

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 2 月 15 日 (15.02.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/028100 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 19/20* (2016.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/108476
- (22) 国际申请日: 2016 年 12 月 5 日 (05.12.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610652096.9 2016年8月10日 (10.08.2016) CN
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 张娟(ZHANG, Juan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。朱政明(ZHU, Zhengming); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。杨佩珊(YANG, Peishan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。陈坚(CHEN, Jian); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。堵国成(DU, Guocheng); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。
- (74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E501 耿晓岳, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二. 4(d) (i) 和 48.2(a) (viii))。

(54) Title: LACTOCOCCUS LACTIS STRAIN AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一株乳酸乳球菌及其应用

(57) Abstract: A Lactococcus lactis strain and use thereof, belonging to the field of food biotechnology. A separated strain is named as Lactococcus lactis WH101. The OD₆₀₀ value at pH 4.5 reaches 0.527 and increases, as compared to that before mutagenesis, by 4.5 times; and after being stressed in lactic acid at pH 4 for 3 h, the survival rate is 22.4 times more than that of the strain before mutagenesis under same treatment conditions. After being stressed with 15% ethanol for 4 h, 15% NaCl for 6 h and 1mmol/L H₂O₂ for 3 h respectively, the survival rates are 5.2, 2.0 and 1.9 times more than those of the original strain under the same treatment conditions respectively. The Lactococcus lactis strain has a higher tolerance to acid stress, to ethanol stress, to osmotic stress and to oxygen stress, and has great application value in the fields of food, fermentation and the like.

(57) 摘要: 一株乳酸乳球菌及其应用, 属于食品生物技术领域。分离得到的菌株命名为乳酸乳球菌 WH101(Lactococcus lactis WH101), 在pH 4.5的条件下, OD₆₀₀值达到0.527, 相比较诱变前提高了4.5倍; 在pH 4.0的乳酸中胁迫3h, 存活率是同等处理条件下诱变前菌株的22.4倍。分别用15%乙醇胁迫4h, 15%NaCl胁迫6h和1mmol/L H₂O₂胁迫3h后, 其存活率分别是同等处理条件下原始菌株的5.2, 2.0和1.9倍。其具有较好的酸胁迫、乙醇胁迫、渗透压胁迫和氧胁迫耐受性, 在食品、发酵等领域具有巨大的应用价值。

WO 2018/028100 A1

一株乳酸乳球菌及其应用

技术领域

本发明涉及一株乳酸乳球菌及其应用，属于食品生物技术领域。

背景技术

作为工业化的微生物细胞工厂，乳酸乳球菌已广泛应用于食品，发酵等领域。在开展上述领域中所需工业产品的发酵法生产过程中，产酸特性成为微生物必不可少的组成部分。一方面代谢产酸可帮助促进细胞能量转化、维持细胞内外渗透压平衡、增强本体细胞的环境竞争性。另一方面，随着胞内产酸的积累，导致微生物菌体细胞内的 pH 持续下降，胞内维持细胞正常生理功能的相关酶类活性受到抑制，进而影响细胞的代谢活性及其生产效率，并为生产成本、下游加工及后续工业排放物环境治理埋下诸多隐患。同时，作为益生菌中的一种，在人体胃肠道中也会遭受酸胁迫、胆盐胁迫等环境胁迫。因此，提高微生物菌株的酸胁迫耐受性，成为学术界和产业界亟待解决的重要问题。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是提供一株乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) WH101，其于 2016 年 4 月 29 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为 CCTCC NO: M 2016233，地址：中国，武汉，武汉大学。

所述乳酸乳球菌 CCTCC NO: M 2016233 是以乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) NZ9000 为出发菌株，以硫酸二乙酯为诱变剂诱变得到的，在 pH 4.5 的条件下，OD₆₀₀ 值达到 0.527，相比较诱变前提高了 4.5 倍；在 pH 4.0 的乳酸中胁迫 2h，存活率为 4.04%；在 pH 4.0 的乳酸中胁迫 3h，存活率是同等处理条件下诱变前菌株的 22.4 倍；可见，乳酸乳球菌 CCTCC NO: M 2016233 具有更好的生长性能和酸耐受性。分别用 15%乙醇胁迫 4 h，15% NaCl 胁迫 6 h 和 1mmol/L H₂O₂ 胁迫 3 h 后，其存活率分别是同等处理条件下原始菌株的 5.2，2.0 和 1.9 倍。可见，乳酸乳球菌 CCTCC NO: M 2016233 具有较好的酸胁迫、乙醇胁迫、渗透压胁迫和氧胁迫耐受性，在食品、发酵等领域具有巨大的应用价值。

生物材料保藏

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) WH101，已于 2016 年 4 月 29 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏地址为中国武汉 武汉大学，保藏编号为 CCTCC NO: M 2016233。

附图说明

图 1 不同环境胁迫条件下菌株的存活率实验

具体实施方式

GM17 培养基: 葡萄糖 5.0 g.L⁻¹, 胰蛋白胨 5.0 g.L⁻¹, 大豆蛋白胨 5.0 g.L⁻¹, 牛肉浸膏 5.0 g.L⁻¹, 酵母提取物 2.5 g.L⁻¹, 维生素 C 0.5 g.L⁻¹, 硫酸镁 0.25 g.L⁻¹, 甘油磷酸二钠 19.0 g.L⁻¹。

pH 4.5 的 GM17 培养基为 25%的乳酸调节的 pH 值为 4.5 的 GM17 培养基。其他 pH 的 GM17 培养基以同样方法得到。

实施例 1 乳酸乳球菌(CCTCC NO: M 2016233)的选育方法

以乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis* NZ9000) 为出发菌株, 将其在 GM17 培养基中培养至对数生长期, 调整菌液浓度 1×10^7 个/CFU, 取样离心 (5000rpm; 10min) 后去上清, 用 0.85% 的生理盐水洗涤重悬, 重复两次。加入含 0.5%v/v 硫酸二乙酯 (DES) 的 GM17 培养基等体积重悬, 100rpm, 30°C 处理 30min 后立即用 0.85% 的生理盐水洗涤重悬, 重复 5 次, 加入等体积的 GM17 培养基重悬后在 30°C 下静置培养 1.5h。

在 2.2ml 的 96 深孔板中加入 1ml 的 GM17 (pH 5.0) 培养基, 取上述后培养的培养液以 2%的接种量转接到 96 深孔板中, 30°C 下静置培养 48h, 考察诱变菌株在酸性培养基中的生长情况, 根据生物量的大小筛选出突变混合菌株, 然后将混合菌株经适当稀释涂布 pH 5.0 的平板, 挑选单菌落, 将单菌落于 pH 5.0 条件下发酵, 根据生物量大小筛选出突变菌株, 出发菌株 OD₆₀₀ 达到 0.076, 突变菌株 WH101 OD₆₀₀ 达到 0.612), 命名为乳酸乳球菌 WH101(*Lactococcus lactis* WH101), 于 2016 年 4 月 29 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC NO: M 2016233。

实施例 2 乳酸乳球菌(CCTCC NO: M 2016233)酸胁迫条件下的生长性能

将保藏于 -80°C 甘油管中的出发菌株乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis* NZ9000) 及选育到的乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis* WH101) 以 2%的接种量接入 GM17 培养基, 在 30°C 静置培养 12h。

以 2%的接种量分别取活化好的乳酸乳球菌 NZ9000 和乳酸乳球菌 WH101 转接到 pH 4.5 的 GM17 培养基中, 于 30°C 下静置培养 48h, 发酵结束后测定发酵液的菌浓。在 pH 4.5 的条件下, 突变菌株 OD₆₀₀ 值达到 0.527, 相比较选育前提高了 4.5 倍。结果如表 1 所示。

表 1 酸胁迫条件下菌体生长性能

菌株	<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	<i>Lactococcus lactis</i> WH101
OD ₆₀₀	0.081	0.527

实施例 3 酸耐受性实验

将保藏于 -80°C 甘油管中的出发菌株乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis* NZ9000) 及选育到的乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis* WH101) 以 2%的接种量接入 GM17 培养基, 在 30°C 静置培养 12h。

以 2% 的接种量分别取活化好的乳酸乳球菌 NZ9000 和乳酸乳球菌 WH101 到 GM17 培养基中，30°C 静置培养至对数生长期。

取对数生长期的细胞，经 5000rpm 离心 10min 收集菌体，菌体经 0.85% 的生理盐水洗涤离心 2 次后，等体积重悬于 GM17(pH 4.0) 培养基中胁迫不同的时间取样，重新用相同的生理盐水离心洗涤细胞 2 次，并重悬于等体积的生理盐水中，取 100 μ l 的菌液经适当稀释后涂布平板，于 30°C 静置培养 24h，分别计算存活率大小（如表 2 所示）。突变菌株 WH101 在 pH 4.0 的乳酸中分别胁迫 1h, 2h, 3h，存活率分别是同等处理条件下选育前菌株的 1.2 倍，4.1 倍，22.4 倍。

表 2 酸耐受性实验

存活率(%) 时间 (h)	<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	<i>Lactococcus lactis</i> WH101
0	100	100
1	65.08	74.34
2	0.99	4.04
3	0.05	1.11

实施例 4 其它环境耐受性实验

将保藏于 -80°C 甘油管中的出发菌株乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis* NZ9000) 及选育到的乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis* WH101) 以 2% 的接种量接入 GM17 培养基，在 30°C 静置培养 12h。

以 2% 的接种量分别取活化好的乳酸乳球菌 NZ9000 和乳酸乳球菌 WH101 到 GM17 培养基中，30°C 静置培养至对数生长期。取对数生长期的细胞，经 5000rpm 离心 10min 收集菌体，菌体经 0.85% 的生理盐水洗涤离心 2 次后，分别等体积重悬于含 15% (v/v) 乙醇，15% (v/v) NaCl 和 1mmol/L H₂O₂ 的 GM17 培养基中胁迫不同的时间取样，重新用相同的生理盐水离心洗涤细胞 2 次，并重悬于等体积的生理盐水中，取 100 μ l 的菌液经适当稀释后涂布平板，于 30°C 静置培养 24h，分别计算存活率大小（如图 1 所示）。突变菌株 WH101 在含 15% 乙醇的 GM17 培养基中胁迫 4 h 后，存活率是同等处理条件下原始菌株的 5.2 倍。其在含 15% NaCl 的 GM17 培养基中胁迫 6 h 后，存活率是同等处理条件下原始菌株的 2.0 倍。而在含 1mmol/L H₂O₂ 的 GM17 培养基中胁迫 3 h 后，存活率是同等处理条件下原始菌株的 1.9 倍。

中国典型培养物保藏中心

用于专利程序的培养物保藏受理通知书（收据）

地址：中国 武汉 武汉大学 邮编：430072 电话：(027) 68754052 传真：(027) 68754833 E-mail: cctcc@whu.edu.cn

请求保藏人和其代理人：

请求保藏人：江南大学 张娟

专利代理人：

专利申请号：

您（们）提供请求保藏的培养物名称
及注明的鉴别特征：

本保藏中心保藏编号
CCTCC NO: M 2016233

乳酸乳球菌 WH101

Lactococcus lactis WH101

上述请求保藏的培养物附有

☐ 科学描述

☒ 提议的分类命名

注：在框内打 √ 号表示有，打×号表示没有。

该培养物已于 2016 年 4 月 29 日由本保藏中心收到，并登记入册。
根据您（们）的请求，由该日起保存三十年，在期满前收到提供培养物样品的请求后再延续保存五年。

该培养物的存活性本保藏中心于 2016 年 5 月 8 日检测完毕，结果为存活。

中国典型培养物保藏中心

负责人（签名）

2016 年 5 月 8 日

权 利 要 求 书

1、一株乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) WH101, 其特征在于, 于 2016 年 4 月 29 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC NO: M 2016233, 保藏地址为中国武汉 武汉大学。

2、权利要求 1 所述的乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) WH101 在制备发酵食品中的应用。

3、根据权利要求 2 所述的应用, 其特征在于, 所述发酵食品是泡菜。

4、根据权利要求 2 所述的应用, 其特征在于, 所述发酵食品是酸奶。

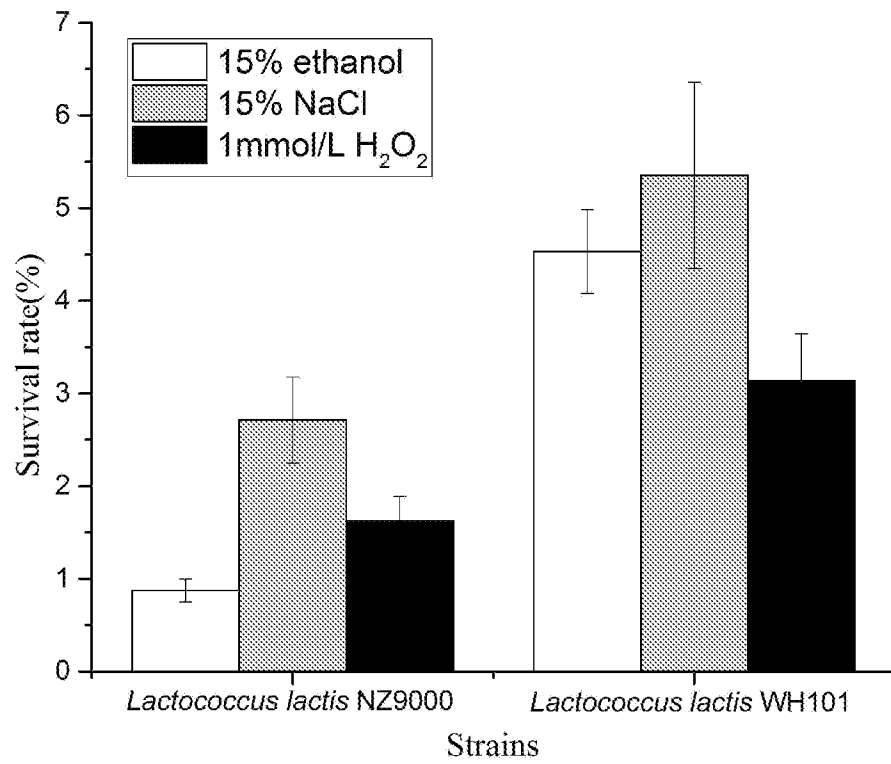


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/108476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20 (2006.01) i; A23L 19/20 (2016.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, WPI, EPODOC, PubMed, ISI Web of Knowledge, CNKI: lactococcus lactis, CCTCC NO: M2016233, fermented food, acid stress, ethanol stress, osmotic stress, oxidative stress, tolerance, resistance

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106047773 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 26 October 2016 (26.10.2016) claims 1-4	1-4
A	CN 105063077 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 18 November 2015 (18.11.2015) the whole document	1-4
A	CN 101451117 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 10 June 2009 (10.06.2009) the whole document	1-4
A	CN 104593311 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 06 May 2015 (06.05.2015) the whole document	1-4
A	JP 201110594 A (NAT. AGRIC. & FOOD RES. ORG.) 20 January 2011 (20.01.2011) the whole document	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 21 February 2017	Date of mailing of the international search report 08 March 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer LI, Zidong Telephone No. (86-10) 62414280

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2016/108476

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZULJAN, F. A. et al. a-Acetolactate synthase of Lactococcus lactis contributes to pH homeostasis in acid stress conditions." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, vol. 188, 27 July 2014 (27.07.2014), pages 99-107	1-4
A	BUDIN-VERNEUIL, A. et al. "Proteomic characterization of the acid tolerance response in Lactococcus lactis MG1363." PROTEOMICS, vol. 5, 31 December 2005 (31.12.2005), pages 4794-4807	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/108476

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106047773 A	26 October 2016	None	
CN 105063077 A	18 November 2015	None	
CN 101451117 A	10 June 2009	None	
CN 104593311 A	06 May 2015	None	
JP 201110594 A	20 January 2011	JP 5470637 B2	16 April 2014

A. 主题的分类 C12N 1/20(2006.01)i; A23L 19/20(2016.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N; A23L 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNPAT, WPI, EPODOC, PubMed, ISI Web of Knowledge, CNKI, 乳酸乳球菌, 发酵食品, 酸胁迫, 乙醇胁迫, 渗透压胁迫, 氧胁迫, 耐受, lactococcus lactis, CCTCC NO: M2016233, fermented food, acid stress, ethanol stress, osmotic stress, oxidative stress, tolerance, resistance		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 106047773 A (江南大学) 2016年 10月 26日 (2016 - 10 - 26) 权利要求1-4	1-4
A	CN 105063077 A (江南大学) 2015年 11月 18日 (2015 - 11 - 18) 全文	1-4
A	CN 101451117 A (江南大学) 2009年 6月 10日 (2009 - 06 - 10) 全文	1-4
A	CN 104593311 A (江南大学) 2015年 5月 6日 (2015 - 05 - 06) 全文	1-4
A	JP 特开201110594 A (NAT. AGRIC. & FOOD RES. ORG.) 2011年 1月 20日 (2011 - 01 - 20) 全文	1-4
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2017年 2月 21日		国际检索报告邮寄日期 2017年 3月 8日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 李子东 电话号码 (86-10)62414280

C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	ZULJAN, F.A. 等. "α-Acetolactate synthase of Lactococcus lactis contributes to pH homeostasis in acid stress conditions." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, 第188卷, 2014年 7月 27日 (2014 - 07 - 27), 第99-107页	1-4
A	BUDIN-VERNEUIL, A. 等. "Proteomic characterization of the acid tolerance response in Lactococcus lactis MG1363." PROTEOMICS, 第5卷, 2005年 12月 31日 (2005 - 12 - 31), 第4794-4807页	1-4

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/108476

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	106047773	A	2016年 10月 26日	无	
CN	105063077	A	2015年 11月 18日	无	
CN	101451117	A	2009年 6月 10日	无	
CN	104593311	A	2015年 5月 6日	无	
JP	特开201110594	A	2011年 1月 20日	JP 5470637 B2	2014年 4月 16日