类B型利钠肽(hBNP))及GYP-1。

[0108] 用于表达人类干扰素β1b的预期细菌包括:例如:大肠杆菌。

[0109] 用于表达人类干扰素γ的预期细菌包括:例如:大肠杆菌。

[0110] 用于表达人类生长激素的预期细菌包括:例如:大肠杆菌。

[0111] 用于表达人类胰岛素的预期细菌包括:例如:大肠杆菌。

[0112] 用于表达白介素II的预期细菌包括:例如:大肠杆菌。

[0113] 根据一特定的实施例,所述有益多肽为一抗体(例如:复迈(Humira)、類克(Remicade)、美罗华(Rituxan)、恩博(Enbrel)、安維汀(Avastin)、赫賽汀(Herceptin))。

[0114] 用于表达多个抗体的预期细菌包括:例如:大肠杆菌、短芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌及巨大芽孢杆菌。

[0115] 本发明预期的其他有益细菌包括:用作多个细菌疫苗的多个有益细菌。本发明预期的多个示例性疫苗包括但不限于:Vivotif Berna疫苗(伤寒疫苗、活疫苗)、Prevnar 13(肺炎球菌13价疫苗)、Menactra(脑膜炎球菌结合疫苗)、ActHIB(b型嗜血杆菌结合物(prp-t)疫苗)、Bexsero(B型脑膜炎球菌疫苗)、Biothrax(炭疽吸附疫苗)、Hiberix(b型嗜血杆菌结合物(prp-t)疫苗)、HibTITER(b型嗜血杆菌结合物(hboc)疫苗)、液体PedvaxHIB(b型嗜血杆菌结合物(prp-omp)疫苗)、MenHibrix(b型血友病结合物(prp-t)疫苗/脑膜炎球菌结合物疫苗)、menomune A/C/Y/W-135(脑膜炎球菌多糖疫苗)、Menveo(脑膜炎球菌结合物疫苗)、肺炎球菌23(新球菌23价疫苗)、Prevnar(7价肺炎球菌疫苗)、Te Anatoxal Berna(破伤风类毒素)、吸附破伤风类毒素(破伤风类毒素)、TheraCys(bcg)、Tice BCG(bcg)、Trumenba(脑膜炎球菌B组疫苗)、Typhim Vi(伤寒疫苗,灭活)、Vaxchora、霍乱疫苗、活体及Vivotif Berna(伤寒疫苗,活体)。

[0116] 其他预期的有益细菌为可用于生物修复的细菌,这样的补救措施包括:重金属、化学、辐射及碳氢化合物污染。

[0117] 以下列出了可用于生物修复的细菌的多个示例:

[0118] 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*):恶臭假单胞菌为一革兰氏阴性土壤细菌,其参与甲苯的生物修复,甲苯是油漆稀释剂的一成分,恶臭假单胞菌也能够在多个被污染的土壤中降解一石油精炼产品:萘。

[0119] 芳族脱氯单胞菌(*Dechloromonas aromatic*a):芳香族脱氯单胞菌为一棒状细菌,其可以氧化包括:苯甲酸酯、氯苯甲酸酯及甲苯在内的芳族化合物,与氧气、氯酸盐或硝酸盐的还原的反应结合。芳族脱氯单胞菌为唯一能够厌氧地氧化苯的生物。由于苯污染的可能性很高,尤其是在地下水及地表水中,芳香族脱氯单胞菌特别适用于所述物质的在原位生物修复。

[0120] 多个硝化菌及多个脱氮菌:工业上的生物修复被用于清洁废水。大多数处理系统依靠微生物活性来去除不需要的矿物质氮化合物(即氨、亚硝酸盐、硝酸盐)。氮的去除为一两阶段的过程,涉及硝化作用及脱氮作用。在硝化作用的过程中,欧洲亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*)将铵氧化为亚硝酸盐。然后,亚硝酸盐被汉堡硝化细菌等微生物进一步氧化为硝酸盐。在多个厌氧的条件下,在氨氧化作用中产生的硝酸盐被脱氮副球菌等微生物用作一终端电子受体,结果是氮气。通过所述过程,可以消除造成多个天然水体中富营养化的两种污染物:铵及硝酸盐。

[0121] 耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*):耐辐射球菌为一耐辐射的极端微生物,所述耐辐射的极端微生物经过基因工程改造,可以对多个溶剂及多个重金属进行生物修复。放射性杜氏球菌的一工程菌株已被证明可在多个放射性混合废物环境中降解离子汞及甲苯。

[0122] 在多个厌氧条件下,在氨氧化作用的过程中产生的硝酸盐被脱氮副球菌等微生物用作一终端电子受体,结果是氮气。通过所述过程,可以消除造成多个天然水体中富营养化的两种污染物:铵及硝酸盐。

[0123] 喜石甲基养菌(*Methylibium petroleiphilum*):喜石甲基养菌(正式的名称为PM1菌株)为一种能够进行甲基叔丁基醚(MTBE)生物修复的细菌,PM1通过使用所述污染物作为唯一的碳及能量来源来降解MTBE。

[0124] 泊库岛食烷菌 (*Alcanivorax borkumensis*)：泊库岛食烷菌为一海洋杆状细菌，所述海洋杆状细菌消耗多个碳氢化合物(例如：在燃料中的碳氢化合物)并且产生二氧化碳。海洋杆状细菌在受到石油破坏的环境中迅速生长，并且已用于帮助清除墨西哥湾的“深水地平线”漏油中的830,000加仑油，其他可以预期用来清除油脂的细菌包括：科尔韦尔氏菌 (*Colwellia*) 及尼普顿杆菌 (*Neptunibacter*)。

[0125] 如上所述，本发明的所述方面的所述方法考虑了将所述有益细菌与一制造生物膜的细菌一起培养。

[0126] 如本说明书所用的术语“生物膜”是指包含(例如：包埋或包封)在由细菌产生的多个细胞外聚合物的一基质中的一细菌群落。通常地，与自由地漂浮的浮游细菌相比，当所述细菌存在于所述生物膜中时在生长速率及基因转录方面表现出一改变的表现型。多个可能存在于所述生物膜中的多个细胞外聚合物质的多个示例包括：胞外多糖(例如：由所述epsA-0操纵子的所述多佑产物合成的胞外多糖)及多个淀粉状纤维(例如：由tapA-sipW-tasA操纵子编码的胞外多糖)。因此，所述基质通常包括：细胞外DNA及蛋白质，以及多个碳水化合物。

[0127] 应当理解，所述制造生物膜的细菌也可以是有益细菌。

[0128] 所述制造生物膜的细菌通常地与被并入所述生物膜中的所述有益细菌具有不同的目及/或属。因此，所述制造生物膜的细菌及所述有益细菌可以具有多个不同的菌株、种、属及/或目。

[0129] 优选地，所述制造生物膜的细菌为非病原性的(即不会对一人类造成物理性伤害或疾病)。

[0130] 在本发明的所述方面的所述共培养物中可以培养任何数量的制造生物膜的细菌的菌株。在一实施例中，在一单一培养物中培养不超过500个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过250个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过100个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过90个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过80个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过70个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过60个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过50个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过40个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过30个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过20个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过10个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过9个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过8个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过7个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过6个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过5个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过4个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过3个不同菌株的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过2个不同菌株的制造生物膜的细菌、或在一单一培养物中仅培养1个菌株的制造生物膜的细菌。

[0131] 本发明的所述方面的一单一培养物的所述多个制造生物膜的细菌菌株可以属于一单一物种或可以属于多个物种。优选地，一培养物的所述制造生物膜的细菌菌株属于一

单一细菌物种。在其他实施例中,在一单一培养物中培养多个生物膜产生细菌的物种。优选地,在一单一培养物中培养不超过10个不同物种的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过9个不同物种的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过8个不同物种的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过7个不同物种的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过6个不同物种的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过5个不同物种的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过4个不同物种的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过3个不同物种的制造生物膜的细菌、在一单一培养物中培养不超过2个不同物种的制造生物膜的细菌、或在每一单一培养物中仅培养1个不同物种的制造生物膜的细菌。

[0132] 在一实施例中,所述制造生物膜的细菌属于芽孢杆菌属。

[0133] 如本说明书所用,“所述芽孢杆菌属”包括本领域技术人员已知的所有成员,包括但不限于:*B. subtilis*、*B. licheniformis*、*B. lentus*、*B. brevis*、*B. stearothermophilus*、*B. alkalophilus*、*B. amyloliquefaciens*、*B. clausii*、*B. halodurans*、*B. megaterium*、*B. coagulans*、*B. circulans*、*B. lautus*及*B. thuringiensis*。公认的是,所述芽孢杆菌属继续进行分类学重组。因此,所述属旨在包括:多个已重新分类的物种,包括但不限于:例如:嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)的生物,其现在被称为“嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)”。“在有氧条件下产生多个抗性内生孢子被认为是芽孢杆菌属的定义性特征,尽管所述特征也适用于最近命名的:*Alicyclobacillus*、*Amphibacillus*、*Aneurinibacillus*、*Anoxybacillus*、*Brevibacillus*、*Filobacillus*、*Gracilibacillus*、*Halobacillus*、*Paenibacillus*、*Salibacillus*、*Thermobacillus*、*Ureibacillus*及*Virgibacillus*。

[0134] 在一实施例中,所述制造生物膜的细菌为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)种。

[0135] 本发明预期的枯草芽孢杆菌的多个示例性菌株包括但不限于:枯草芽孢杆菌MS1577及127185/2(MS302;乳制品分离株)及NCIB3610。

[0136] 本发明预期的副地衣芽孢杆菌的多个示例性菌株包括但不限于:副地衣芽孢杆菌MS303及副地衣芽孢杆菌S127。

[0137] 本发明预期的地衣芽孢杆菌的多个示例性菌株包括但不限于:地衣芽孢杆菌MS310及地衣芽孢杆菌MS307。

[0138] 根据一特定的实施例,所述制造生物膜的细菌不包含蜡状芽孢杆菌种。

[0139] 为了产生一培养物,通常将所述有益培养物及所述产生生物膜的培养物分别培养,以产生一起始物培养物(starter culture)。通常选定所述起始物培养物的所述培养基及多个条件,以优化每一所述细菌的生长。

[0140] 多个预期的起始培养物包括:一干燥的起始物培养物、一脱水的起始物培养物、一冷冻的起始物培养物或一浓缩的起始物培养物。

[0141] 所述起始物培养物生长至少2小时、4小时、8小时、12小时,直到有一足够数量的细菌繁殖。

[0142] 根据一特定的实施方案,所述方法包括一培养的方法,其中所述有益细菌为所述乳酸杆菌属(例如:植物乳酸杆菌种),而所述制造生物膜的细菌为所述芽孢杆菌属(例如:枯草芽孢杆菌种)。

[0143] 选择将所述有益细菌与所述制造生物膜的细菌共培养的所述方法,使得所述方法能够使两物种型的微生物繁殖,并且将两种微生物掺入所述生物膜中。

[0144] 在一实施例中,在通常用于培养一有益细菌的所述生长基质中(或上)进行所述共培养。所述生长基质可以是一固体或一液体介质。优选地,在所述培养过程中振荡所述共培养物。

[0145] 可用于培养细菌的多个生长基质的多个示例包括但不限于:MRS培养基、LB培养基、TBS培养基、酵母提取物、大豆蛋白胨、酪蛋白胨及肉蛋白胨。

[0146] 多个介质的其他示例在以下的表1中列出。

[0147] 表1:

贫养菌(Abiotrophia)培养基 - 适用于贫养菌属生长的培养基配方
乙酰胺培养基 - 乙酰胺培养基配方。
醋桿菌(Acetobacter)培养基 - 适合醋桿菌属生长的培养基配方。
[0148] 放线菌(Actinoplanes)培养基 - 用于培养一些放线菌属的培养基。
农杆菌(Agrobacterium)琼脂配方 - 适合农杆菌属生长的琼脂。
脂酸芽孢杆菌(Alicyclobacillus)琼脂 - 用于脂酸芽孢桿菌属的琼脂配方。

[0149]

脂酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus*)培养基 - 用于脂酸芽孢杆菌属的培养基配方。

尿囊素矿物琼脂 - 尿囊素最小琼脂的制备配方。

尿囊素矿物培养基 - 尿囊素最小培养基的制备配方。

阿什比(*Ashbya*)全培养基 - 生产阿什比全培养基的配方。

固氮菌(*Azotobacter*)琼脂 - 适合固氮菌属生长的琼脂。

贝内特(*Bennett's*)的培养基 - 用于一些放线菌种的生长的培养基。

芽孢杆菌(*Bacillus*)琼脂 - 用来培养一些芽孢杆菌的琼脂。

芽孢杆菌(*Bacillus*)肉汤 - 用来培养一些芽孢杆菌的琼脂。

施氏芽孢杆菌(*Bacillus schlegelii*)培养基 - 适合施氏芽孢杆菌生长的培养基。

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)培养基 - 用于双歧杆菌培养基的配方。

蓝绿藻琼脂 - 用于蓝绿藻琼脂的配方。

蓝绿藻肉汤 - 用于蓝绿藻肉汤的配方。

脑心灌注葡萄糖琼脂 - 用于脑心灌注葡萄糖琼脂的配方。

柄杆菌(*Caulobacter*)琼脂 - 用于柄杆菌琼脂的配方。

柄杆菌(*Caulobacter*)培养基 - 用于柄杆菌培养基的配方。

鸡油菌(*Cantharellus*)琼脂配方 - 用于鸡油菌琼脂的配方。

CASO琼脂 - 用于CASO琼脂的配方。

热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)培养基 - 适合热纤梭菌生长的培养基配方

[0150]

棒状杆菌(Corynebacterium)琼脂 - 用于棒状杆菌琼脂的配方。
肌酐培养基 - 用于肌酐培养基的生产配方。
曹派克(Czapek)琼脂(CZA) - 曹派克琼脂(CZA)的配方。
脱硫弧菌(Desulfovibrio)培养基 - 用于脱硫弧菌培养基的配方。
葡萄糖杆菌(Gluconobacter)琼脂 - 用于葡萄糖杆菌的配方
葡萄糖蛋白胨酵母提取物琼脂(GPYA) - 用于葡萄糖蛋白胨酵母提取物琼脂(GPYA)的配方。
葡萄糖酵母提取物琼脂 - 用于葡萄糖酵母提取物琼脂的配方。
嗜盐杆菌(Halobacterium)琼脂 - 用于制备嗜盐杆菌嗜盐细菌的配方
嗜盐杆菌(Halobacterium)培养基 - 用于嗜盐细菌培养基的配方。
LB 琼脂 - 用于制备 LB 琼脂细菌培养基的配方。
LB 肉汤 - 用于制备 LB 肉汤细菌培养基的配方。
LB 肉汤(低盐) - 用于制备低盐的 LB 肉汤细菌培养基的配方。
发光培养基 - 发光培养基的配方。
M17 培养基-用于制备 M17 培养基的配方。
M9 基本培养基 - 最小的盐分细菌培养基。
甘露醇琼脂 - 用于甘露醇琼脂的配方。
甘露醇肉汤 - 用于甘露醇肉汤的配方。
海洋琼脂 - 用于海洋琼脂的配方，用于几种海洋细菌的生长。

[0151]

海洋肉汤 - 用于海洋肉汤的配方，用于几种海洋细菌的生长。
甲胺盐琼脂 - 用于甲胺盐琼脂的配方
甲胺盐培养基 - 用于甲胺盐培养基的配方
改良的碎肉培养基 - 用于多种厌氧细菌的生长。
MY 培养基 - 麦芽糖酵母提取物细菌生长培养基。
N4 矿物培养基 - 用于生产 N4 矿物培养基的配方。
欧洲亚硝化单胞菌(Nitrosomonas europaea)培养基 - 用于生产欧洲亚硝化单胞菌培养基的配方。
营养琼脂 - 适用于多种细菌物种生长的营养琼脂的配方。
营养肉汤 - 适用于多种细菌物种生长的营养肉汤的配方。
MRS 培养基 - 用于 MRS 培养基的配方，MRS 培养基已用于从各种食品中回收乳酸菌(LAB)。
MS 培养基 - 用于 MS 培养基的配方。
具有可溶性淀粉及葡萄糖的 N-Z 胺琼脂 - 用于使一些猕猴桃种生长的琼脂
NZCYM - NZ 胺、NaCl、细菌酵母提取物、酪蛋白氨基酸及硫酸镁。
NZM - NZ 胺、NaCl 及硫酸镁。
NZYM - NZ 胺、NaCl、细菌酵母提取物及硫酸镁。
燕麦琼脂 - 用于使一些猕猴桃种生长的琼脂。
乳球菌(Oenococcus)培养基 - 用于制备乳球菌培养基的配方。
耐渗压琼脂 - 用于耐渗压琼脂的配方。

[0152]

耐渗压培养基 - 用于耐渗压培养基配方。
酚红乳糖肉汤 - 当乳糖发酵后变为黄色。
马铃薯胡萝卜培养基 - 琼脂, 用于生长一些放线菌种。
丙酸杆菌琼脂配方 - 适用于丙酸杆菌生长的琼脂。
丙酸杆菌培养基配方 - 适用于丙酸杆菌生长的培养基。
PYS 琼脂 - 用于使一些猕猴桃菌种生长的琼脂。
R 培养基 - R 培养基的配方。
燕麦片矿物琼脂 - 用于燕麦片矿物琼脂的配方。
蔗糖琼脂 - 用于生产蔗糖琼脂的配方
蔗糖培养基 - 用于生产蔗糖培养基的配方
SOB 培养基 - 胰蛋白胨/酵母提取物的细菌培养基。
SOC 培养基 - 胰蛋白胨/酵母提取物的细菌培养基。
5% 山梨糖醇琼脂 - 用于生产 5% 山梨糖醇的配方
5% 山梨糖醇培养基 - 用于生产 5% 山梨糖醇培养基的配方。
酸面团培养基 - 用于制备酸面团培养基的配方。
淀粉矿物盐(STMS)琼脂 - 用于淀粉矿物盐(STMS)琼脂的配方。
苯乙烯矿物盐培养基 - 用于苯乙烯矿物盐培养基的配方。
极品肉汤 - 用于制备极品肉汤细菌培养基的配方。

[0153]

栖热菌(Thermus)琼脂 - 适用于栖热菌属生长的琼脂的配方
栖热菌(Thermus) 培养基 - 适用于栖热菌属生长的培养基的配方
硫杆菌(Thiobacillus)培养基 F2 - 用于生产硫杆菌培养基 F2 的配方
番茄汁琼脂 - 用于制备番茄汁琼脂的配方。
番茄汁培养基 - 用于制备番茄汁培养基的配方。
番茄汁酵母提取物琼脂 - 用于制备番茄汁酵母提取物琼脂的配方。
番茄汁酵母提取物培养基 - 用于制备番茄汁酵母提取物培养基的配方。
TSY 琼脂 - 胰蛋白酶大豆琼脂的配方。
TSY 肉汤 - 胰蛋白酶大豆酵母汤的配方。
TYG 培养基 - 胰蛋白胨、酵母菌、葡萄糖细菌生长培养基。
TYX 培养基 - 胰蛋白胨、酵母菌、木糖细菌生长培养基。
尿素培养基 - 用于制备尿素培养基的配方
尿酸培养基 - 用于制备尿酸培养基的配方
乳清琼脂 - 用于制备乳清琼脂的配方
乳清培养基 - 用于制备乳清培养基的配方。
柳条咸琼脂 - 柳条咸琼脂的配方。
威克勒姆(Wickerham)盐培养基 - 威克勒姆盐培养基的配方。
酵母提取物葡萄糖培养基 - 酵母提取物葡萄糖培养基配方

[0154]

YEL 琼脂 - 用于 YEL 琼脂的配方。
YMF 琼脂配方 - 用于制备 YMF 琼脂的配方
YMF 培养基配方 - 用于制备 YMF 培养基的配方。
YMG 琼脂 - 用于具有葡萄糖琼脂配制酵母提取物及麦芽提取物的配方, 所述琼脂用于链霉菌属的多个物种。
YMG 培养基 - 用于具有葡萄糖培养基的酵母提取物及麦芽提取物的配方, 所述培养基用于链霉菌属的多个物种。
YPD 琼脂 - 酵母提取物/蛋白胨/葡萄糖细菌琼脂。
YPD 培养基 - 酵母提取物/蛋白胨/葡萄糖培养基。
YPG 培养基 - 酵母提取物/蛋白胨/半乳糖细菌培养基。
YPM 琼脂 - 用于 YPM 琼脂的配方。
YPM 培养基 - 用于 YPM 培养基的配方。
YT(2x) - 酵母提取物/胰蛋白胨细菌培养基。

[0155] 因此,例如:在所述有益细菌为乳酸杆菌属(例如:植物乳酸杆菌)及所述制造生物膜的细菌为芽孢杆菌属(例如:枯草芽孢杆菌)的情况下,所述共培养可以在包含LBGM、牛奶或MRS的一生长基质中进行。可用于产生本发明的所述共培养物的其他培养基包括:MSgg基本培养基(Shemesh,M.等(2010),《细菌》192,6352-6356);富含乳糖的LB:Duanis-Assaf D.等(2016),《微生物学前沿》6:1517;添加丁酸的LB:Pasvolsky R.等,《国际食品微生物学杂志》181C:19-27。通常选择鼓励将两种不同细菌并入所述生物膜的所述多个培养条件。

[0156] 本发明人发现一生长培养基的多个特定成分对于芽孢杆菌属(例如:枯草芽孢杆菌种)的细菌的生物膜产生是重要的-请参照图21。因此,本发明人提出用于将一有益细菌与芽孢杆菌共培养的所述培养基包括:锰。在另一实施例中,所述培养基包含:葡萄糖。在另一实施例中,用于共培养的所述培养基包括:锰及葡萄糖。

[0157] 因此,根据本发明的另一方面,提供了一种选择有利于制备一细菌组合物的一试剂或培养条件的方法,所述方法包括:在所述试剂存在下或在所述培养条件下,将有益细菌与制造生物膜的细菌共同培养在一生长基质中,从而产生包含所述有益细菌及所述制造生物膜的细菌的一生物膜,其中所述生物膜的一性质中的一变化指示所述试剂或所述培养条件对于制备所述细菌组合物为有利的。

[0158] 可改变的所述共培养物的多个示例性条件包括:在其上进行所述培养的所述表面的所述多个性质(例如:所述固体表面的所述表面化学,包括但不限于:官能团、静电荷、涂层;表面粗糙度、表面形貌,包括但不限于:凹槽、空腔、突脊、孔洞、六方最密堆积(HP)柱体、

被HP柱体包围的等边三角形以及沙克莱特(Sharklet)形貌等)。所述固体表面可以具有一限定的几何形状及/或形貌,使得所述固体表面促进所述有益细菌的包封/并入所述生物膜中。此外,所述固体表面可以具有一限定的几何形状及/或形貌,使得所述固体表面促进一特定厚度的一生物膜的产生。在Graham及Cady,《涂层》,2014,4,第37-59页中描述了本发明预期的其他形貌图案,其内容通过引用并入本说明书中。

[0159] 可以在其上进行培养的多个示例性固体表面包括:各种各样的基质,涵盖了从各种聚合材料(有机硅、聚苯乙烯、聚氨酯及环氧树脂)到金属及金属氧化物(硅、钛、铝、二氧化硅及金)。为了改变所述固体表面的所述形貌,可以在所述多个材料上进行多个制造技术(软光刻及双铸成型技术、微接触印刷、电子束光刻、纳米压印光刻、光刻、电沉积方法等)。

[0160] 可改变的所述共培养的其他条件包括但不限于:多个环境参数,例如:pH、营养物浓度、所述有益细菌与制造生物膜的细菌之间的比例及温度。

[0161] 在一实施例中,所述共培养在一生物反应器中进行。

[0162] 如本说明书所用的术语“生物反应器”是指适于支撑本发明的所述生物膜的一设备。

[0163] 所述生物反应器通常会包括一个或多个用于所述生物膜的支撑件,所述生物膜可以在所述支撑件上形成一膜体,并且其中所述支撑件适于提供一显著的表面积,以增强所述生物膜的形成,本发明的所述多个生物反应器可以适于连续的生产量。

[0164] 应当理解,当在一生物反应器系统中产生所述生物膜时,可以通过改变所述系统的所述多个微流体(例如:纯粹的应力)来改变所述共培养的所述多个条件。

[0165] 如所提及的,选定所述引起所述生物膜的一性质的一有利的改变的所述多个试剂或多个条件。在一实施例中,所述性质为生物膜的一数量。在一实施例中,所述性质为生物膜的一厚度。在另一实施例中,所述性质为生物膜的一密度。在又一实施例中,所述性质为所述生物膜形成的速率。在又一实施例中,所述性质为并入所述生物膜中的有益细菌的数量。在又一实施例中,所述性质为对温度及/或pH值的抗性。

[0166] 在又一实施例中,所述性质为在一段时间内从所述生物膜中释放的有益细菌的数量,这在需要控制释放所述有益细菌时可能特别重要。例如:将对皮肤、头皮或牙科应用有益的细菌并入多个生物膜中可能是有利的,其中从中选择所述有益细菌的所述释放速率,以获得最大的治疗效果。

[0167] 本发明人现已发现,当培养在MRS中时,将所述生长基质的所述pH值改变为高于6,会促使利用KinD-Spo0A途径的细菌(例如:芽孢杆菌属,例如:枯草芽孢杆菌)并入在一生物膜中。

[0168] 在一实施例中,进行所述有益细菌为乳酸杆菌属(例如:植物乳酸杆菌)及所述制造生物膜的细菌为芽孢杆菌属(例如:枯草芽孢杆菌)的共培养或在LBGM牛奶或MRS(更具体地说是MRS)上,并且在一pH值为6.5至9;6.5至8;6.5至7.5;6.8至9;6.8至8;6.8至7.5。

[0169] 在一特定的实施例中,当在牛奶中进行共培养时,所述制造生物膜的细菌不是枯草芽孢杆菌MS 1577或3610。

[0170] 本发明的所述方面的所述共培养可以在多个添加剂的存在下进行,所述添加剂用于增加所述细菌的繁殖及/或加强生物膜的形成,这样的多个试剂包括:例如:乙偶姻。

[0171] 可以改变乙偶姻的数量及添加时间,以促进最佳的生物膜生产。在一实施例中,使

用约0.01至5%的乙醛。在另一实施例中,使用约0.01至4%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.01至3%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.01至2%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.01至1%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.01至0.5%的乙偶姻。

[0172] 因此,本发明人预期了一种培养物:包括乙偶姻、包括一芽孢杆菌的一生物膜及一培养基。在一实施例中,所述培养基是表1中提及的所述培养基(例如:LB)。

[0173] 在一实施例中,使用约0.05至5%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.05至4%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.05至3%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.05至2%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.05至1%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.05至0.5%的乙偶姻。

[0174] 在一实施例中,使用约0.1至5%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.1至4%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.1至3%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.1至2%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.1至1%的乙偶姻。在另一实施例中,使用约0.1至0.5%的乙偶姻。

[0175] 使本发明的所述方面的所述多个共培养物进行繁殖至足以产生一生物膜的一时间长度,所述生物膜并入所述有益细菌及所述生物膜产生细菌。

[0176] 根据一实施例,将所述多个共培养物生长至所述有益细菌的最大平台生长期,此时可以收获所述多个共培养物,以得到最大的生物膜的生产量。

[0177] 根据另一实施例,将所述多个共培养物生长至所述制造生物膜的细菌的最大平台生长期,此时可以采收所述多个共培养物,以得到最大的生物膜的生产量。

[0178] 因此,可以将所述细菌培养至少3小时、至少6小时、至少12小时、至少24小时、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更长时间。在一实施例中,所述细菌的培养时间不超过1周、2周、3周、4周、5周或6周。

[0179] 一旦繁殖了足够数量的有益细菌(并且将所述有益细菌包封在所述生物膜中),便会采收所述生物膜(即从所述生长基质中去除)。

[0180] 从所述生长基质中分离后,可对所述生物膜(及/或并入所述生物膜中的细菌)进行干燥(即脱水)、冷冻、喷雾干燥或冷冻干燥。优选地,以保持所述细菌的所述生存力的方式处理所述生物膜。

[0181] 因此,根据本发明的另一方面,提供了如本说明书中描述的一种可获得的细菌组合物的方法。

[0182] 存在于所述细菌组合物中的所述制造生物膜的细菌的一用量为每公克的所述细菌组合物(例如:益生菌组合物)中含有 10^3 至 10^{15} 个菌落形成单位。

[0183] 在所述组合物中的非细胞材料(例如:胞外多糖及/或多个淀粉样蛋白纤维)的所述用量(以重量计)可以高于细胞材料(例如:细菌细胞)的所述用量(以重量计)。例如:所述组合物中的非细胞材料(例如:胞外多糖及/或多个淀粉样纤维)的重量可以比所述组合物中细胞材料(例如细菌细胞)的重量高至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0184] 所述组合物中的非细胞材料(例如:胞外多糖及/或多个淀粉样纤维)的所述用量(以重量计)可以低于细胞材料(例如:细菌细胞)的所述用量(以重量计)。例如:所述组合物中的细胞材料(例如:多个细菌细胞)的重量可以比组合物中的非细胞材料(例如:胞外多糖

及/或多个淀粉状纤维)的重量高至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0185] 因此,本说明书中所述的组合物中的非细胞材料(例如:胞外多糖):多个细菌细胞的所述重量比可以在99:1至1:99之间。在一些实施例中,本说明书中所述的组合物中的非细胞材料(例如:胞外多糖):多个细菌细胞的所述重量比可以在99:1至50:50之间。在一些实施例中,本说明书中所述的组合物中的非细胞材料(例如:胞外多糖):多个细菌细胞的所述重量比可以在99:1至70:30之间。

[0186] 在一实施例中,所述细菌组合物为一益生菌组合物。

[0187] 在一些实施例中,所述益生菌组合物包括在每克的成品中包含约 10^3 至 10^{15} 个菌落形成单位(“CFU”的所述制造生物膜的微生物。在一些实施例中,所述益生菌组合物包括在每克的成品中包含约 10^4 至约 10^{14} CFU的所述制造生物膜的微生物。在一些实施例中,所述益生菌组合物包括在每克的成品中包含约 10^5 至约 10^{15} CFU的所述制造生物膜的微生物。在一些实施例中,所述益生菌组合物包括在每克的成品中包含约 10^6 至约 10^{11} CFU的所述制造生物膜的微生物。在一些实施例中,所述益生菌组合物包括在每克的成品中包含约 10^2 至约 10^5 CFU的所述制造生物膜的微生物。

[0188] 应当理解,所述组合物中的所述有益细菌的至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或以上是存活的(即繁殖的)。此外,所述组合物中的所述制造生物膜的细菌中至少有20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或以上是存活的(即繁殖的)。

[0189] 根据一具体的实施例,所述细菌组合物为一益生菌组合物。

[0190] 所述益生菌组合物中可存在的示例性有益细菌为属于乳酸杆菌属的有益细菌(如上所述)。

[0191] 所述益生菌组合物可以包括:额外的有益细菌,例如:属于双歧杆菌属的细菌。可能存在于本发明的所述方面的所述益生菌组合物中的双歧杆菌的多个预期物种包括但不限于:*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium infantis*、*Bifidobacterium adolescentis*、*Bifidobacterium lactis*及*Bifidobacterium animalis*。在一些实施例中,所述益生菌组合物包括属于乳酸杆菌属的一物种,例如:*Lactobacillus plantarum*及选自于以下*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium infantis*、*Bifidobacterium adolescentis*、*Bifidobacterium lactis*及*Bifidobacterium animalis*中的至少两种。

[0192] 在一实施例中,本说明书公开的所述细菌组合物为适合将所述组合物施用于一哺乳类动物对象的任何形式。在一些实施例中,所述组合物为一片剂、一粉末或一液体的形式。若以一粉末形式提供,则特别考虑将一粉末与一合适的液体(例如:液体乳制品、水果或蔬菜汁、混合的水果或蔬菜汁产品等)混合。

[0193] 在一些实施例中,在以一抗生素剂进行施药之前、同时或之后,向一对象以本说明书中公开的所述细菌组合物进行施药。所述共培养的所述多个条件可以使得所产生的所述生物膜在体内释放所述有益细菌,使得所述有益细菌不承受所述抗生素剂的活性。

[0194] 在一些实施例中,本说明书中所述的多个细菌组合物被配制用于局部施用-例如:在一乳霜、一凝胶、一乳液、一洗发水、一冲洗液中使用。所述细菌组合物可以施用于皮肤或

头皮。所述多个细菌组合物可用于多个牙科应用。对于所述多个应用,可以将所述多个细菌组合物施用至牙龈。

[0195] 在一些实施例中,将本说明书所述的多个组合物掺入一食品中。如本说明书所用,术语“食品”是指含有多个营养物的任何物质,所述多个营养物可以被一生物体摄取,以产生能量、促进健康及保健、刺激生长并且维持生命。如本说明书所用的术语“强化食品(enriched food product)”是指已被修饰以包括含有本说明书中所述的组合物的所述组合物的一食品,所述食品提供一益处,例如:超出提供多个营养的基本功能的一健康/促进健康及/或疾病预防/减轻/治疗性质。

[0196] 所述益生菌组合物可以掺入任何食品中,多个示例性食品包括但不限于:蛋白粉(奶昔)、烘焙食品(蛋糕、饼干、饼干、面包、烤饼及松饼)、乳制品(包括但不限于:奶酪、酸奶、卡士达酱、大米布丁、慕斯、冰淇淋、冷冻酸奶、冷冻卡士达酱)、甜点(包括但不限于:雪酪、雪葩、刨冰、格兰尼塔及冷冻水果泥)、涂抹酱/人造黄油、面食及其他谷类产品、代餐产品、营养棒、混合饲料、格兰诺拉麦片、饮料(包括但不限于:冰沙、水或乳制饮料及大豆饮料)以及早餐类谷物产品,例如:燕麦片。对于饮料,本说明书中所述的益生菌组合物可以在溶液中、悬浮、乳化或以一固体的形式存在。

[0197] 在一实施例中,所述强化食品为一代餐产品。如本说明书所用的术语“代餐产品”是指旨在代替一正常餐食而食用的一强化食品。旨在构成一膳食替代品的多个营养棒及多个饮料为代餐产品的多个类型。所述术语还包括作为一膳食替代品减肥或体重控制计划的一部分而食用的多个产品,例如:多个零食产品,所述多个零食产品不旨在自行替代一整餐,而是可以与其他的此种产品一起用于替代一餐食或旨在所述计划中的其他食品一起使用,所述后者的多个产品每份的卡路里含量通常在50至500卡路里的范围内。

[0198] 在另一实施例中,所述食品为一膳食补充剂。如本说明书所用的术语“饮食补充剂”是指通过口腔摄取的一物质,所述饮食补充剂包含旨在补充饮食的“饮食成分”。所述术语“饮食成分”包括但不限于:包含如本说明书中所述的益生菌组合物及维生素、矿物质、草药或其他植物性药材、氨基酸以及例如酶、器官组织、腺体及代谢产物等物质。

[0199] 在另一实施例中,所述食品为一医疗食品。如本说明书所使用的术语“医疗食品”是指被配制为完全在一医师的监督下食用或施药的一食品,所述医疗食品旨在基于由医学评估确定的公认的科学原理,对具有多个独特的营养需求的一疾病或病症进行特定饮食管理。

[0200] 众所周知,在动物饲料中添加多个益生菌微生物可以改善动物的效率及健康。多个具体的实例包括:增加的增重与饲料进食量的比例(饲料效率)、改善的平均每日增重、改善的产奶量以及奶牛的改善的牛奶组成,如美国专利第5,529,793号及第5,534,271号所述。如美国专利第7,063,836号所述,益生菌生物体的施用还可以减少牛中的多个病原性生物体的发生率。

[0201] 因此,根据另一实施方案,可以将本说明书中所述的益生菌组合物并入一动物饲料中。

[0202] 在一实施例中,所述益生菌组合物被设计为在整个喂养期间连续或定期施用于瘤胃、盲肠或肠道发酵槽,以减少腹泻及/或总体健康的发生率及严重性。在所述实施例中,可以将所述益生菌组合物引入所述动物的瘤胃、盲肠及/或肠中。

[0203] 在另一实施例中,将本说明书所述的益生菌组合物并入一药物产品或组合物中。多个药物组合物包含一预防或治疗有效量的如本说明书所述的组合物,并且通常包括一个或多个药学上可接受的载体或赋形剂(将在下面讨论)。

[0204] 本发明考虑了本说明书所述的多个细菌组合物的多个制剂,所述多个制剂在一些实施例中为粉末、片剂、胶囊或以其他方式配制为用于口服施用。所述多个组合物可以以药物组合物、营养组合物(例如:一饮食补充剂)或作为一食品或饮料添加剂提供,如美国食品及药物管理局(FDA)所定义。以上的所述多个组合物的所述制剂没有特别的限制。例如:液体溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂、粉剂、栓剂、脂质体、微粒、微胶囊、等渗无菌水性缓冲溶液等均被认为是多个合适的剂型。

[0205] 所述多个组合物通常包括一个或多个合适的稀释剂、填充剂、盐类、崩散剂、粘合剂、润滑剂、助流剂、润湿剂、控释基质、着色剂、调味剂、载体、赋形剂、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、市售助剂及/或其他本领域已知的添加剂。

[0206] 可以使用用作一药物载体、赋形剂或介质的任何药学上可接受的(即本领域已知的无菌且可接受的无毒的)液体、半固体或固体稀释剂。多个示例性的稀释剂包括但不限于:聚氧乙烯失水山梨糖醇单月桂酸酯、硬脂酸镁、磷酸钙、矿物油、可可脂及可可豆油、甲基及丙基羟基苯甲酸酯、滑石粉、藻酸盐类、碳水化合物、特别是甘露醇、 α -乳糖、无水乳糖、纤维素、蔗糖、右旋葡萄糖、山梨糖醇、经修饰的右旋糖酐、阿拉伯胶及淀粉。

[0207] 多个药学上可接受的填充剂可以包括:例如:乳糖、微晶纤维素、磷酸二钙、磷酸三钙、硫酸钙、右旋葡萄糖、甘露醇及/或蔗糖。盐类,包括:三磷酸钙、碳酸镁及氯化钠,也可以用作多个药物组合物中的多个填充剂。

[0208] 多个粘合剂可用于将所述组合物保持在一起以形成一硬片剂。多个示例性的粘合剂包括:来自于例如阿拉伯胶、黄芪胶、淀粉及明胶等有机产品的多个材料。其他合适的粘合剂包括:甲基纤维素(MC)、乙基纤维素(EC)及羧甲基纤维素(CMC)。

[0209] 在一些实施例中,一强化食品还包含:一生物利用度增强剂,所述生物利用度增强剂用于增加所述身体对所述(多个)可吸收的天然产物的吸收。多个生物利用度增强剂可以是多个天然或合成化合物。在一实施例中,包含如本说明书所述的组合物的所述强化食品还包含:一种或多种生物利用度增强剂,以增强所述(多个)生物活性天然产物的所述生物利用度。

[0210] 多个天然生物利用度增强剂包括:生姜、香菜提取物、胡椒提取物及壳聚糖。生姜中的所述多个活性化合物包括:6-姜辣醇及6-姜烯酚。香菜籽油也可以用作一生物利用度增强剂(美国专利申请第2003/022838号)。胡椒碱是衍生自胡椒(黑胡椒或荜拔)的化合物,胡椒碱用作一生物利用度增强剂(参见美国专利第5,744,161号)。胡椒碱可以以商标名BioperineTM(萨宾萨公司,皮斯卡特维,新泽西州)在商业上取得。在一些实施例中,所述多个天然生物利用度增强剂以基于强化食品的总重量中的约0.02重量%至约0.6重量%的一用量存在。

[0211] 多个合适的合成生物利用度增强剂的多个示例包括但不限于:多个表面活性剂,包括:由PEG-酯类组成的多个表面活性剂,例如:以商品名为:GelucireTM、LabrafilTM、LabrasolTM、LauroglycolTM、Pleurool OleiqueTM(盖特弗斯公司,帕拉默斯,新泽西州)及CapmulTM(阿比特克公司,哥伦布,俄亥俄州)在商业上可取得。

[0212] 所述组合物的所述用量及给药方案是基于与所述给药目的有关的各种因素,例如:人类或动物的年龄、性别、体重、激素水平或人类或动物的其他营养需要。在一些实施例中,以一用量为约0.001毫克/千克(mg/kg)的体重至约1克/千克(g/kg)体重的所述组合物对一哺乳类动物对象进行给药。

[0213] 一典型的方案可以包括:所述组合物的多个剂量。在一实施例中,所述组合物每天给药一次。所述组合物可以在任何时间对一个体进行施药。在一些实施例中,所述组合物在进餐时或进餐前或进餐时进行给药。

[0214] 在一些实施例中,将本发明的所述方面的所述细菌组合物配制用作一农业产品。可将所述多个细菌组合物添加到一农业载体,例如:土壤或植物生长培养基。可以使用的其他农业载体包括:肥料、植物油、保湿剂或其组合。替代地,所述农业载体可以是一固体,例如:硅藻土、壤土、二氧化硅、藻酸盐、粘土、膨润土、蛭石、种子壳、其他动植物产品或动物组合,包括:颗粒、团粒或悬浮液。任何上述成分的多个混合物也被认为是多个载体,例如但不限于:以混合颗粒(pesto)(面粉及高岭土)、在壤土、沙子或粘土中的琼脂或面粉基团粒等。多个配方可能包括:多个被培养的生物的多个食物来源,例如:大麦、稻米或其他生物材料,例如:种子、叶、根、植物元素、甘蔗渣、谷物加工的壳或茎、地面植物材料或建筑工地废弃物的木材、从纸张、织物或木材中回收的锯末或小纤维。其他合适的制剂是本领域技术人员已知的。

[0215] 在一实施例中,所述农业制剂包括:一肥料。优选地,所述肥料是不会使所述细菌组合物的所述生存力降低超过20%、30%、40%、50%或更多的肥料。

[0216] 在一些情况下,所述农业制剂包含:例如:除草剂、杀线虫剂、杀虫剂、植物生长调节剂、杀鼠剂及营养剂等试剂是有利的。所述多个试剂理想地与所施用的制剂的所述植物是可相容的(例如:所述多个试剂不应对所述植物的生长或健康有害)。此外,所述试剂理想地是一种不会对人类、动物或工业用途引起多个安全隐患的试剂(例如:没有安全问题,或所述化合物足够不稳定以使源自于所述植物的所述商业植物产品中含有多个可忽略不计的含量的所述化合物)。

[0217] 包含本发明的所述生物膜的所述多个农业制剂通常包含:约0.1至95重量%,例如:占本发明的结合有所述生物膜的有益细菌群体的湿重的约1%至90%、约3%至75%、约5%至60%、约10%至约50%。优选地,所述制剂包含在每毫升制剂中至少约 10^2 CFU或孢子、在每毫升制剂中至少约 10^3 CFU或孢子、在每毫升制剂中至少约 10^4 CFU或孢子、在每毫升制剂中至少约 10^5 CFU或孢子、在每毫升制剂中至少约 10^6 CFU或孢子、或在每毫升制剂中至少约 10^7 CFU或孢子。

[0218] 本发明人还预期,当前公开的农业组合物可以被包含在一制品中,所述制品还包括促进多个植物生长的一试剂。

[0219] 所述多个试剂可以与所述生物膜一起配制为一单一组合物,或替代地,为独立包装,但是在单一容器中。

[0220] 多个合适的试剂如上所述。其他合适的试剂包括:多个肥料、多个农药(一除草剂、一杀线虫剂、一杀真菌剂及/或一杀虫剂)、一植物生长调节剂、一灭鼠剂及一营养物,如下文进一步所述。

[0221] 在一实施例中,促进所述植物生长的所述试剂缺乏抗菌活性。

[0222] 如本说明书所用的术语“约”是指±10%。

[0223] 所述多个术语“包括 (comprises)”、“包括 (comprising)”、“包括 (includes)”、“包含 (including)”、“具有 (having)”及其词形变化是指“包括但不限于”。

[0224] 所述术语“由…组成 (consisting of)”意思是“包括及不限于”。

[0225] 所述术语“主要由…组成 (consisting essentially of)”意思是所述组合物、方法或结构可以包括额外的成分、步骤和/或部件,但只有当额外的成分、步骤及/或部件实质上不改变所要求保护的组合物、方法或结构的基本特征及新特征。

[0226] 如本说明书所用的单数形式“一 (a)”、“一 (an)”以及“所述 (the)”除非在上下文另有明确指出,否则本发明可包括复数个参考物。例如:术语“一化合物 (a compound)”或“至少一化合物 (at least one compound)”可以包括多个化合物,包括它们的混合物。

[0227] 在整个本申请中,本发明的各种实施例可以以一个范围的型式存在。应当理解,以一范围型式的描述仅仅是因为方便及简洁,不应理解为对本发明范围的硬性限制。因此,应当认为所述的范围描述已经具体公开所有可能的子范围以及所述范围内的单一数值。例如,应当认为从1到6的范围描述已经具体公开子范围,例如从1到3,从1到4,从1到5,从2到4,从2到6,从3到6等,以及所数范围内的单一数字,例如1、2、3、4、5及6,此不管范围为何皆适用。

[0228] 每当在本文中指出数值范围,是指包括所指范围内的任何引用的数字(分数或整数)。多个短语:第一指示数字及第二指示数字“之间的范围”及第一指示数字“至”第二指示数字“的范围”在本文中可互换,并指包括第一及第二指示数字,及其之间的所有分数及整数。

[0229] 本文中所使用的术语“方法”是指用于完成一特定任务的方式 (manner)、手段 (means)、技术 (technique) 及程序 (procedures), 所述给定的任务包括但不限于已知的或是从已知的方式、手段、技术或步骤很容易地由化学、药理、生物、生化及医学领域的从业者开发所述多个方式、手段、技术以及程序。

[0230] 如本文所用,术语“治疗”包括终止、基本上抑制、减慢或逆转病症的进程,基本上改善病症的临床或心理症状或基本上预防病症的临床或心理症状的出现。

[0231] 应当理解,本发明的某些特征,为了清楚阐明,描述在多个独立的实施例的上下文中,也可以是在单一实施例中以组合提供。相反,本发明的各种特征,为了简明,在一单一实施例的上下文中描述,也可以单独或以任何合适的子组合或以适合于本发明的任何其它描述的实施方式来提供。在各种实施例的上下文中描述的部分特征不应被认为是那些实施例的主要特征,除非所述实施例在没有这些组件的情况下不运作。

[0232] 如上文描绘和下文权利要求部分所要求的本发明的各种实施例和各个方面可在下文的多个实施例中找到实验支持。

[0233] 多个示例:

[0234] 现在参考以下多个示例,连同以上的多个描述一起以一非限制性方式说明本发明的一些实施例。

[0235] 通常地,本说明书使用的命名法及本发明中使用的多个实验室步骤包括:分子、生物化学、微生物学及重组脱氧核糖核酸 (DNA) 技术,这些技术在文献中有详尽的解释。参见,例如:“分子克隆:实验室手册”,Sambrook等, (1989);“分子生物学中的当前的操作流程”第

1至3卷,Ausubel,R.M.,编辑(1994);Ausubel等,“分子生物学中的当前的操作流程”,John Wiley及其儿子,巴尔的摩,马里兰州(1989);Perbal,“分子克隆的一实践指南”,John Wiley及其儿子,纽约(1988);Watson等,“重组脱氧核糖核酸”,科学美国图书,纽约;Birren等(编辑)“基因组分析:实验室手册系列”,第1至4卷,冷泉港实验室出版社,纽约(1998);美国专利第4,522,587号;第4,666,828号;第4,683,202号;第4,801,531号;第5,192,659号及第5,272,057号中所述的多个方法;“细胞生物学:实验室手册”,第1至3卷,Cellis,J.E.,编辑(1994);由Freshney,Wiley-Liss所著的“动物细胞培养-基础技术手册”,纽约(1994),第三版;“免疫学中的现有方案”第1至3卷,Coligan J.E.,编辑(1994);Stites等(编辑),“基础与临床免疫学”(第8版),Appleton及Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell及Shiigi(编辑),“细胞免疫学中的多个选择方法”,W.H.弗里曼公司,纽约(1980);专利及科学文献中广泛描述了多个可用的免疫测定法,参见,例如:第3,791,932号;第3,839,153号;第3,850,752号;第3,850,578号;第3,853,987号;第3,867,517号;第3,879,262号;第3,901,654号;第3,935,074号;第3,984,533号;第3,996,345号;第4,034,074号;第4,098,876号;第4,879,219号;第5,011,771号及第5,281,521号;“寡核苷酸合成”Gait,M.J.,编辑(1984);“核酸杂交”Hames,B.D.及Higgins S.J.,编辑(1985);“转录与翻译”Hames,B.D.及Higgins S.J.,编辑(1984);“动物细胞培养”Freshney,R.I.,编辑(1986);“固定化细胞及酶”IRL出版社,(1986);“分子克隆的一实践指南”Perbal,B.,(1984)以及“酶学方法”第1至317卷,学术出版社;“聚合酶链式反应(PCR)操作流程:方法及应用指南”,学术出版社,圣地亚哥,加利福尼亚州(1990);Marshak等,“蛋白质纯化及表征策略-实验室课程手册”CSHL出版社(1996年);所有的这些文献均通过引用并入本说明书,如同在本说明书中完全阐述一样。本说明书文档中提供了其他一般参考文献,当中的多个步骤被认为是本领域公知的,并且是为了方便读者而提供的,其中包含的所有信息都通过引用并入本说明书。

[0236]示例1:

[0237]生物膜形成:

[0238]多个材料及方法:

[0239]多个菌株及多个生长条件:本研究中使用的所述益生菌菌株为植物乳酸杆菌,所述菌株通常在MRS (Man、Rogosa及Sharpe) 肉汤或使用1.5%琼脂(DifcoTM) 固化的MRS肉汤中生长。所述枯草芽孢杆菌的野生型菌株NCIB3610及其衍生物通常在LB(每升10克胰蛋白、5克酵母提取物、5克NaCl) 肉汤或在1.5%琼脂固化的LB中培养。在使用之前,植物乳酸杆菌及枯草芽孢杆菌分别在37°C下在一硬琼脂平板上生长48小时或过夜。使用一单一细菌菌落来制备每一菌株的一起始培养物,将植物乳酸杆菌在不搅拌的情况下接种到5毫升的MRS肉汤中8小时,并且将枯草芽孢杆菌接种在LB培养基中以150每分钟转数(rpm) 在37°C下5小时,直到达到一OD₆₀₀约为1.5。对于多个共培养实验,使用pH值为7的MRS培养基,由于MRS培养基能够有效地促进枯草芽孢杆菌形成生物膜,并且适合于枯草芽孢杆菌及益生菌乳酸菌(LAB) 的共培养。将枯草芽孢杆菌细胞与一等量的植物乳酸杆菌细胞混合至一最终浓度为每种菌株为10⁸细胞/毫升,然后以1:100稀释至MRS pH 7。将多个混合的培养物中的所述多个细胞在37°C\50每分钟转数的有氧条件下温育7至8小时。

[0240]枯草芽孢杆菌的多个单物种生物膜是在30°C下在MRS (Hy-lab) 培养基或补充了不同比例(1:5、1:2、5:1) 的LB的MRS中产生的。为了确定芽孢杆菌菌株形成生物膜的多个最佳

条件,使用1摩尔浓度 (M) 的NaOH将MRS的pH从6逐渐提高到8。除非另有说明,否则本研究中使用的所有菌株均列于表2中,并且是等基因的。

[0241] 表2:

菌株	基因型
NCIB3610	能形成多个坚固的生
物膜的未驯化的枯草 杆菌野生株	
RL4566	$\Delta\text{kinA}::\text{tet}$
RL4563	$\Delta\text{kinB}::\text{kan}$
RL4565	$\Delta\text{kinC}::\text{cat}$
RL4569	$\Delta\text{kinD}::\text{mls}$
RL4570	$\Delta\text{kinE}::\text{mls}$
RL4573	$\Delta\text{kinA}::\text{tet}, \Delta\text{kinB}::\text{kan}$
RL4577	$\Delta\text{kinC}::\text{cat}, \Delta\text{kinD}::\text{mls}$
RL4620	$\Delta\text{spo0A}::\text{kan}$
RL4582	$\text{P}_{\text{tapA}}\text{-lacZ}$ 位于 <i>amyE</i> 基 因座的 3610 中, 抗大 观霉素(Spec ^R)
YC668	$\Delta\text{abrB}::\text{kan}$
B. <i>paralicheniformis</i> MS303	
B. <i>licheniformis</i> MS310	
B. <i>licheniformis</i> S127	
B. <i>subtilis</i> MS1577	
B. <i>cereus</i> 10987	

[0244] 用于菌落及菌醭生物膜形成的测定:为了进行菌落结构分析,将3微升的起始物培养物点样在多个MRS琼脂平板或对照组LB上,并在30℃下温育72小时。为了进行菌醭形成分析,将所述起始物培养物以1:100稀释到多个12孔板中的3.5毫升的MRS肉汤或对照组LB中,并在不搅拌的情况下在30℃下温育48小时。使用带有一阿西欧康(axiocam)ERc 5s相机(蔡司,德国)的一蔡司斯特米(Zeiss Stemi)2000-C显微镜来拍摄多个图像。

[0245] β -半乳糖苷酶测定:在30℃下在固体培养基上,从生长在LB、补充了不同比例的MRS的LB(1:1、1:5及5:1)或pH调整至7的MRS的多个菌落中采收多个细胞,并且重新悬浮于磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液中。通过轻度声波处理破坏所述生物膜菌落中的多个典型的长束的细胞链。将所述多个细胞样品的所述光密度(OD)在PBS中归一化至1.0的OD 600,收集一毫升的细菌细胞悬浮液,并根据标准程序进行分析。

[0246] 在共培养过程中植物乳酸杆菌的生长曲线分析:枯草芽孢杆菌及植物乳酸杆菌的多个过夜培养分别在LB或MRS中生长至固定相,并以1:100稀释至25毫升的经修饰的MRS肉汤中。以一升高的pH值(最高到7)。将如上所述产生的多个共培养样品在37℃及150每分钟转数在有氧条件下生长8小时。还制备了枯草芽孢杆菌及植物乳酸杆菌单种培养物,并且将其用作对照样品。每小时从每一培养物中收集1毫升,以用于通过菌落形成单位(CFU)计数方法进行微生物计数。此可以通过使用PBS缓冲液进行多个适当稀释,并且将其铺在MRS琼脂上来完成,所述多个平板在37℃下在有氧条件下温育48小时。

[0247] 使用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)的多个可视化生物膜形成细胞:如上所述,植物乳酸杆菌与终止GFP的枯草芽孢杆菌(YC161)或终止CFP的枯草芽孢杆菌(YC189)共培养在经修饰的MRS肉汤中。作为单一培养物生长的每一细菌的多个细胞悬液用作多个对照组样品。收集一毫升的每一培养物,并以5000每分钟转数进行离心2分钟。除去上清液后,将所述多个细胞以1毫升的PBS缓冲液洗涤,然后离心(以5000每分钟转数进行离心2分钟)后重新悬浮于100微升的相同缓冲液中。将每一样品中的5微升放置在一显微镜载玻片上,并且使用诺马斯基微分干涉对比(DIC)在一透射光显微镜中可视化。

[0248] 扫描电子显微镜(SEM)分析:将如上所述共培养生长的所述多个细胞放置在涂有聚赖氨酸的多个载玻片上过夜。然后,使用DDW将多个载玻片洗涤两次,以去除多个未附着的细胞及中等残留物。将所述多个载玻片暴露于40微升的4%甲醛中,并且在室温下温育15分钟,再次使用DDW洗涤所述多个载玻片,并且通过SEM进行分析。

[0249] 热处理后的存活率分析:将如上所述产生的多个共培养样品在37℃的有氧培养下以50每分钟转数生长7至8小时,作为一单一培养物生长的植物乳酸杆菌细胞用作一对照组。所述多个样品用于多个挑战性测试,例如:热处理或冷处理。在进行处理之前及之后采集所述多个样品,进行超声波处理以破碎多个生物膜束(时间:20秒、脉冲:10秒、暂停:5秒、振幅:30%),并且在多个MRS琼脂平板上进行CFU计数。

[0250] 植物乳酸杆菌在体外消化系统内的过渡过程中的存活分析:为了研究植物乳酸杆菌在胃肠道中的过渡过程中的存活能力,将植物乳酸杆菌的多个样品进行单培养及与枯草芽孢杆菌共培养。使用在体外的消化模型监测枯草杆菌细胞4小时(Minekus等,2014)。为了模拟消化中的胃的阶段,将每一样品的悬浮液中的5毫升试样与模拟的胃液(SGF)以1:1混合,直至一最终体积为10毫升。加入猪胃蛋白酶(SIGMA P9700)以在最终的消化混合物中达到2000单位/毫升(U mL⁻¹),随后加入CaCl₂,以在所述最终的消化混合物中达到0.075毫摩

尔浓度(mM)。以1摩尔浓度的HCl将pH值减少至3.0,然后将所述多个样品放置在带有一磁力搅拌器的一水浴中在37℃下2小时。将每一样品分成2个试管,每一试管包含5毫升。将50微升的PMSF(苯甲基磺酰氟;SIGMA P7626)添加到1试管中,以终止所述反应,然后检查植物乳酸杆菌的存活性。另一试管用于下一个消化阶段-肠。为了模拟在消化中的肠的阶段,将2.5毫升的胃食糜与模拟的肠液(SIF)以1:1混合,直至一最终体积为5毫升。加入1摩尔浓度的NaOH以将所述混合物中和至pH 7.0,并且在所述消化混合物中加入多个胰腺酶,以在所述最终混合物中实现以下多个活性:猪胰蛋白酶(SIGMA T0303) (100U mL⁻¹)、牛胰凝乳蛋白酶(SIGMA C4129) (25U mL⁻¹)、猪胰淀粉酶(SIGMA A3176) (200U mL⁻¹)、猪胰脂肪酶(SIGMA L3126) (2000U mL⁻¹)。此外,添加多个胆汁盐(SIGMA T4009),以使所述最终混合物中的一最终浓度为10毫摩尔浓度,然后将所述多个样品再次温育2.5小时。使用如上所述的CFU计数方法来确定从在胃及肠的阶段之后收集的每一样品中抽取1毫升及活的植物乳酸杆菌细胞的数目。

[0251] 多个结果:

[0252] 开发用于将枯草芽孢杆菌与植物乳酸杆菌共同生长在共培养物中的一系统:

[0253] 先前已证明多个生物膜对各种不利环境条件的耐受性增加,此显然是由于细胞外基质的产生所致(Friedman、Kolter及Branda,2005)。因此,本发明人假设由健壮的形成生物膜的细菌枯草芽孢杆菌制造的细胞外基质在共培养生物膜系统中生长的期间可以为其他物种(例如:益生菌)提供增强的保护。为此目的,开发了一专用的培养基,其中植物乳酸杆菌及枯草芽孢杆菌能够在共培养下生长。已发现通过将所述MRS的所述pH值调整至pH 7,可以使所述多个细菌在共培养中生长。如图13所示,所述共培养的培养方式对植物乳酸杆菌及枯草芽孢杆菌的生长没有影响(与将植物乳酸杆菌及枯草芽孢杆菌在纯培养中的生长相比),表示出在多个给定条件下所述多个细菌之间没有拮抗作用。令人惊讶地,发现MRS培养基的修饰促进枯草芽孢杆菌产生强烈的生物膜形成(图2)。由于枯草芽孢杆菌似乎对酸性pH敏感,因此逐渐提高用于共培养的培养方式的MRS培养基的所述pH值,以找到适合于芽孢杆菌生长的一pH值。pH值从6增加到8导致菌落及菌醭生物膜的生物膜表现型的稳健性成比例增加(图2)。当将所述pH值调整至6时,在固体MRS培养基上观察到微弱的生长,而在液体培养基上没有生长。将pH值调整至6.5,不仅在固体及液体MRS中均观察到细菌生长,而且令人惊讶地也观察到了在固体培养基上生物膜形成的开始。在将pH值增加到7及8之后,在两种生长设置中都观察到了一非常强烈的生物膜表现型。然后,比较了枯草芽孢杆菌在MRS pH 7及LB中的多个生长速率。如图13所示,与LB相比,在MRS中生长的微生物在一开始时观察到一较小的延迟。然而,与LB相比,在MRS中生长的枯草芽孢杆菌细胞后来发现较高的生长速率。

[0254] 所述经修饰的MRS培养基可通过KinD-Spo0A途径促进生物膜形成及基质基因表达:

[0255] 为了评估MRS培养基促进生物膜发育及基质基因表达的潜力,LB培养基(即通常被用于培养枯草芽孢杆菌)富含多个不同用量的MRS(1:1、1:5及5:1)。示出了生物膜表现型与MRS浓度的增加之间的直接比例相关性(图3)。还研究了使用tapA及eps操纵子增加MRS浓度对枯草芽孢杆菌中的基质基因表达的影响,由于基质基因的产物为细胞外基质的多个主要成分。已发现tapA的表达与LB中的MRS的所述浓度成比例地增加(图4A至4B)。eps的表达与

高达80%的MRS的所述MRS浓度成比例地增加,而在100%时检测到一减少的表达(图5A至5B)。

[0256] 然后,本发明人确定MRS是否通过先前针对枯草芽孢杆菌描述的Kin-Spo0A途径触发生物膜形成(Shemesh及Chai,2013《细菌学杂志》,2013,第195卷,第12号,第2747至2754页)。本发明人测试了不同的枯草芽孢杆菌突变体的生物膜形成(Δ kinA、 Δ kinB、 Δ kinC、 Δ kinD、 Δ kinE、 Δ kinAB、 Δ kinCD、 Δ spo0A、 Δ eps Δ tasA)或过量产生的生物膜(Δ abrB)。首先,本发明人确定了缺乏组氨酸激酶的多个突变体的生物膜表现型,所述组氨酸激酶负责感应诱导生物膜形成的多个环境信号。本发明人发现尽管与对照组相比,尽管所述 Δ kinC及 Δ kinD突变体的生物膜形成显示出一微弱的减少,但在所述两个激酶中的一个的多个单一突变体均未在生物膜表现型中显示出明显的缺陷(图14)。然而,所述 Δ kinCD双重突变体显示了生物膜表现型完全消失(图5A)。另一方面,尽管观察到生物膜表现型出现一些变化(在菌落型生物膜的情况下),但 Δ kinAB的双重突变并不能阻止生物膜形成。主转录调节子spo0A中的突变以及eps及tasA中的双重突变完全消除了生物膜的形成(图5A)。与多个对照组WT细胞相比,所述转录抑制因子 Δ abrB的突变在生物膜形成上不会导致一额外的增加(图5B)。所述结果再次强调了在经改良的MRS培养基中的枯草芽孢杆菌WT细胞生长的过程中的基质产生的急剧增加。

[0257] 为了研究芽孢杆菌属的多个物种中MRS的所述生物膜促进作用是否一致,测试了其他枯草芽孢杆菌菌株以及其他芽孢杆菌属物种。通过多个皱纹菌落(图6)及多个强烈的浮动的菌醭(图7)可以判断出一生物膜促进作用。

[0258] 枯草芽孢杆菌及植物乳酸杆菌在共培养物中的生长导致双物种生物膜形成:

[0259] 所述经修饰的MRS培养基被用于研究由将持续性表达GFP(YC161)的荧光标记的枯草芽孢杆菌细胞与植物乳酸杆菌进行共培养而产生的双物种生物膜,使用CLSM将产生的生物膜可视化。如图8A(上排)所示,所述生成的生物膜由荧光细胞及非荧光细胞组成。多个植物乳酸杆菌细胞被多个枯草芽孢杆菌细胞包围,而所述多个枯草芽孢杆菌细胞彼此附着,以形成生物膜相关结构(束)。此进一步示出在图8B中,示出了在LBGM培养基中枯草芽孢杆菌及植物乳酸杆菌的所述共培养生物膜。

[0260] 由于枯草芽孢杆菌中生物膜形成取决于细胞外基质的合成,因此,本发明人试图确定在双物种生物膜发育的过程中是否发生细胞外基质的产生。使用将tapA-sipW-tasA(枯草芽孢杆菌中负责合成生物膜基质的多个蛋白质组分的操纵子)的启动子与编码青色荧光蛋白(YC189)的cfp基因进行转录融合来分析所述形成的生物膜中的所述基质基因表达的水平,如先前所述(Shemesh、Kolter及Losick,2010,《细菌学杂志》192,6352至6356)($P_{tapA}-cfp$)。观察到显著的CFP表达,表示了所述tapA-sipW-tasA操纵子被激活,因此在双物种生物膜中诱导了基质产生(图8A至8B,下排)。为了确定植物乳酸杆菌细胞是否可以被源自于枯草芽孢杆菌的生物膜形成的多个细胞外聚合物质包围,使用扫描电子显微镜(SEM)分析所述双物种生物膜(图9A至9C)。所述多个获得的图像(图9C)展示出生物膜的三维及异质结构的形成,在所述生物膜中,多个植物乳酸杆菌(*L. plantarum*)细胞看起来被并入在由枯草芽孢杆菌产生的所述细胞外基质中。重要的是,以单培养形式生长的多个枯草芽孢杆菌细胞也形成生物膜,所述生物膜的特征为具有均一的结构,其中所述多个细胞的多个长丝是通过一细胞外基质而结合在一起(图9A)。相反,所述多个植物乳酸杆菌在单物

种培养中不能形成显著的生物膜。以上所述的多个观察表明,由多个枯草芽孢杆菌细胞产生的所述细胞外基质可与多个植物乳酸杆菌细胞共享,从而为所述多个植物乳酸杆菌细胞提供抵抗多个环境胁迫的可能的保护。

[0261] 所述双物种生物膜促进了植物乳酸杆菌在多个有害环境中的存活:

[0262] 为了确定枯草芽孢杆菌在所述共培养生物膜中产生的所述基质是否可以为植物乳酸杆菌在多个不利环境条件中提供防御力,在热处理(模拟工业加工的多个情况,例如:巴氏灭菌)期间以及冷藏(模拟多个存储条件的多个情况)期间测试了植物乳酸杆菌细胞的存活。对于热处理巴氏灭菌,将生长在共培养生物膜中的多个植物乳酸杆菌细胞在63°C下加热1分钟及3分钟。对于冷处理,将生长在共培养生物膜中的植物乳酸杆菌细胞保存在4°C下长达21天。生长在单物种培养中的植物乳酸杆菌细胞被用作对照组。热处理1分钟及3分钟后,与对照组相比(图10A至10B),生长在共培养生物膜中的多个植物乳酸杆菌细胞分别导致存活的植物乳酸杆菌细胞的所述数目分别增加了约1.25Log CFU/mL及1.06Log CFU/mL。此外,所述冷处理实验的所述多个结果表明,生长在共培养生物膜中的多个植物乳酸杆菌细胞在整个所述多个存储条件下受到的保护更大,展示出所述个植物乳酸杆菌细胞的生存力提高了约0.44至0.89Log CFU/mL(图10A至10B)。

[0263] 在双物种生物膜形成的过程中产生的细胞外基质促进了植物乳酸杆菌在热处理过程中的生存:

[0264] 为了进一步证明植物乳酸杆菌对多个不利环境条件的抗性增加是由细胞外基质促进的,建立了植物乳酸杆菌与枯草芽孢杆菌突变菌株(生物膜形成缺损(Δ eps Δ tasA)或一过量产生生物膜基质(Δ abrB))的多个共培养物。将所述多个共培养物进行热处理巴氏灭菌。在单物种培养中以及与野生型枯草芽孢杆菌共培养中生长的植物乳酸杆菌被用作对照组。如图11A所示,与生长在单物种培养物中的植物乳酸杆菌相比,与 Δ eps Δ tasA双重突变体的所述多个细胞一起生长的植物乳酸杆菌细胞的存活程度没有显示出一显著的差异。然而,观察到与野生型枯草芽孢杆菌共培养的植物乳酸杆菌细胞的存活有一显著增加。有趣的是,与在单一培养物中生长的植物乳酸杆菌的多个存活率相比,观察到在存在多个 Δ abrB突变细胞的情况下生长的植物乳酸杆菌细胞的多个存活率增加了约1.78Log CFU/mL。

[0265] 在另一实验中,将所述多个样品在牛奶中于30°C,20每分钟转数下生长18小时。接着,将所述多个样品在63°C下进行热处理1至3分钟。多个对照组样品未进行热处理。使用CFU方法确定活的植物乳酸杆菌细胞的数目。 $*p < 0.05$ 。如图11B所示,枯草芽孢杆菌生物膜在牛奶中加热的期间促进了植物乳酸杆菌的存活。

[0266] 在双物种生物膜形成的过程中产生的细胞外基质促进植物乳酸杆菌在类似于人类消化系统的所述多个条件下存活:

[0267] 为了研究植物乳酸杆菌在胃肠道的过渡期间的存活能力,使用在体外的消化模型检验多个植物乳酸杆菌细胞的所述存活率(图12)。在多个模拟的胃条件下温育2小时后,与单一培养的多个植物乳酸杆菌细胞相比,观察到与多个枯草芽孢杆菌细胞生长在共培养生物膜中的植物乳酸杆菌细胞的活细胞浓度增加了约0.86Log CFU/mL。然后,将多个细胞在多个模拟的肠条件下温育2小时,与游离的活的植物乳酸杆菌细胞相比,观察到受生物膜保护的植物乳酸杆菌细胞的存活细胞浓度增加了约0.9Log CFU/mL。

[0268] 示例2:

[0269] 乙偶姻促进生物膜形成：

[0270] 多个食品通常富含不同的食品添加剂,可以改善所述多个产品的感官及感知特性。在所述多个添加剂中,具有多个重要的小分子,例如:乙偶姻,可以改善不同食品的风味。乙偶姻为自然界中广泛存在的一中性分子。一些微生物、高等植物、昆虫及高等动物具有合成乙偶姻的能力。所述多个添加剂会影响许多与人类健康相关的细菌的生理,并且影响被称为一生物膜的多个细菌细胞的多细胞群落的发育,生物膜的形成取决于一细胞外基质的合成,所述细胞外基质将多个组成细胞保持在一起。在枯草芽孢杆菌(一益生元细菌)中,所述基质具有两个主要的组分:由所述epsA-0操纵子的所述多个产物合成的一胞外多糖以及由tapA-sipW-tasA操纵子编码的多个淀粉状纤维。

[0271] 多个结果:

[0272] 如图15A至15C所示,乙偶姻在枯草芽孢杆菌中触发生物膜束的形成。在没有乙偶姻的情况下,在LB培养基中生长时未观察到生物膜形成(图15A)。图16A至16B示出了乙偶姻在枯草芽孢杆菌中触发一菌落型生物膜形成。显示出乙偶姻使枯草芽孢杆菌中负责所述基质产生的tapA操纵子的转录高度上调(图17A至17D)。

[0273] 所述多个结果表示了枯草芽孢杆菌的多个细胞在乙偶姻存在下在生长的过程中发展成一复杂的束。响应于乙偶姻,所述多个细胞表达多个高水平的所述多个细胞外基质组分,此对于生物膜的形成至关重要。

[0274] 示例3:

[0275] 本实验的目的是测试NCIB3610(从土壤中分离)及127185/2(从乳品环境中分离)在共培养系统中生长的过程中从多个不利环境条件中保护植物乳酸杆菌的能力。

[0276] 多个材料及方法:

[0277] 选择用于枯草芽孢杆菌及植物乳酸杆菌的所述共培养系统的所述生长培养基为(经pH调整的)MRS培养基。

[0278] 使用一立体显微镜或共聚焦激光扫描显微镜(分别用于菌落或束状生物膜)进行生物膜形成的表征。

[0279] 如上所述,使用CFU方法进行了检查在胃肠道的体外模型的过渡期间及暴露在低pH值下与枯草芽孢杆菌的共培养生物膜中生长的植物乳酸杆菌存活的所述多个实验。

[0280] 多个结果:

[0281] 图18A至18B示出了分别由枯草芽孢杆菌菌株NCIB3610及127185/2产生的所述生物膜的照片。

[0282] 在与NCIB3610的所述共培养物中存活的所述植物乳酸杆菌计数高于在单培养中生长的植物乳酸杆菌。当振荡所述培养物后,所述效果会增强(图19)。此外,在多个酸性条件下与NCIB3610或127185/2的多个共培养物中存活的植物乳酸杆菌的所述数目比在多个相同条件下生长的所述单一培养物高30倍(图20)。

[0283] 示例4:

[0284] 为了阐明用于触发生物膜发育的MRS培养基的一关键组分,本发明人分析了每一组分的作用-Mg²⁺、Mn²⁺、乙酸钠、磷酸氢二钾、右旋葡萄糖、柠檬酸铵-涉及枯草芽孢杆菌的菌落型生物膜形成。有趣的是,在缺乏Mn²⁺的情况下观察到最缺陷的生物膜表现型:枯草芽孢杆菌在未补充Mn²⁺的MRS培养基上不能形成一发育的菌醭以及菌落型生物膜(图21)。值得

注意的是,在没有右旋葡萄糖的情况下产生的所述多个生物膜表现出一定的抑制作用,具有一皱褶的表现型,而在缺乏Mn²⁺的情况下产生的生物膜则完全平坦(图21)。所述多个结果总结出认为MRS培养基中的Mn²⁺的存在对于枯草芽孢杆菌的生物膜形成最关键。

[0285] 虽然本发明已经结合其特定实施例进行了描述,但是显而易见的是,许多备选方案,修饰以及变化对本领域技术人员来说是显而易见的。因此,本发明旨在涵盖所有落入所述权利要求的精神和范围内的所有这样的备选方案、修饰以及变化。

[0286] 在本说明书中提及的所有出版物、专利及专利申请以其整体作为参考文献并入本说明书中,其程度如同各独立的出版物、专利或专利申请案被明确地且个别地标示为以引用的方式并入本文中。此外,本申请中任何参考文献的引用或证明不应被解释为承认所述参考文献可作为本发明的现有技术。本申请中标题部分在本文中用于使本说明书容易理解,而不应被解释为必要的限制。

植物乳酸杆菌

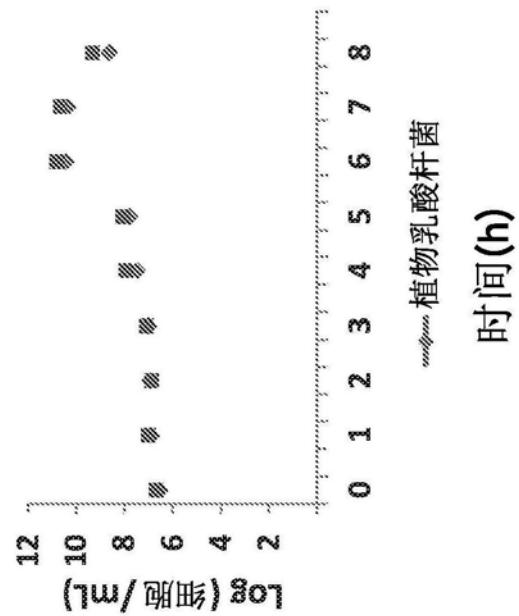


图1A

枯草芽孢杆菌

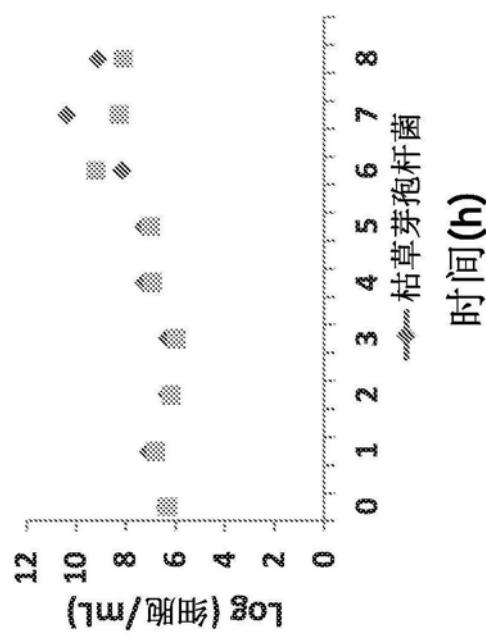
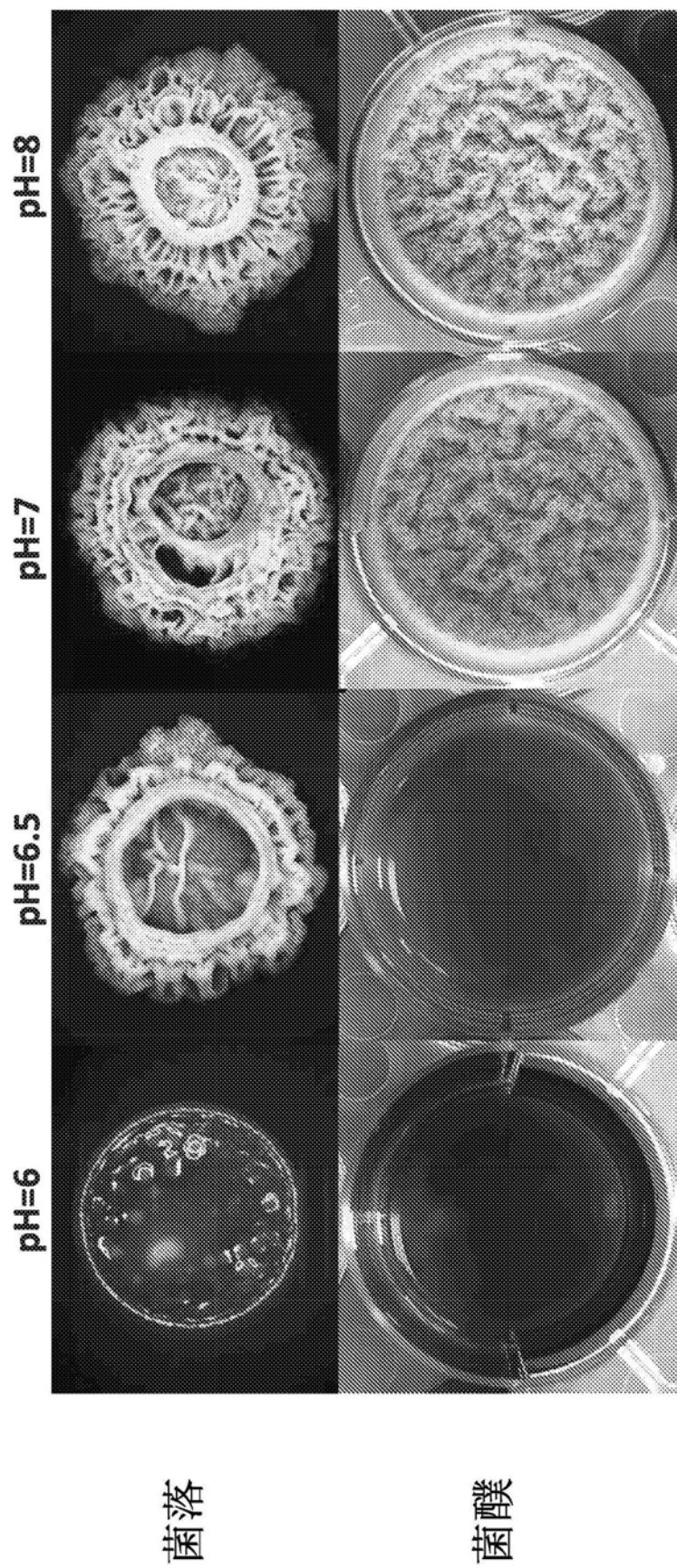


图1B



菌落

菌醭

图2

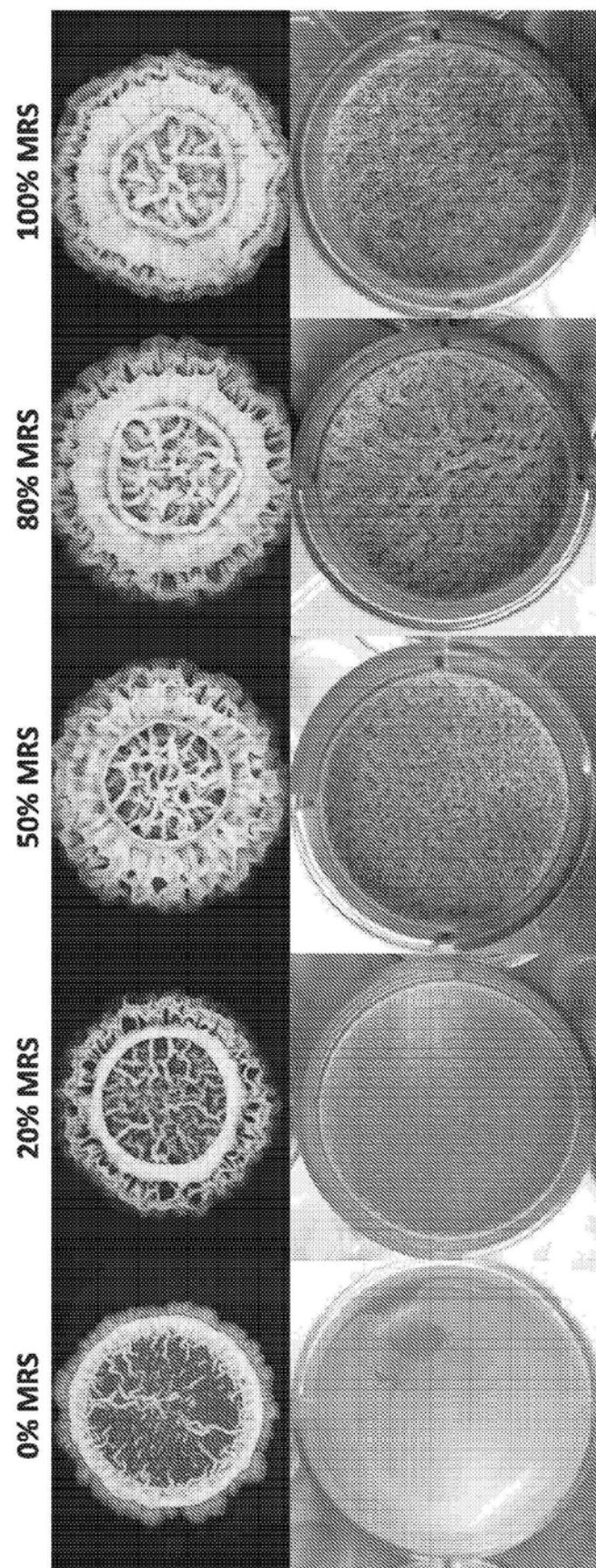


图3

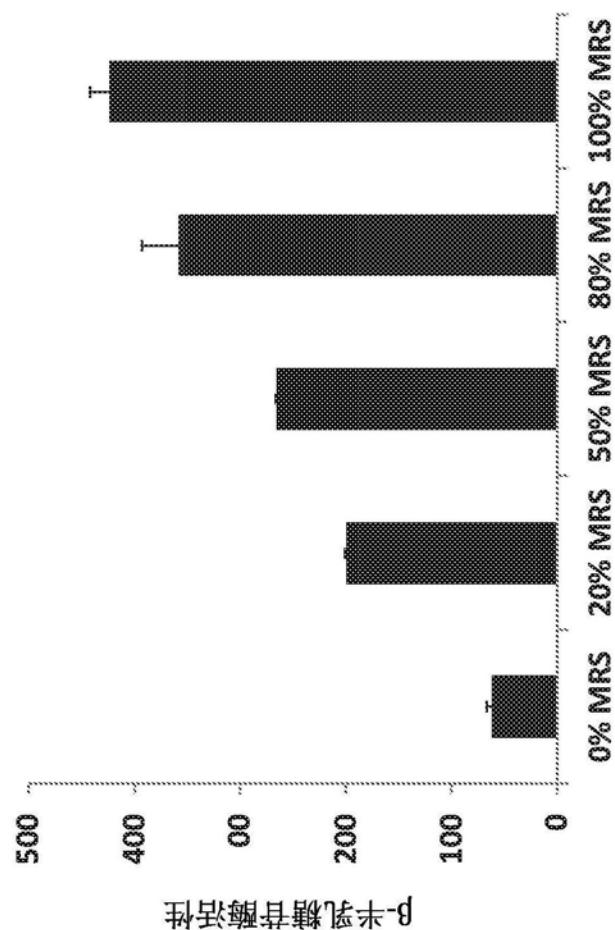


图4A

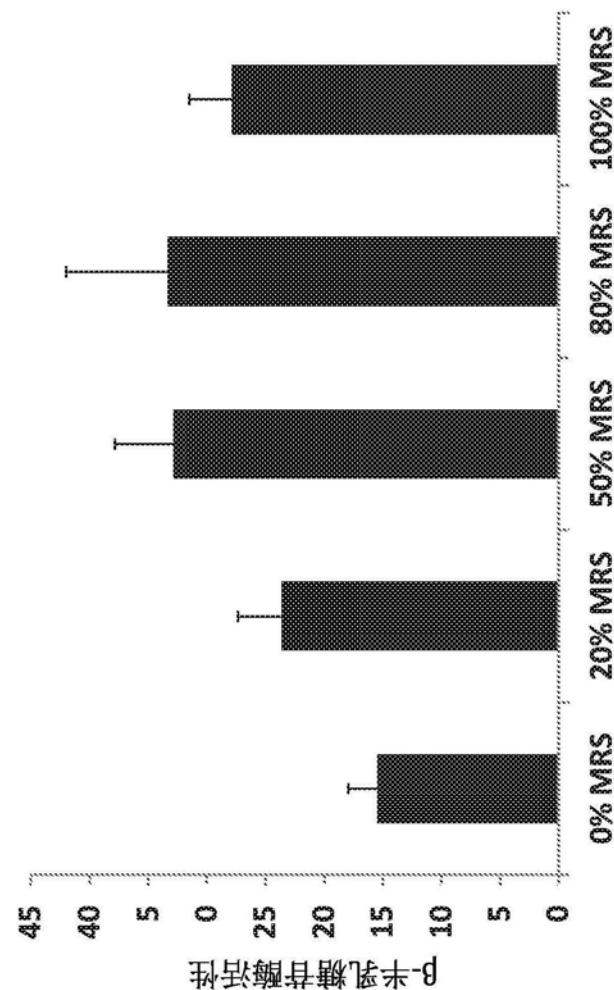


图4B

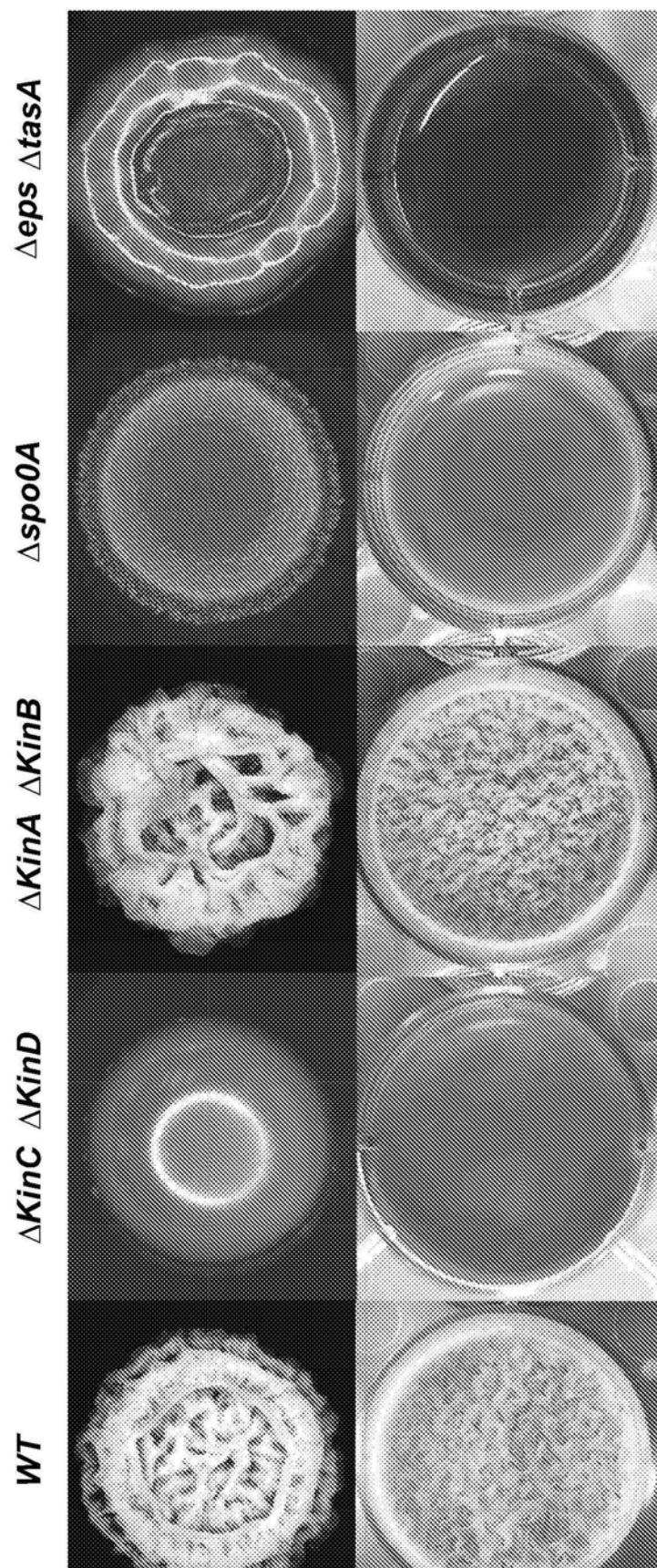


图5A

$\Delta \alpha brB$
 WT

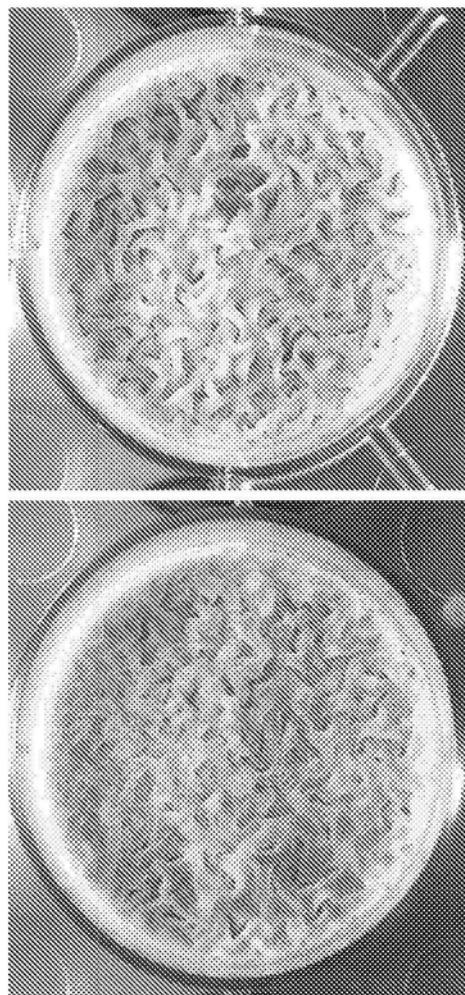


图5B

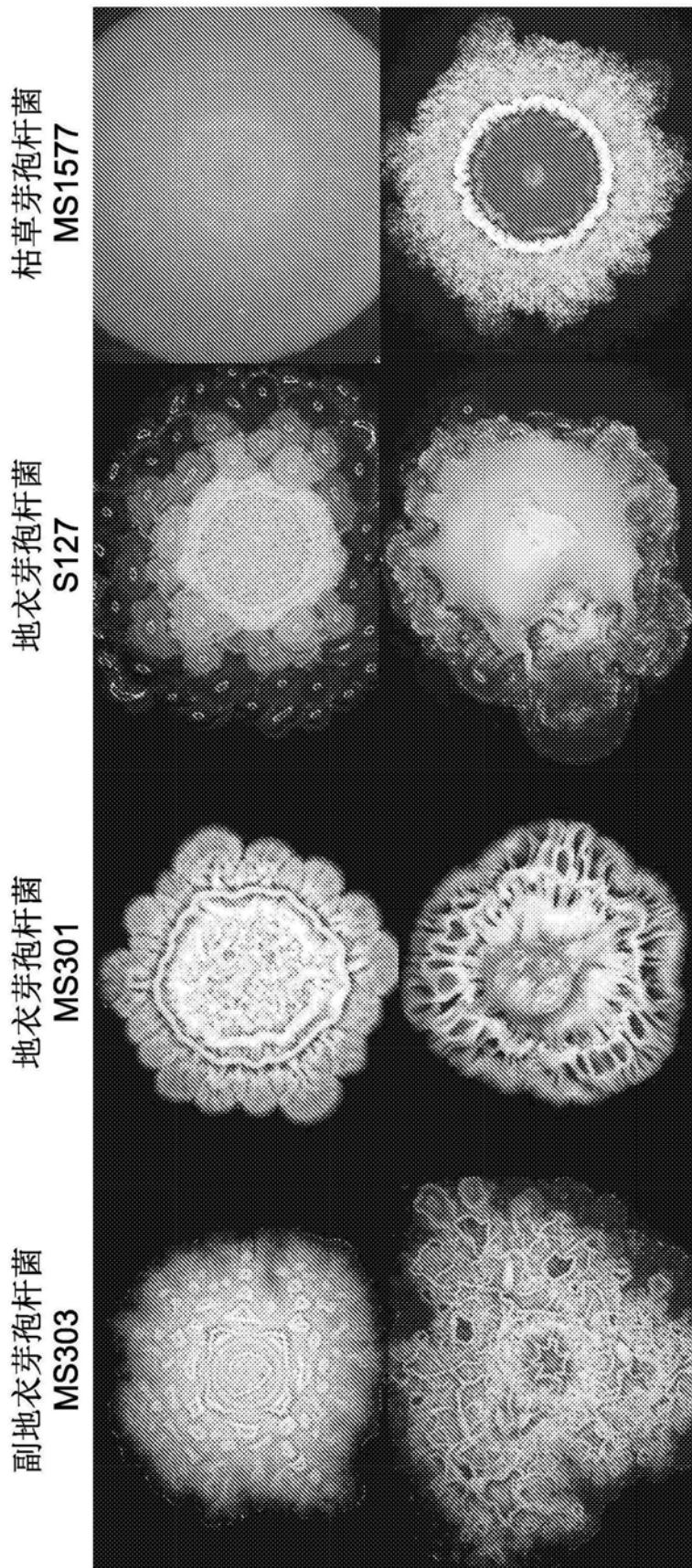


图6

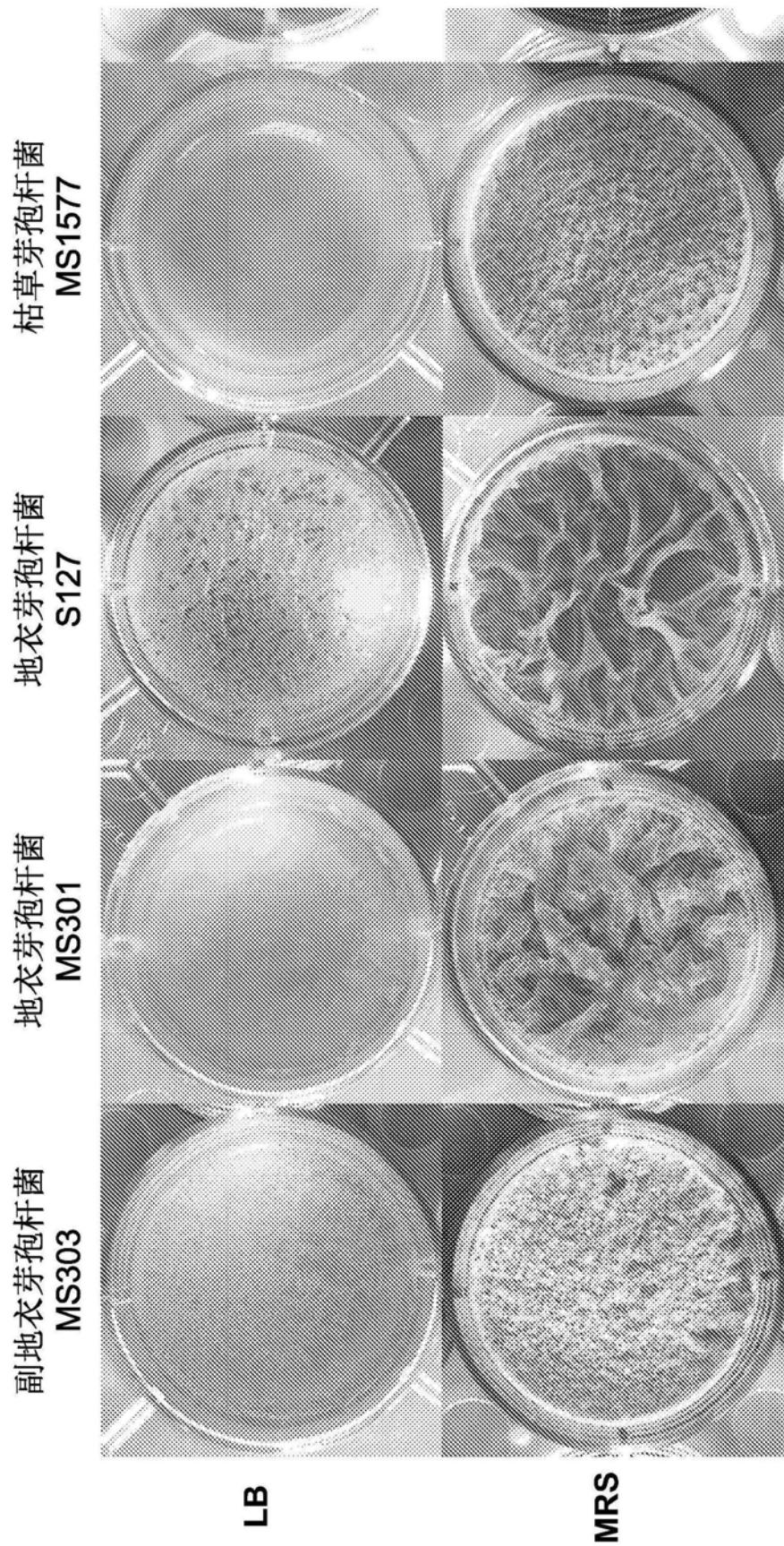


图7

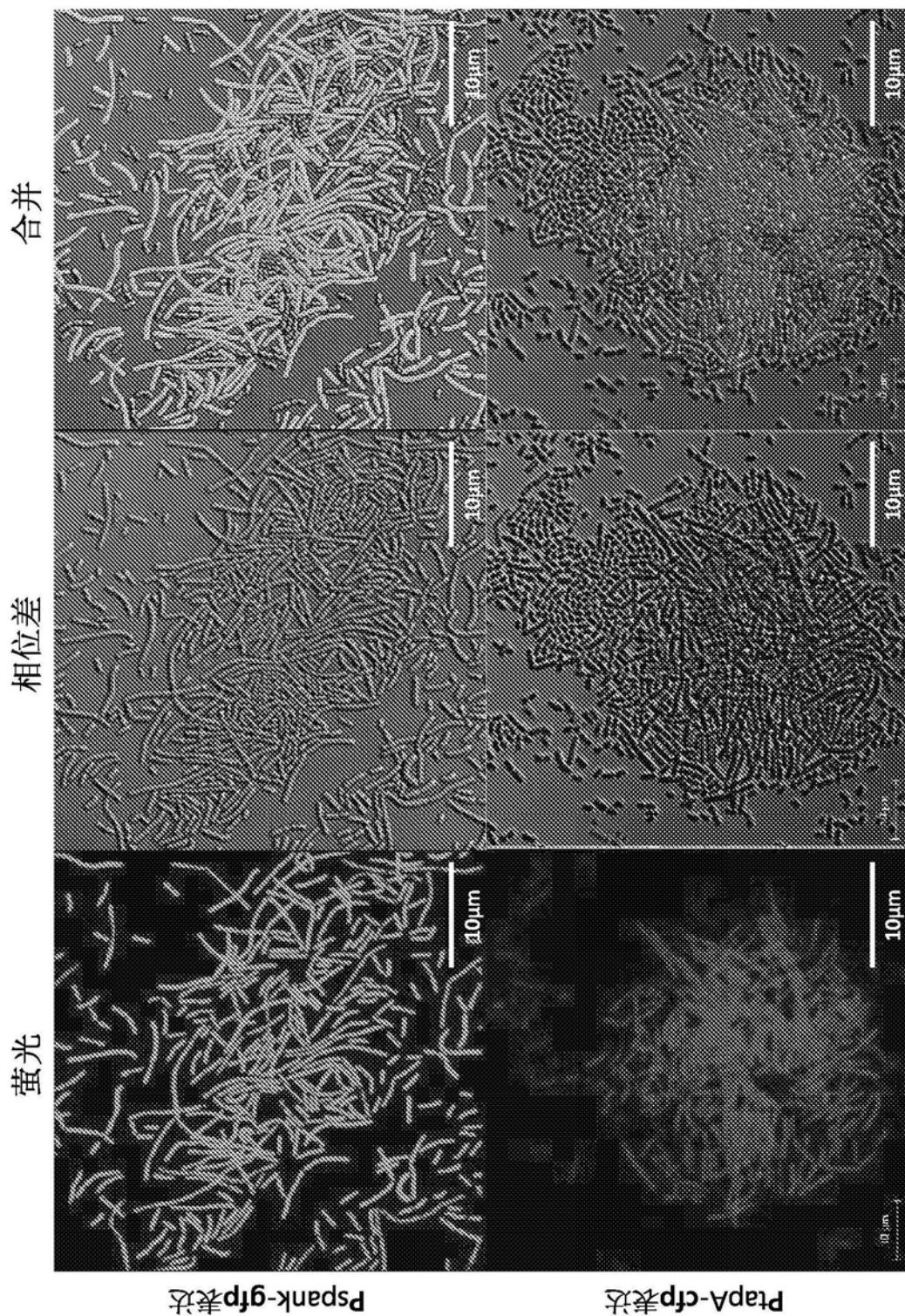


图8A

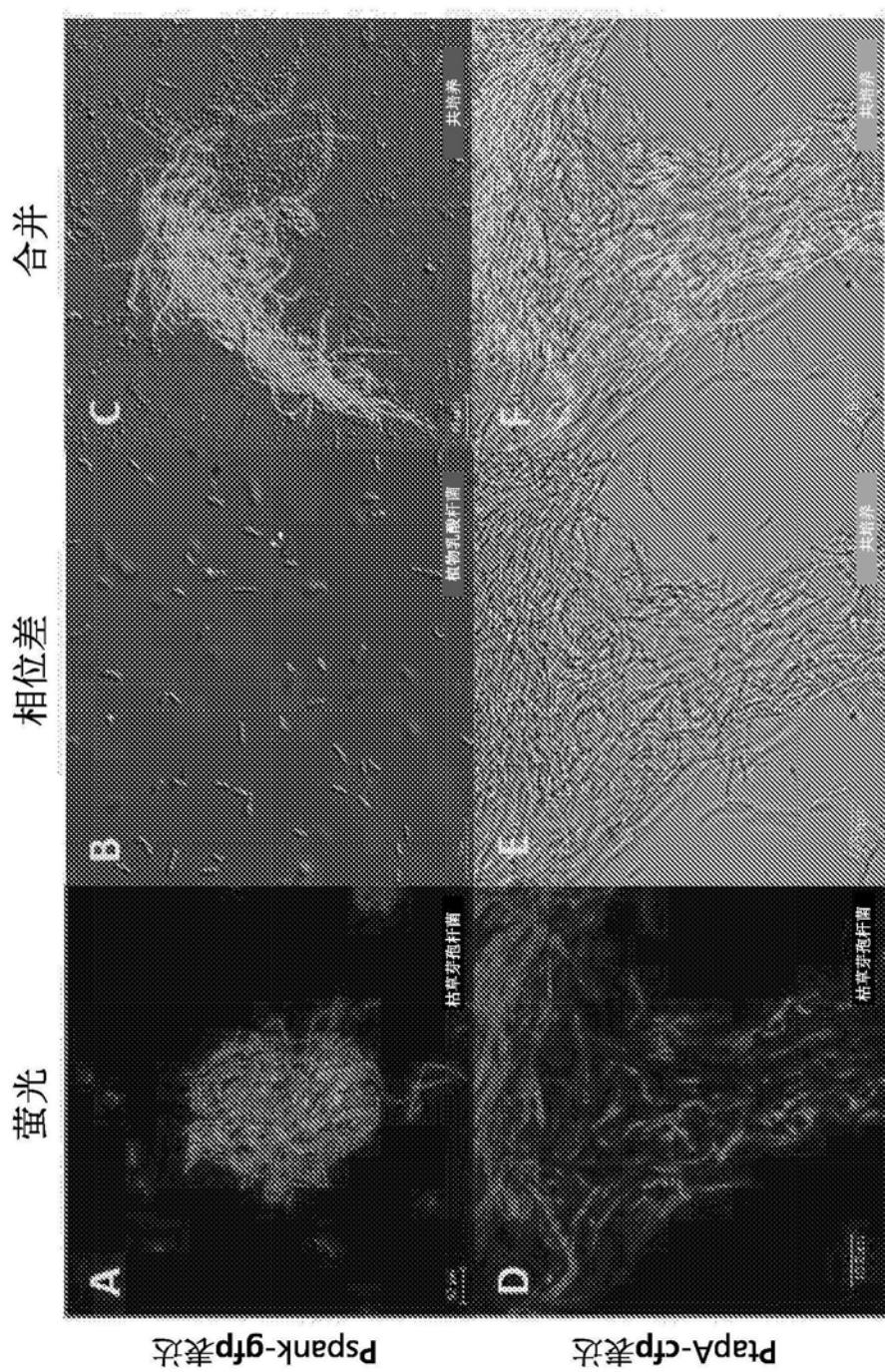


图8B

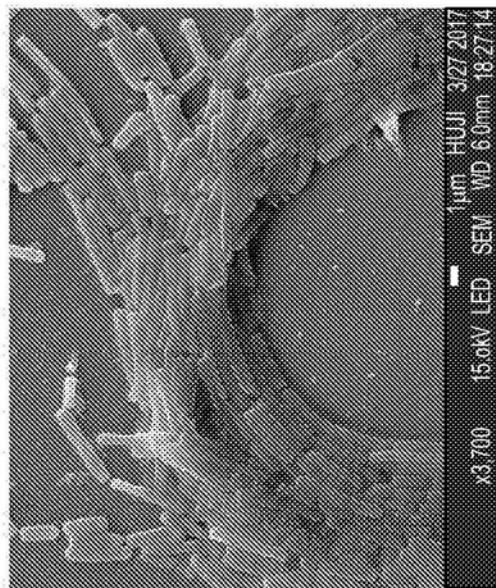


图9A

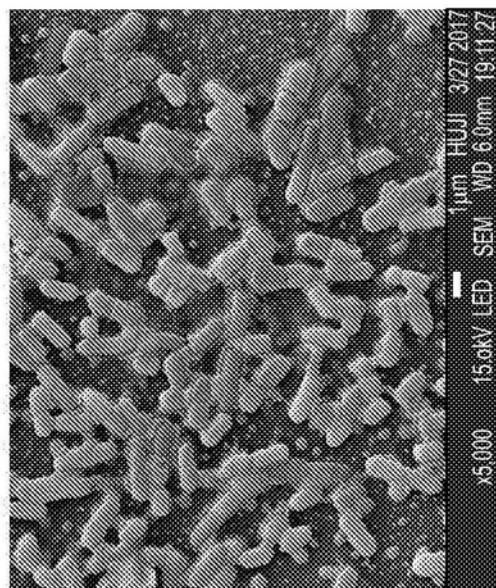


图9B

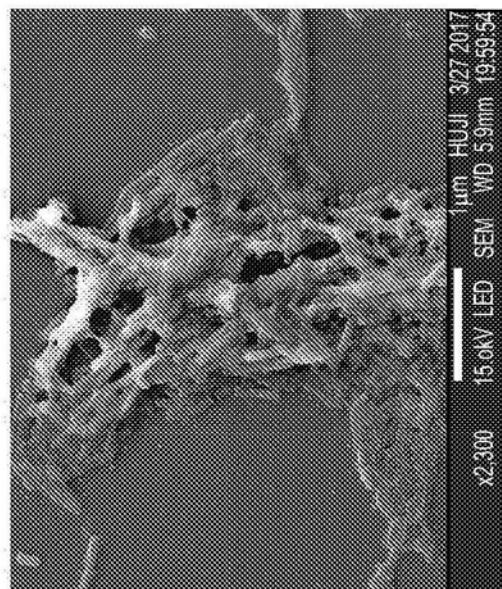


图9C

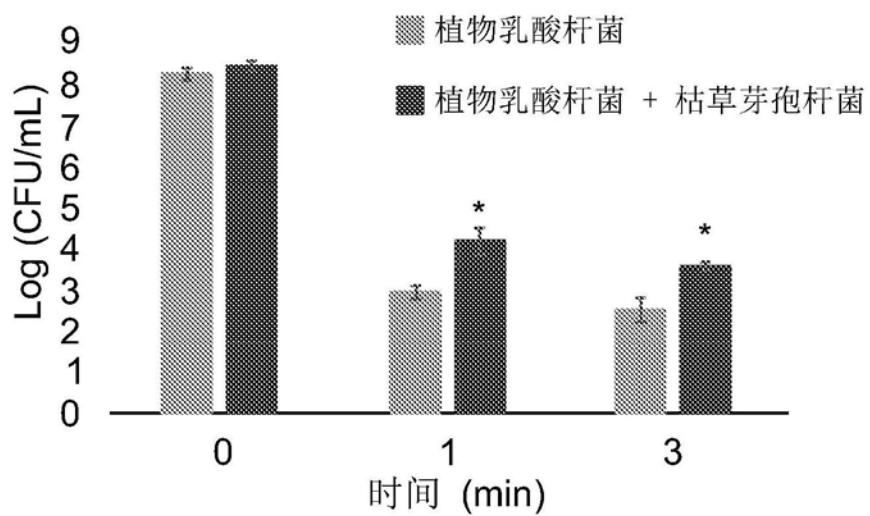


图10A

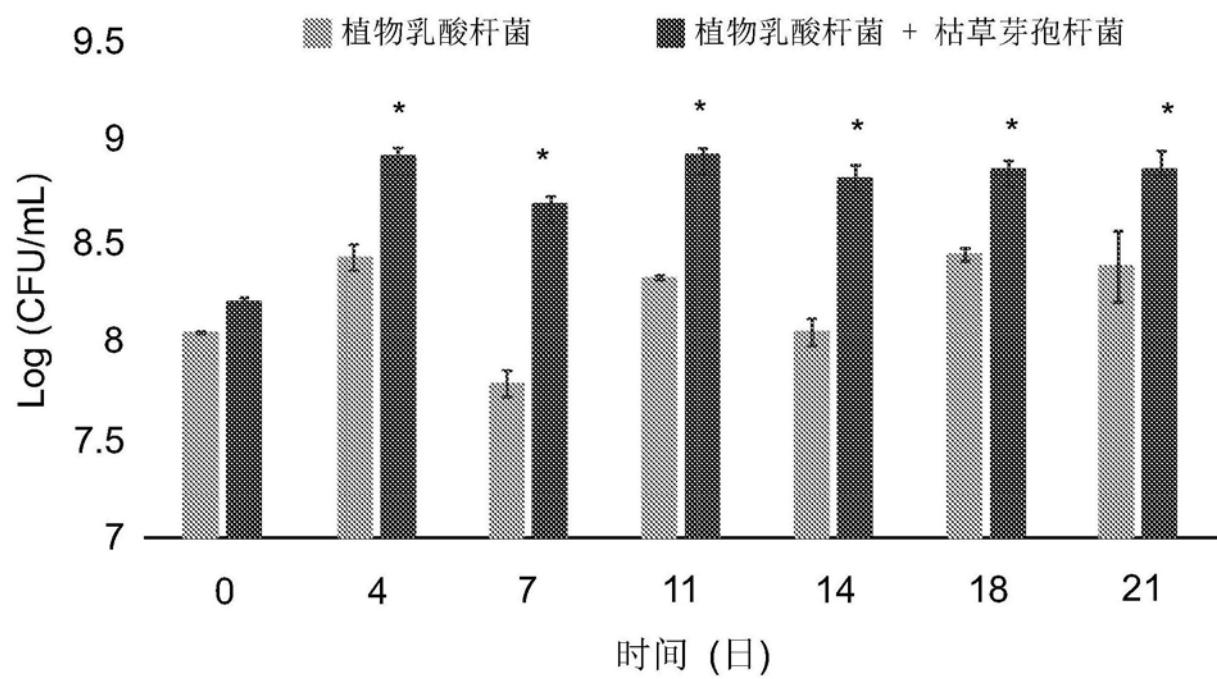
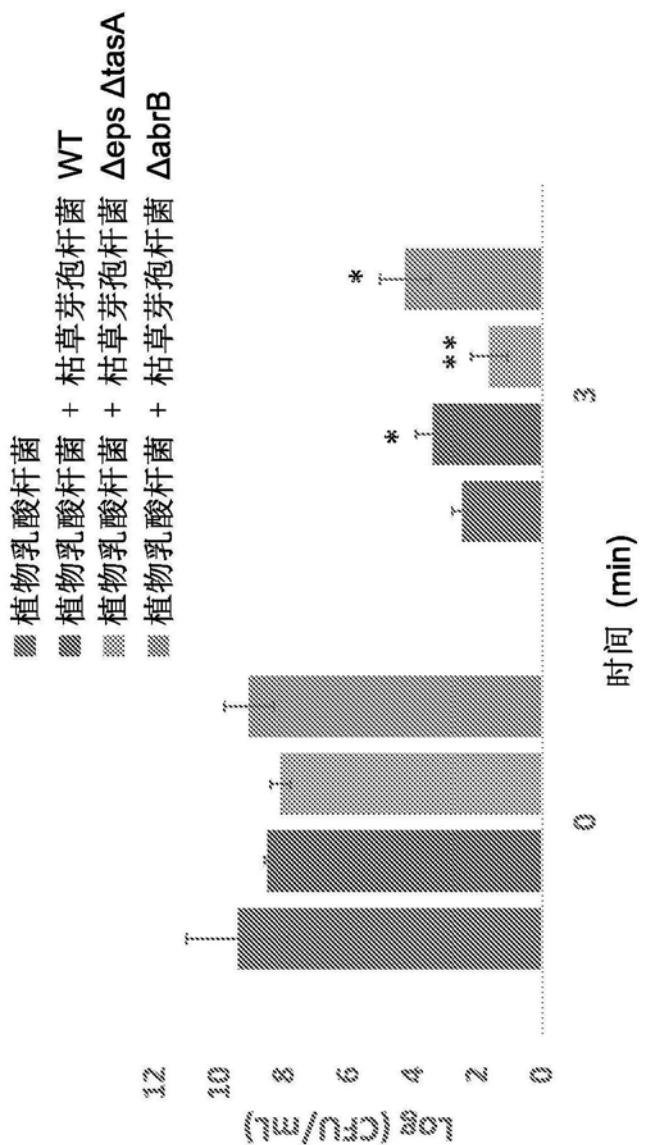
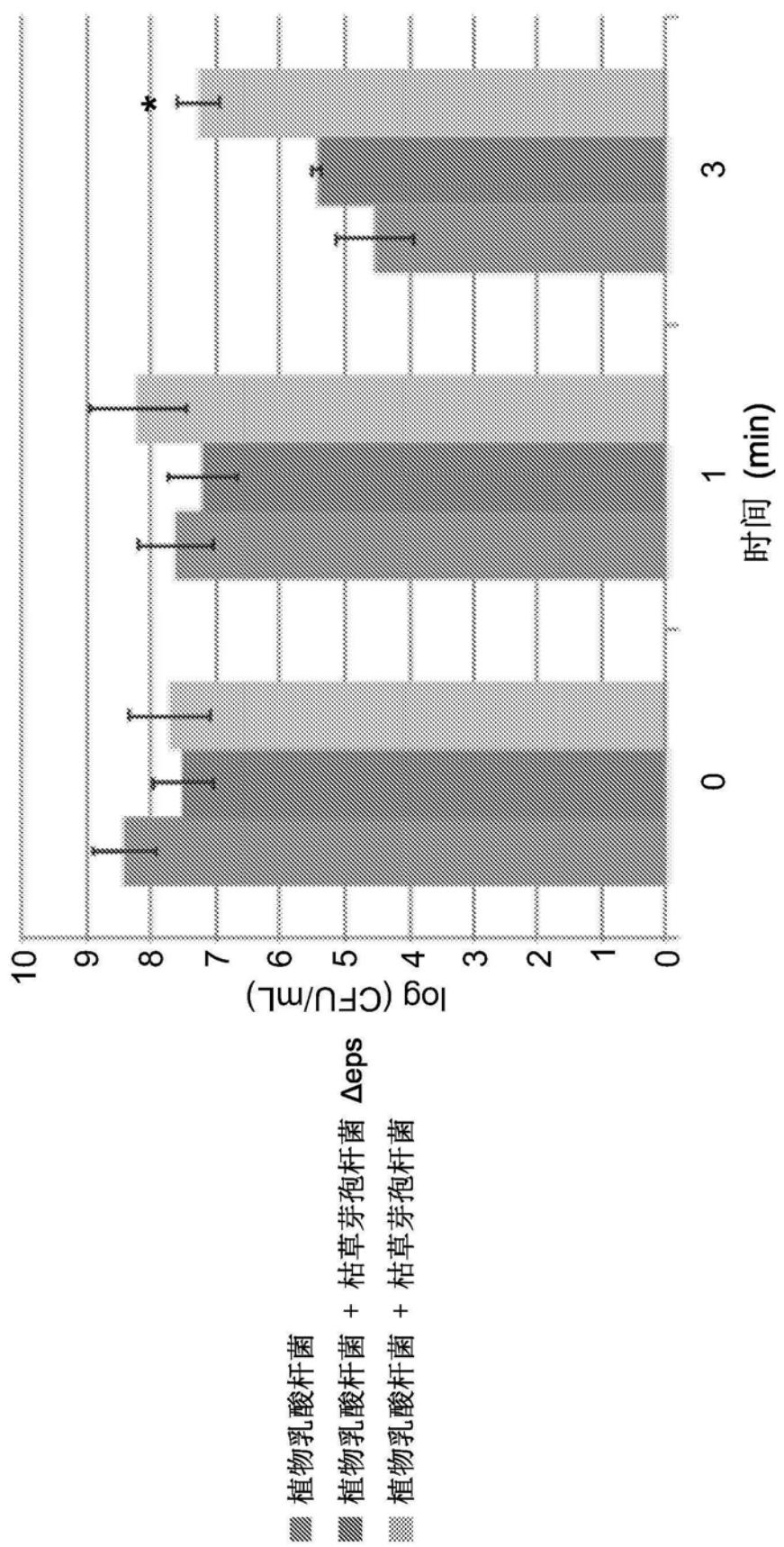
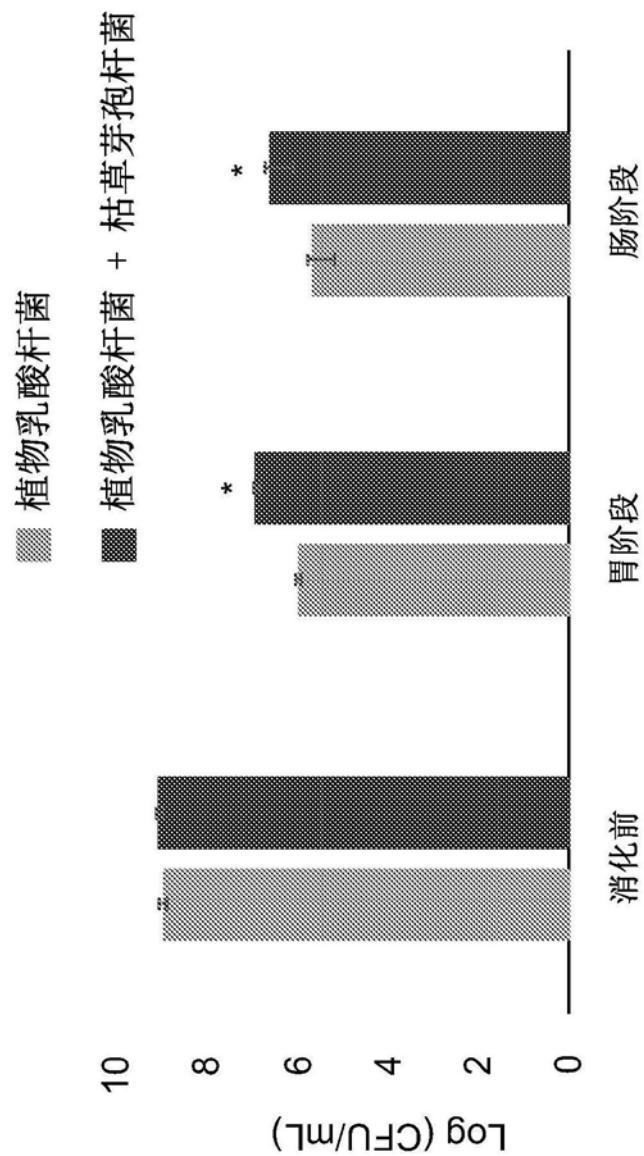


图10B







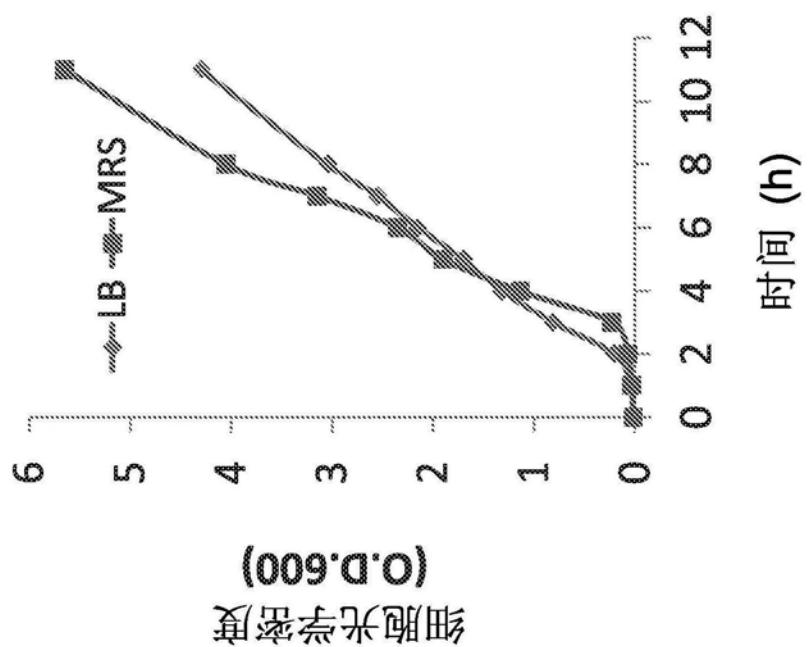
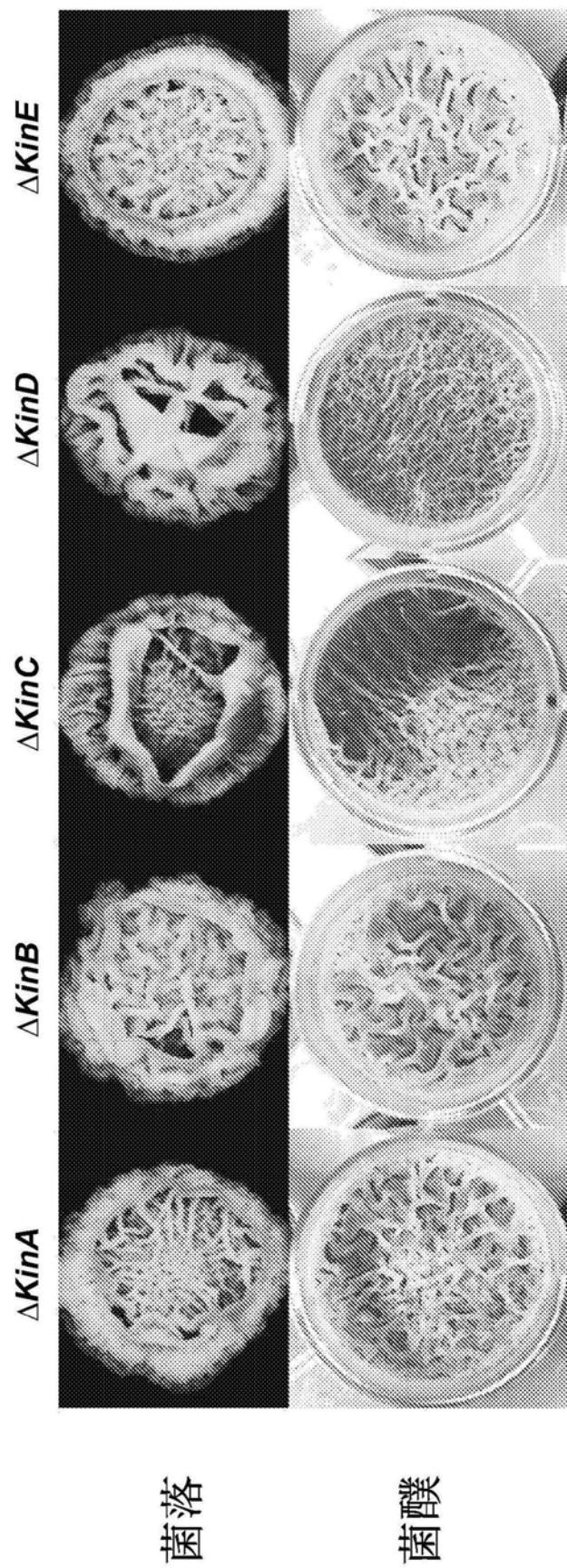


图13



菌落

菌醭

图14

图15A
图15B
图15C



图16B

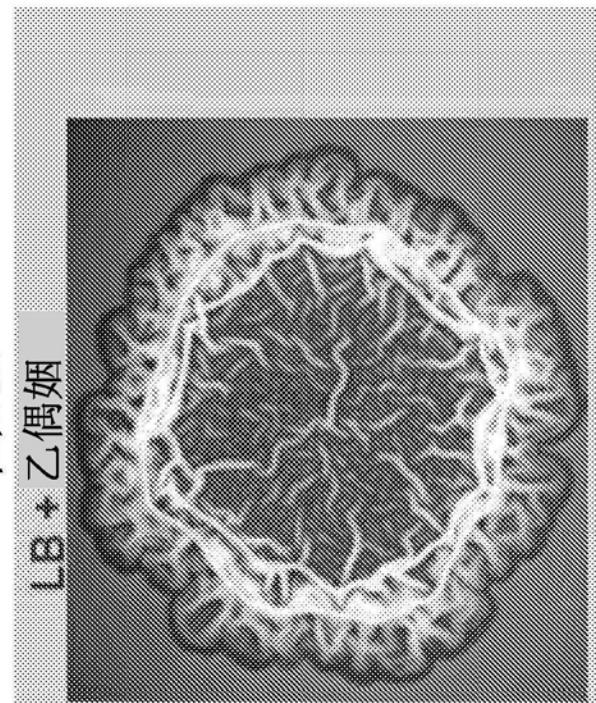


图16A

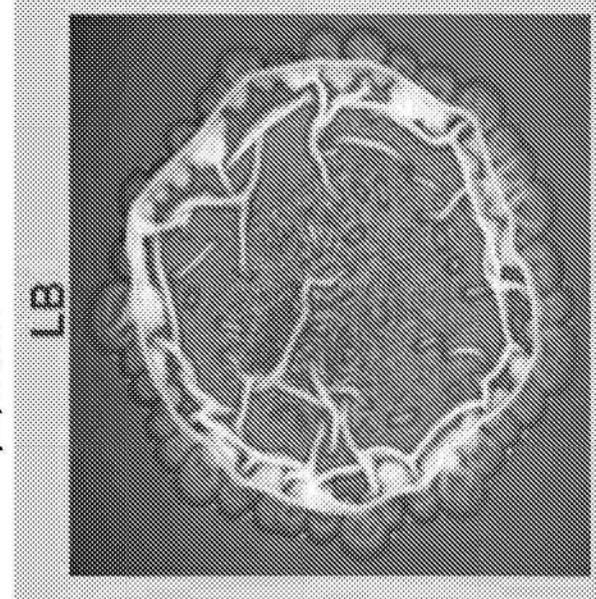


图17A

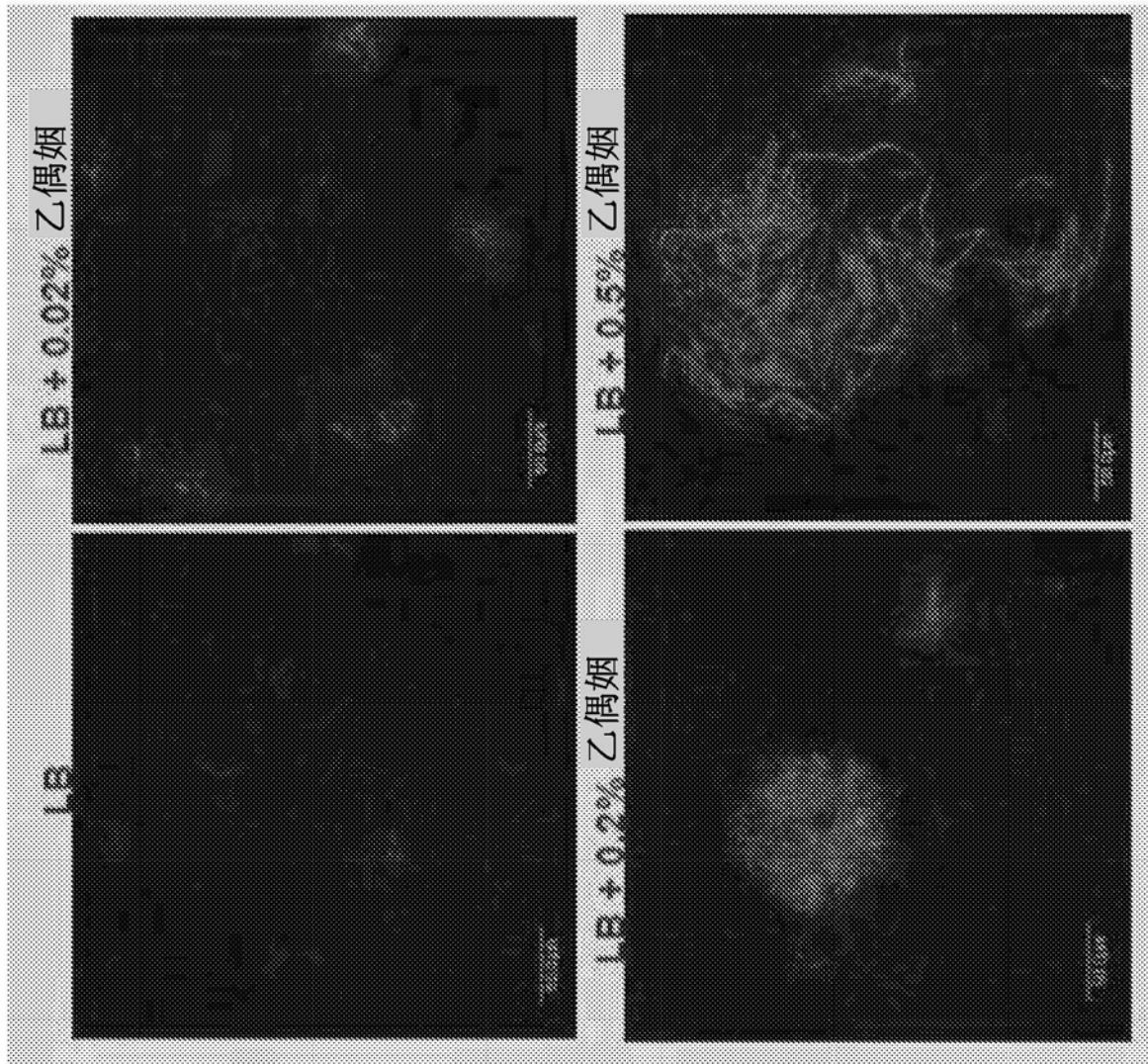


图17B

图17D

图17C



图18A

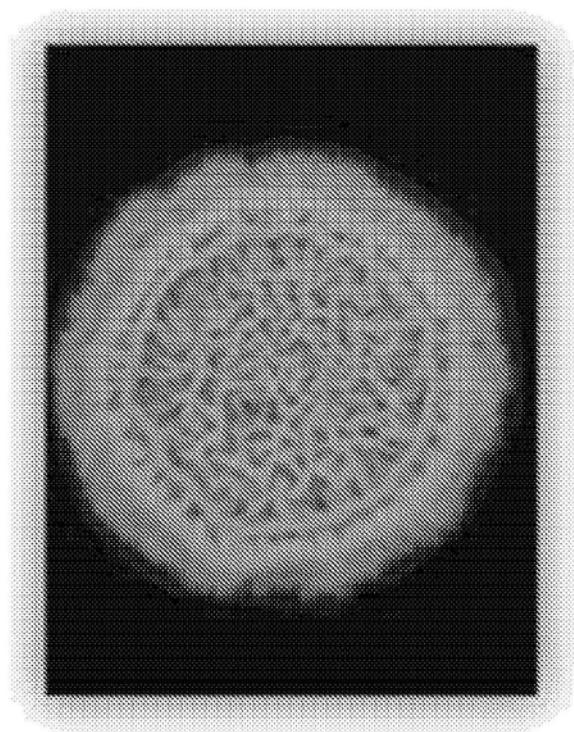
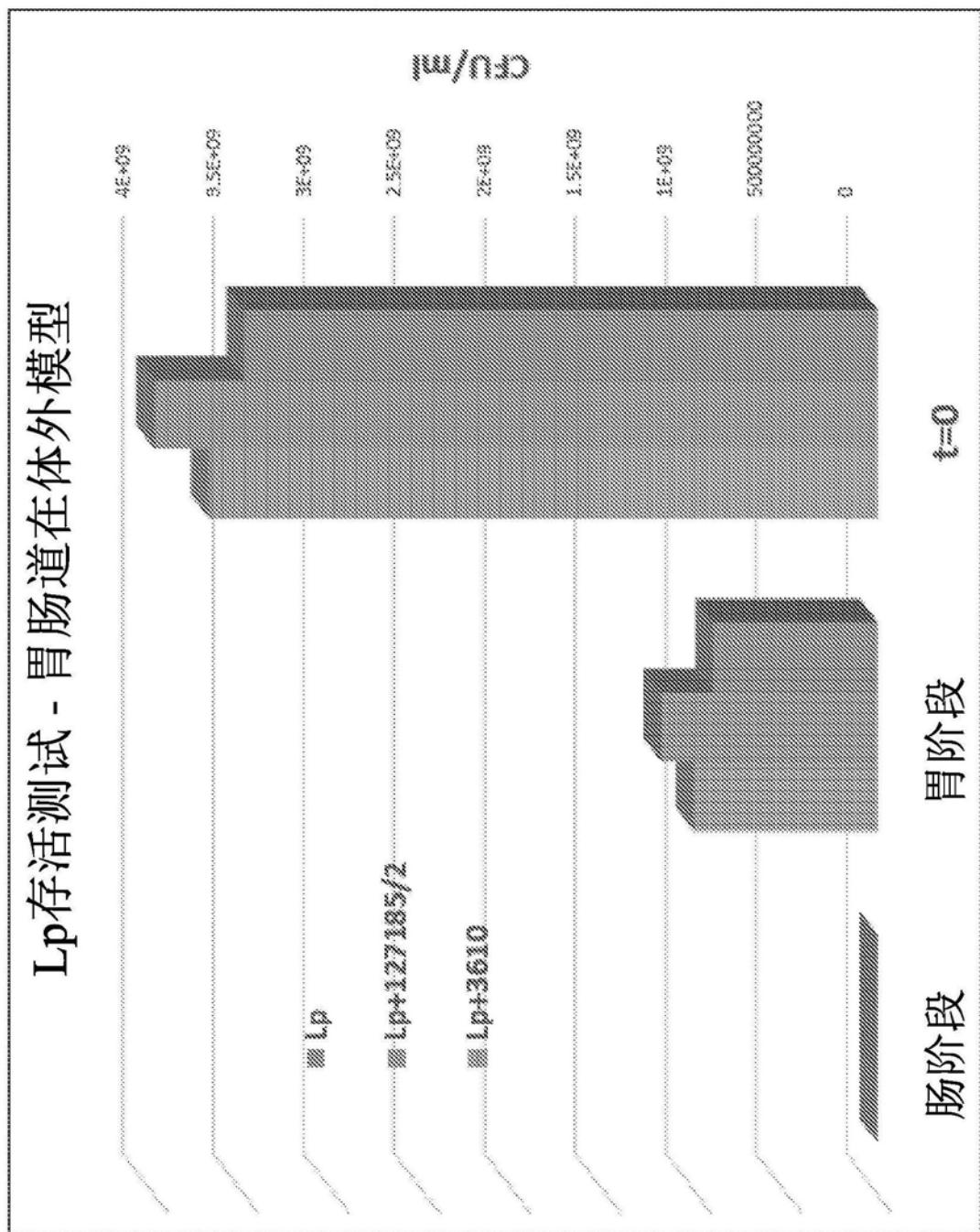
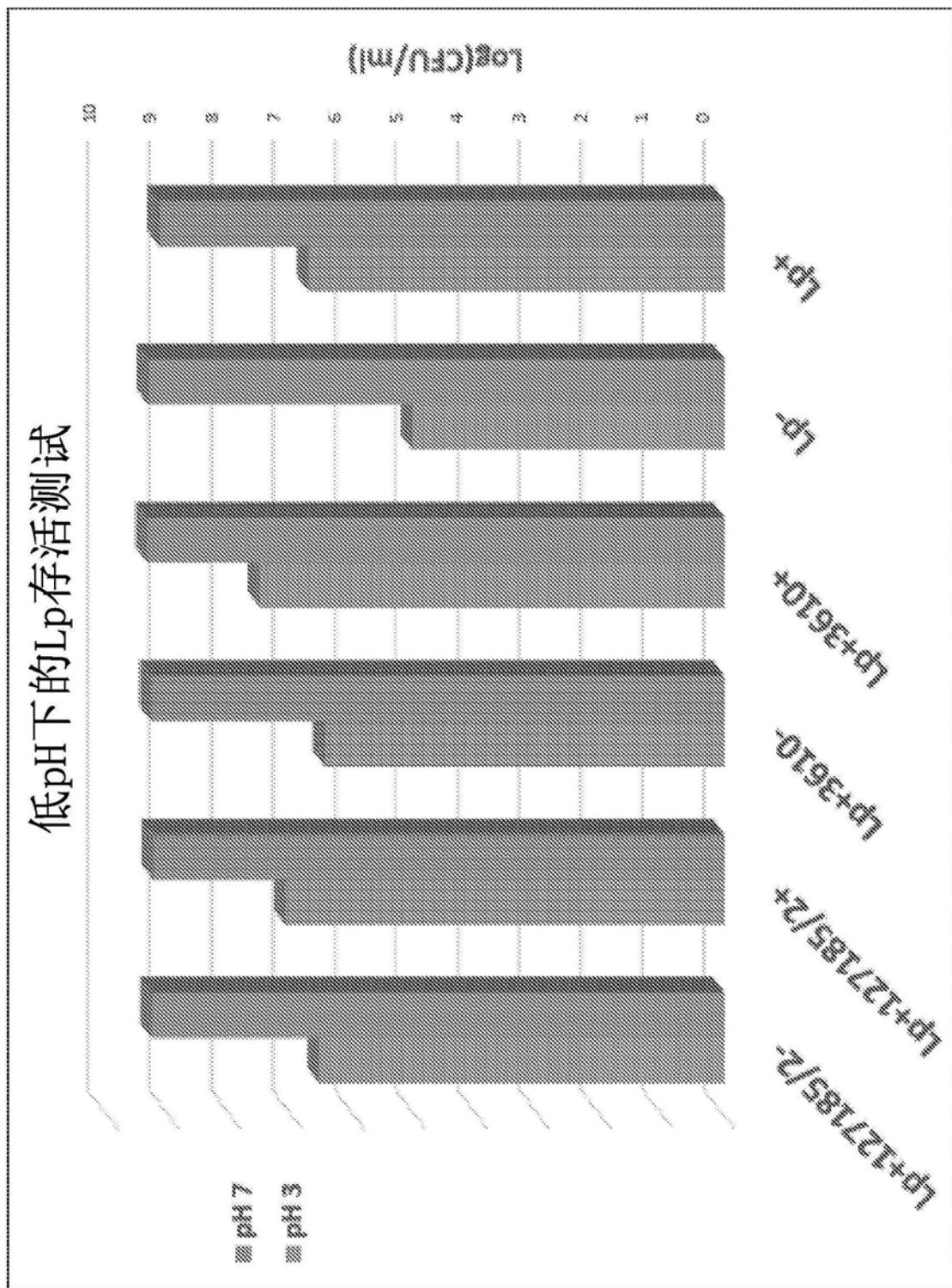


图18B





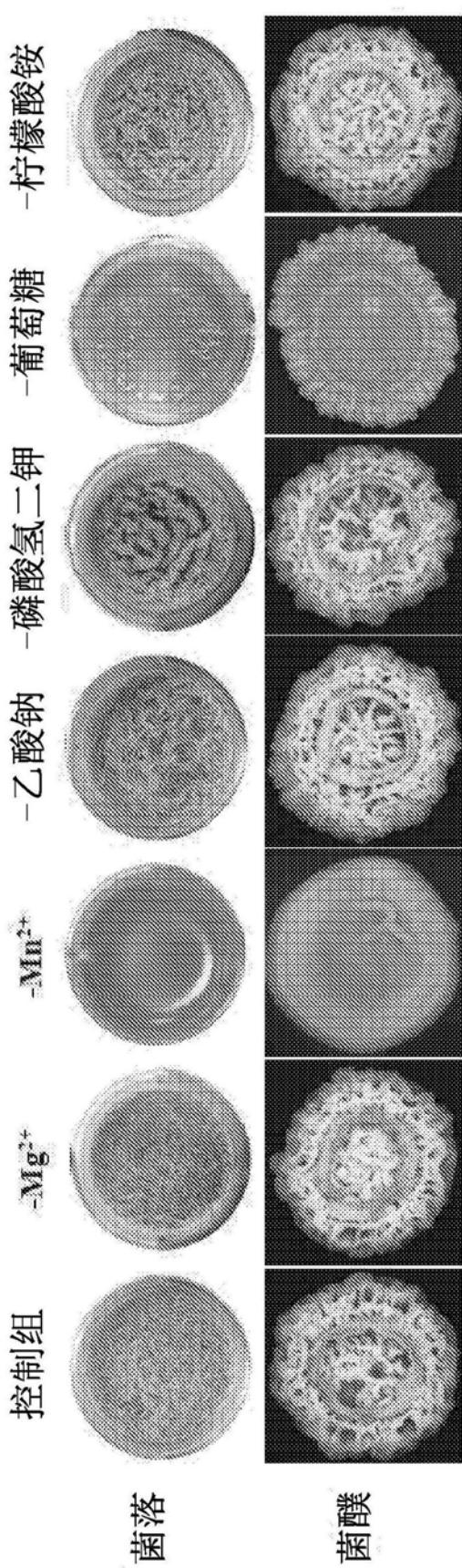


图21