(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106957810 B
(45)授权公告日 2020.05.05

(21)申请号 201710360847.4

(22)申请日 2017.05.22

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106957810 A

(43)申请公布日 2017.07.18

(83)生物保藏信息
CGMCC NO:12126 2016.02.01

(73)专利权人 哈尔滨中科生物工程有限公司
地址 266109 山东省青岛市城阳区正阳路196号国际商务港507

(72)发明人 隋利涛 曹亚彬 梁晓彤

(74)专利代理机构 山东三邦知识产权代理事务所(普通合伙) 37308
代理人 肖太升 高洋

(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)
A23K 10/18(2016.01)
A61K 35/741(2015.01)
A61P 31/04(2006.01)

(56)对比文件
CN 104388345 A,2015.03.04,
US 2011/0129529 A1,2011.06.02,
宋晓敏等.发酵食品中乳酸菌的耐药性现状分析.《微生物学通报》.2015,第42卷(第1期),第210页表3.

审查员 李婷

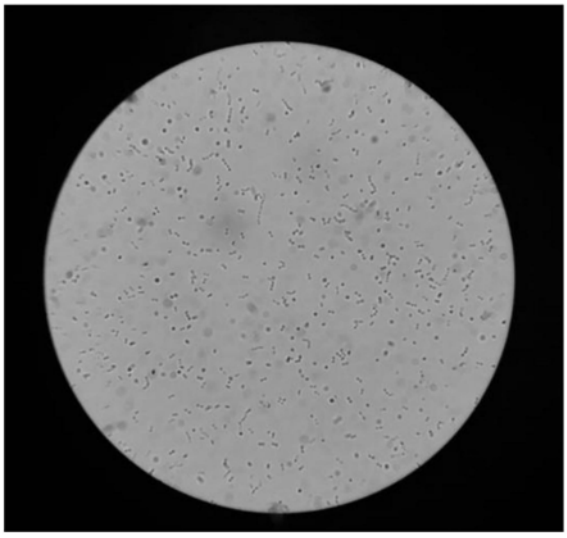
权利要求书1页 说明书10页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种乳酸片球菌及其用途

(57)摘要

本发明公开了一种乳酸片球菌及其用途,属于生物工程技术领域。本发明所述的乳酸片球菌,为乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)zk160135,于2016年02月01日保藏于:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC NO:12126,地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,请求保藏单位为哈尔滨中科生物工程有限公司。本发明的乳酸片球菌耐胃液和胆盐;对病原微生物具有抑制作用。使用本发明的菌株能够有效提高动物的免疫力、改善肠道微环境和促进生长,具有优异的益生作用。



CN 106957810 B

1. 一种乳酸片球菌，其特征在于：所述乳酸片球菌为乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)zk160135，于2016年02月01日保藏于：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为CGMCC NO:12126。

2.一种促进动物生长的方法，其特征在于：使用权利要求1所述乳酸片球菌制成微生态制剂或中药发酵制剂。

一种乳酸片球菌及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域，具体涉及一种乳酸片球菌及其用途。

背景技术

[0002] 乳酸菌是动物肠道正常菌群中的优势菌，能够利用可发酵糖产生大量乳酸，具有调节肠道内菌群平衡、提高机体免疫力并促进营养吸收等功能，也有不少关于乳酸菌促进动物增质量、提高饲料利用率、分泌抑菌物质并减少发病率等方面的报道。近年来，已从许多乳酸菌中分离出了产细菌素的菌株，但其中对乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)产生的片球菌素(Pediocin)的研究最为突出。片球菌素对大肠杆菌、单核细胞增多症李氏杆菌、金黄色葡萄球菌、肉毒梭菌和产气荚膜梭状芽胞杆菌等有抑制和杀灭作用。片球菌素具有宽的pH耐受性和对低、高温的耐受性。乳酸片球菌常用于肉品、乳品和蔬菜的发酵，可改善食品的质地、风味、色泽、消化性和营养价值等，同时乳酸片球菌是饲料添加剂品种目录(2013)(中华人民共和国农业部公告第2045号)中允许使用的安全菌株。

发明内容

[0003] 为了解决现有技术中存在的问题，本发明的技术方案如下：

[0004] 一种乳酸片球菌，为乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)zk160135，于2016年02月01日保藏于：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为CGMCC NO:12126，地址为：北京市朝阳区北辰西路1号院3号，请求保藏单位为哈尔滨中科生物工程有限公司。

[0005] 在上述方案的基础上，所述乳酸片球菌分离于健康牛粪。

[0006] 在上述方案的基础上，所述乳酸片球菌的菌落形态为乳白色、较小、圆形、表面湿润且光滑，边缘整齐，成对、成链或聚团状排列。

[0007] 在上述方案的基础上，所述乳酸片球菌具有如下菌学特性：

[0008] 具有链霉素、丙氟哌酸、万古霉素和卡那霉素的抗性；耐胃液和胆盐；对猪源产肠毒素型大肠杆菌(E.coli O139)、金黄色葡萄球菌(SA)和单核细胞增多症李氏杆菌具有抑制作用。

[0009] 在上述方案的基础上，所述乳酸片球菌最适生长温度为35℃～45℃、最适初始pH值6.2～6.5。

[0010] 在上述方案的基础上，所述乳酸片球菌可用于调整动物肠道功能、促进动物生长、提高动物免疫力。

[0011] 在上述方案的基础上，使用时乳酸片球菌的含量≥1亿/mL。

[0012] 一种调整动物肠道功能的方法，使用上述乳酸片球菌制成微生态制剂或中药发酵制剂。

[0013] 一种促进动物生长的方法，使用上述乳酸片球菌制成微生态制剂或中药发酵制剂。

[0014] 一种提高动物免疫力的方法，使用上述乳酸片球菌制成微生态制剂或中药发酵制剂。

[0015] 本发明的有益效果

[0016] 本发明的乳酸片球菌具有链霉素、丙氟哌酸、万古霉素和卡那霉素的抗性；耐胃液和胆盐；对猪源产肠毒素型大肠杆菌(E.coli O139)、金黄色葡萄球菌(SA)和单核细胞增多症李氏杆菌具有抑制作用。此外，本发明的乳酸片球菌菌株能耐受消化道内的环境，耐受胃酸和胆盐，生长速度快，抗逆性强，稳定性好。用本发明的乳酸片球菌发酵中药制备中药发酵制剂，有效的补充或增强了原有药物的功能；中药经乳酸片球菌转化后产生了新的活性物质；该中药发酵制剂能够有效提高动物的免疫力、改善肠道微环境和促进生长，具有优异的益生作用。

附图说明

[0017] 图1.菌株P-2在液体培养基37℃静置培养24h，显微镜下放大400倍观察图；

[0018] 图2.菌株P-2的菌落形态；

[0019] 图3.菌株P-2的16S rDNA系统发育树；

[0020] 图4乳酸片球菌zk160135与乳酸片球菌AS1.2696产酸性能对比；

[0021] 图5乳酸片球菌zk160135与乳酸片球菌AS1.2696的生长曲线。

具体实施方式

[0022] 在本发明中所使用的术语，除非有另外说明，一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0023] 下面结合具体实施例，并参照数据进一步详细的描述本发明。以下实施例只是为了举例说明本发明，而非以任何方式限制本发明的范围。

[0024] 本发明所述的乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)于2016年02月01日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为CGMCC NO:12126，地址为：北京市朝阳区北辰西路1号院3号，请求保藏单位为哈尔滨中科生物工程有限公司，保藏名称为乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)zk160135。

[0025] 实施例1样品采集、菌株分离及筛选

[0026] 1.1分离及筛选菌种培养基

[0027] MRS液体培养基(g/L)：蛋白胨10.0、肉膏8.0、酵母浸粉4.0、葡萄糖20.0、磷酸氢二钾2.0、柠檬酸氢二铵2.0、乙酸钠5.0、硫酸镁0.2、硫酸锰0.04、吐温80 1.0、碳酸钙20.0，调pH 6.2-6.45。115℃灭菌20min。

[0028] 固体培养基：在液体培养基的基础上添加1.5％的琼脂。

[0029] 1.2模拟胃液：胰蛋白胨8.3g、葡萄糖3.5g、氯化钠2.05g、氯化钙0.11g、氯化钾0.37g、磷酸二氢钾0.6g、猪胆盐0.05g、溶菌酶0.1g、胃蛋白酶13.3g、蒸馏水1000mL，盐酸分别调pH值至1.5、2.5，115℃灭菌20min。

[0030] 1.3样品采集

[0031] 分离样品采集于健康牛粪。

[0032] 采集时间和地点：于2015年01月采集于哈尔滨巴彦县丰源养牛场。

[0033] 1.4菌株的分离和筛选

[0034] 取样品10g，放入盛有90mL无菌生理盐水的三角瓶中，充分振荡，80℃水浴20min。采用稀释平板法将上述样品涂布于MRS培养基中，37℃下静置培养24h～48h，挑选15株长势良好菌落，反复划线分离至获得纯菌株，以“P”代表乳酸片球菌将菌株编号P-1、P-2、P-3.....P-15。以上菌株分别进行革兰氏染色、镜检和过氧化氢酶试验，选定菌株P-2为试验菌株。

[0035] 实施例2筛选菌株的鉴定

[0036] 2.1形态鉴定

[0037] 图1为P-2菌株在液体培养基37℃静置培养24h，显微镜下放大400倍观察图。

[0038] P-2菌株的菌落形态如图2所示：菌株在MRS培养基中形成乳白色、较小、圆形、表面湿润且光滑，边缘整齐，成对、成链或聚团状排列的菌落，溶钙圈现象明显。菌株最适生长温度为35℃～45℃、最适初始pH值6.2～6.5。

[0039] 2.2生理生化鉴定

[0040] 参照《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》进行接触酶检测、厌氧生长检测、45℃生长检测和7％NaCl生长检测，之后再进行一系列的验证检测，包括葡萄糖产酸产气、吲哚试验、淀粉水解试验等。具体见表1。

[0041] 表1 P-2菌株生理生化鉴定结果

[0042]

项目	P-2	项目	P-2
细胞形状	球状	木糖	+
革兰氏染色	+	乳糖	+
形成芽孢	-	半乳糖	+
接触酶	-	山梨醇	-
氧化酶	-	阿拉伯糖	+
45℃生长	+	果糖	+
15℃生长	+	厌氧生长	+
7%NaCl 生长检测	+	淀粉水解	+
pH9.6 生长	-	葡萄糖产酸产气	+
pH4.5 生长	+	吲哚试验	-

[0043] 注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

[0044] 将上述鉴定结果与《伯杰细菌鉴定手册》描述相对照及镜检结果相结合，初步判断该菌株为乳酸片球菌。

[0045] 2.3 16S rDNA序列测定

[0046] 按照细菌DNA抽提试剂盒的说明对所选乳酸菌的DNA进行提取，利用细菌16S rDNA的通用引物：

[0047] 上游引物:Primer F:5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’；

[0048] 下游引物:Primer R:5’-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3’。

[0049] 对提取的细菌DNA进行PCR，PCR扩增后的序列，由上海生工生物工程技术服务有限

公司进行测序，测得的基因序列在NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)上进行Blastn比对分析。

[0050] 结果显示：P-2菌株的16S rDNA序列结果与乳酸片球菌BCC1的16S rDNA的序列的覆盖率为96％，一致性为99％。

[0051] 利用测得的P-2菌株的16S rDNA序列构建核酸系统发育树如图3所示，所用到的序列名称及Genbank登录号如表2所示。

[0052] 本发明的P-2菌株与乳酸片球菌NBRC3888聚类再与乳酸片球菌NRCC1聚为一支。

[0053] 表2.系统发育树所用序列名称及Genbank登录号

[0054]

拉丁名	中文名	Genbank 登录号
Pediococcus acidilactici NRCC1	乳酸片球菌 NRCC1	KU504251.1
Pediococcus acidilactici CE73b	乳酸片球菌 CE73b	KF057958.1
Pediococcus acidilactici SLC26	乳酸片球菌 SLC26	KX932069.1
Pediococcus lolii LMG25667	乳酸片球菌 LMG25667	JX311435.1
Pediococcus lolii NBRC3888	乳酸片球菌 NBRC3888	AB680157.1
Lactobacillus rhamnosus DSM 20021	鼠李糖乳杆菌 DSM 20021	M58815.1
Lactobacillus reuteri	罗伊氏乳杆菌	L23507.1
Lactobacillus zeae	干酪乳杆菌	D86516.1
Lactobacillus plantarum MXG-68	植物乳杆菌 MXG-68	KY750314.1
Leuconostoc pseudomesenteroides FL6	假肠膜明串珠菌 FL6	FJ015056.1
Streptococcus sp. BAB-3369	链球菌 BAB-3369	KF952777.1

[0055] 综合形态特点、生理生化鉴定和16S rDNA测序的结果，鉴定菌株P-2为乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)。命名为乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)zk160135，于2016年02月01日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为CGMCC NO:12126，地址为：北京市朝阳区北辰西路1号院3号，请求保藏单位为哈尔滨中科生物工程有限公司。

[0056] 实施例3急性毒性试验

[0057] 急性毒性试验参照GB15193.3—2003最大耐受剂量法进行。检测结果显示：所有小鼠均未出现中毒和死亡现象。说明乳酸片球菌zk160135急性毒性试验最大耐受剂量MTD>15000mg/kg，根据分级标准，该菌株为无毒物质。

[0058] 实施例4耐抗生素试验

[0059] 取活化好的菌液0.1mL接种于MRS平板上，放入常用抗生素药敏纸片37℃培养，观察其生长情况，测量抑菌圈直径。参照抗菌药物药敏纸片及实验判断标准，得到乳酸片球菌zk160135对17种抗生素的耐药性分析如表3所示。

[0060] 表3 zk160135菌株耐常见抗生素结果

[0061]

药敏纸片名称	抑菌圈直径（mm）	敏感程度	相容性
青霉素	24	极高敏	不相容
克拉霉素	20	极高敏	不相容
苯唑青霉素	22	极高敏	不相容
四环素	15	高敏	不相容
红霉素	22	极高敏	不相容
氯霉素	17	高敏	不相容
链霉素	5	低敏	相容
丙氟哌酸	5	低敏	相容
头孢克肟	18	高敏	不相容
万古霉素	5	低敏	相容
卡那霉素	5	低敏	不相容
先锋霉素Ⅴ	15	高敏	不相容
先锋必素	22	极高敏	不相容
庆大霉素	15	高敏	不相容
强力霉素	24	极高敏	不相容
羧苄霉素	20	极高敏	不相容

[0062] 由表3可知，乳酸片球菌zk160135对链霉素、丙氟哌酸、万古霉素和卡那霉素低敏，可相容。

[0063] 实施例5耐模拟胃液能力

[0064] 模拟胃液：胰蛋白胨8.3g、葡萄糖3.5g、氯化钠2.05g、氯化钙0.11g、氯化钾0.37g、磷酸二氢钾0.6g、猪胆盐0.05g、溶菌酶0.1g、胃蛋白酶13.3g，蒸馏水1000mL，盐酸分别调pH值至1.5、2.5，115℃灭菌20min。

[0065] 对照菌种：乳酸片球菌AS1.2696，来源于中国科学院微生物研究所。

[0066] 将乳酸片球菌zk160135和乳酸片球菌AS1.2696菌种活化后，按1％接种量转接100mL液体MRS培养基，37℃培养18h，将两种菌液分别加入制备的无菌模拟胃液，分别于0、2h后用平板计数法检测活菌数量，结果如表4所示。

[0067] 由表4可以看出，乳酸片球菌zk160135加入pH为1.5和2.5的模拟胃液中处理2h，其存活率分别达到了57.88％和64.95％。

[0068] 表4菌株在pH 1.5和pH 2.5中存活情况(cfu·mL^{-1})

[0069]

菌株	pH 值	菌数		存活率
		0	2h	
zk160135	1.5	5.20×10^8	3.01×10^8	57.88%
	2.5	4.85×10^8	3.15×10^8	64.95%
AS1.2696	1.5	4.27×10^8	2.05×10^8	48.01%
	2.5	4.46×10^8	2.63×10^8	58.97%

[0070] 由表4可知，乳酸片球菌zk160135对胃液的耐受性较乳酸片球菌AS1.2696强。

[0071] 实施例6耐胆盐试验

[0072] 准备MRS液体培养基，其中分别加有终浓度为0.1%、0.3%、0.5%、1.0%、2.0%胆盐。各取乳酸片球菌zk160135与乳酸片球菌AS1.2696于37℃培养过夜后的菌体发酵培养液1mL，加入9mL上述胆盐浓度的培养液中。37℃静置培养18h后，稀释10000倍后取0.1mL涂MRS固体琼脂平板。生长情况表明其能耐该浓度胆盐的能力，如表5所示。

[0073] 表5菌株对猪胆盐的耐受性测试

[0074]

猪胆盐浓度（%）		0.1	0.3	0.5	1.0	2.0
存活情况	zk160135	++	++	++	+	+
	AS 1.2696	++	++	++	+	–

[0075] 注:++表示菌落生长数目超过30个;+表示菌落生长数目在5～30个之间;—表示菌落生长数目小于5个。

[0076] 由表5可知，乳酸片球菌zk160135与乳酸片球菌AS1.2696对猪胆盐的耐受性均较强，均有较多的菌体存活。

[0077] 实施例7抑菌试验

[0078] 猪源产肠毒素型大肠杆菌(E.coli O139)、金黄色葡萄球菌(SA)和单核细胞增多症李氏杆菌由黑龙江省科学院微生物研究所提供。

[0079] 在MRS斜面上活化保存的乳酸片球菌zk160135和乳酸片球菌AS1.2696。于营养琼脂斜面上分别活化猪源产肠毒素型大肠杆菌(E.coli O139)、金黄色葡萄球菌(SA)和单核细胞增多症李氏杆菌。将菌株zk160135和AS1.2696转接至MRS液体培养基中，37℃静止培养18h。将活化的猪源产肠毒素型大肠杆菌(E.coli O139)、金黄色葡萄球菌(SA)和单核细胞增多症李氏杆菌接种于肉汤培养基培养24h后，进行菌株zk160135和AS1.2696的抑菌试验。

[0080] 分别将三种致病菌均匀涂布于营养琼脂平板，在牛津杯中分别加入300μL乳酸片球菌zk160135和AS1.2696菌悬液，置于涂布了致病菌的营养琼脂平板上，37℃培养18h后测量抑菌圈直径。如表6所示。

[0081] 表6乳酸片球菌对不同菌株的抑制效果

[0082]

菌株	抑菌圈直径H（mm）		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	单核细胞增多症李氏杆菌
zk160135	+++	+++	+++
AS1.2696	+++	++	+

[0083] 注:抑菌圈直径(mm):+++:19-24;++:15-18;+:10-15;-:无抑菌效果。

[0084] 由表6可以看出,菌株zk160135抑制金黄色葡萄球菌和单核细胞增多症李氏杆菌的效果优于菌株AS1.2696,尤其对单核细胞增多症李氏杆菌的抑制效果明显。

[0085] 实施例8中药发酵制剂的制备

[0086] 8.1菌液的制备

[0087] 将本发明的乳酸片球zk160135菌种接种于MRS培养基进行活化培养,培养温度为37℃,时间18h;将活化好的菌种接种于发酵罐中,控制温度35℃～40℃,时间18h～24h,制备发酵液。

[0088] 所述活化培养基为:MRS培养基,成分为(g/L):蛋白胨10.0、肉膏8.0、酵母浸粉4.0、葡萄糖20.0、磷酸氢二钾2.0、柠檬酸氢二铵2.0、乙酸钠5.0、硫酸镁0.2、硫酸锰0.04、吐温80 1.0,调pH 6.2-6.45。115℃灭菌20min。

[0089] 发酵所用培养基为:MRS培养基,成分同上。

[0090] 发酵完成后,菌液中菌含量≥1亿/mL。

[0091] 8.2中药发酵制剂的制备

[0092] 一种中药发酵制剂,其中药成分按照重量份数组成为:白头翁提取物1.5份、黄连提取物0.8份、黄柏提取物1.0份、秦皮提取物1.2份、山楂提取物0.7份、木香提取物0.2份、肉豆蔻提取物0.5份、甘草提取物1.5份。

[0093] 其中所述中药提取物购自四川恒瑞通达生物科技有限公司。

[0094] 具体制备方法,包括以下步骤:

[0095] (1)按量取各中药提取物;

[0096] (2)加入重量为中药提取物10倍的MRS液体培养基,加热至70℃搅拌15min,调pH 6.8后于100℃蒸汽灭菌30min,冷却至30℃～35℃;

[0097] (3)将8.1制备好的菌液按重量比为5％的量加入步骤(2)所制液体中,混合均匀后,37℃发酵18h,即得本发明中药发酵制剂。

[0098] 实施例9动物试验

[0099] 9.1试验组方

[0100] 9.1.1本发明实施例9中的中药发酵制剂

[0101] 9.1.2用菌株AS1.2696替换实施例9中的菌株zk160135制备的中药发酵制剂

[0102] 发酵过程中,每2h对两种发酵液进行取样,检测pH和OD_{600}值,分别绘制产酸和菌株生长的曲线。如图4、图5所示。

[0103] 由图4可知,菌株zk160135发酵中药产酸量明显高于菌株AS1.2696。

[0104] 由图5可知,菌株zk160135有较好的生长性能。

[0105] 两种发酵制剂分别按重量比2％的比例进行拌料添加。

[0106] 9.1.3对照组饲喂基础饲料

[0107] 9.2试验动物:克氏原螯虾,取自江苏盱眙恒旭科技有限公司。试验虾用基础饲料饲喂10天后开始试验。基础饲料配方及营养成分见表7。

[0108] 表7饲料配方及营养成分表

[0109]

项目 Item	原料 Ingredients	含量（%） Content
基础配方 Basal diet ingredients	豆粕 Soybean meal	25.0
	鱼粉 Fish meal	27.0
	小麦粉 Wheat flour	15.0
	玉米粉 Corn starch	5.0
	棉粕 Cottonseed meal	10.0
	大豆油 Soybean oil	1.5
	鱼油 Fish oil	1.5
	大豆卵磷脂 Soybean lecithin	2.0
	磷酸氢二钙 Dicalcium phosphate	2.0
	维生素预混料 Vitamin premix[1)]	0.5
	矿物质预混料 Mineral premix[2)]	1.0
	食盐 Salt	0.3
	蜕壳素 Exuviate shell element	0.3
	维生素 C Vitamin C	0.03
	氯化胆碱 Choline chloride	0.3
	甜菜碱 Betaine	0.3
	羧甲基纤维素钠 Sodium carboxymethyl cellulose	2.0
	结晶纤维素 Crystalline cellulose	3.0
营养成分 Nutrition level	粗蛋白质 Crude protein	34.6
	粗灰分 Crude ash	6.4
	粗脂肪 Crude fat	6.5
	无氮浸出物 N-free extract	24.3
	能量 Energy/（KJ/g）	15.1

[0110] 注:1)维生素预混料(mg/kg)包含维生素A 900 000IU,维生素D 250 000IU,维生素E 4 500,维生素$K_3$220,维生素$B_1$320,维生素$B_2$1 090,维生素$B_6$5 000,维生素B_{12}116,生物素50,泛酸盐1 000,叶酸165,胆碱60 000,肌醇15 000,烟酸2 500。

[0111] 2)矿物质预混料(g/kg)包含$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2.5,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 28,$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 9,Na_2SeO_3 0.045,KI 0.026,Co $Cl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1。

[0112] 9.3试验方法

[0113] 9.3.1试验设计

[0114] 试验分为3组,乳酸片球菌zk160135中药发酵制剂组、乳酸片球菌AS1.2696中药发酵制剂组和对照组;对照组饲喂基础饲料,乳酸片球菌zk160135中药发酵制剂组和乳酸片球菌AS1.2696中药发酵制剂组是在基础饲料中添加重量比为2%的中药发酵制剂;每组设3个平行。

[0115] 取体色正常、大小均匀、附肢完好、健康活泼、体质量为(7.50±0.20)g的克氏原螯虾,随机分配到9个水族箱(100cm×50cm×50cm)中,每箱放虾15只。水族箱水深15～20cm。实验前投喂基础饲料驯化10天,每日8:00、16:00和22:00三次投喂,投喂量为虾体质量的4%～6%,上午和下午投饵量各为日投饵量的30%,晚上为40%,根据摄食情况加以调整。试验期间,保持溶解氧≥6.0mg/L,pH为7.5～8.0,水温为(22±1)℃。饲养期为60d,用增氧泵连续充气,每天换充分曝气的自来水1/3～1/2,用皮管虹吸出残饵和排泄物。

[0116] 9.3.2样品采集与制备

[0117] 1)生长指标的测定与计算

[0118] 试验结束后用电子天平称量克氏原螯虾的体质量,试验过程中记录各组虾的死亡数和蜕壳死亡数。生长指标的计算公式如下:

[0119] 特定生长率(%/d)=[ln(虾末体均质量)－ln(虾初体均质量)]/饲养天数×100%

[0120] 成活率(%)=(实验结束时虾尾数/实验开始时虾尾数)×100%

[0121] 增重率(%)=[(虾末体均质量-虾初体均质量)/虾初体均质量]×100%

[0122] 饵料系数=每尾虾平均摄食饲料总量/(虾末体均质量-虾初体均质量)

[0123] 2)血清的制备

[0124] 试验结束后,从各组随机选取克氏原螯虾6尾,用滤纸吸干虾体水分,用1mL的一次性注射器从虾的头胸甲后部刺入心脏,抽取血液,放入离心管内,置于冷藏(4℃)过夜,用冷冻离心机以5 000r/min离心10min,取上清液放入冰箱(-20℃)中备用,24h内测定。用自动生化分析仪(日立7600－020)测定血清中碱性磷酸酶、谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活性。

[0125] 9.3.3酚氧化酶的测定

[0126] 以0.1mol/L的磷酸钾盐缓冲液(将61.9mL 0.1mol/L KH_2PO_4溶液和38.1mL 0.1mol/L K_2HPO_4溶液混合,稀释至1L,调pH为6.6)为溶剂,配制浓度为3mg/mL的L－DO-PA(Sigma)溶液。室温下将40μL血清和1960μL L－DOPA溶液混匀,置于1cm光径的比色杯中,准确计时6min时,于490nm波长下测定吸光值,同时取2mL L－DOPA溶液作为空白测定其吸光值。

[0127] 酚氧化酶活性定义为:每毫升样品每分钟吸光度值增加0.001为一个酶活力单位(U)

[0128] 9.4数据处理

[0129] 所有采集数据采用Excel软件进行前期处理,然后用SPSS19.0进行统计分析,LSD进行多重比较,结果采用平均值±标准差表示。

[0130] 表8中药发酵制剂对克氏原螯虾生长性能的影响

[0131]

组别	虾体初质量（g）	虾体末质量（g）	增重率（%）	特定生长率（%/d）	成活率（%）	饵料系数
zk160135	7.63±0.05^{a}	26.51±1.05^{a}	249.02±13.01^{a}	2.08±0.06^{a}	97.78	2.25±0.15^{a}
AS 1.2696	7.59±0.03^{a}	24.60±0.91^{a}	225.23±7.99^{ab}	1.95±0.04^{ab}	97.78	2.29±0.53^{a}
对照组	7.62±0.03^{a}	22.90±1.64^{a}	198.37±9.02^{b}	1.83±0.09^{b}	91.11	2.47±0.16^{a}

[0132] 注:同列肩标相同字母表示差异不显著(P>0.05),肩标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

[0133] 由表8可知,菌株AS 1.2696中药发酵制剂虾体增重率和特定生长率高于对照组,但无显著性差异(P>0.05);菌株zk160135中药发酵制剂虾体增重率和特定生长率均显著高于对照组(P<0.05);虾体成活率两组中药发酵制剂较对照组提高6.67%。

[0134] 表9中药发酵制剂对克氏原螯虾血清中非特异性免疫因子的影响

[0135]

组别	酚氧化酶（PO）	碱性磷酸酶（ALP）	谷丙转氨酶（ALT）	谷草转氨酶（AST）
zk160135	1425.31±115.47^{a}	10.84±0.75^{a}	2.46±0.25^{bc}	27.23±0.30^{c}
AS1.2696	1027.04±74.11^{b}	9.16±1.20^{b}	3.19±0.68^{b}	32.01±0.21^{b}
对照组	720.91±61.53^{c}	2.85±0.96^{c}	4.37±0.51^{a}	36.41±0.33^{a}

[0136] 注:同列肩标相同字母表示差异不显著(P>0.05),肩标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

[0137] 由表9可知,添加中药发酵制剂的两个试验组酚氧化酶(PO)和碱性磷酸酶(ALP)含量均显著高于对照组(P<0.05),且菌株zk160135中药发酵制剂组显著高于菌株AS1.2696中药发酵制剂组(P<0.05);添加中药发酵制剂的两个试验组谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)含量均显著低于对照组(P<0.05),其中谷草转氨酶(AST)含量菌株zk160135中药发酵制剂组显著低于菌株AS1.2696中药发酵制剂组(P<0.05),谷丙转氨酶(ALT)含量两个中药发酵制剂组无显著性差异(P>0.05)。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 哈尔滨中科生物工程有限公司

[0003] <120> 一种乳酸片球菌及其用途

[0004] <130> 2017

[0005] <160> 1

[0006] <170> PatentIn version 3.3

[0007] <210> 1

[0008] <211> 1508

[0009] <212> DNA

[0010] <213> Pediococcus acidilactici

[0011] <400> 1

[0012] tgttcgactt caccctaatc atctgatgca agtcgaacga acttccgtta attgattagg 60

[0013] acgtgcttgc actgaatgag attttaacac gaagtgagtg gcggacgggt gagtaacacg 120

[0014] tgggtaacct gcccagaagc aggggataac acctggaaac agatgctaat accgtataac 180

[0015] agagaaaacc gcctggtttt cttttaaaag atggctctgc tatcactttt ggatggaccc 240

[0016] gcggcgcatt agctagttgg tgaggtaacg gctcaccaag gcgatgatgc gtagccgacc 300

[0017] tgagagggta atcggccaca ttgggactga gacacggccc agactgctac cggaggcagc 360

[0018] actagggaat cttccacaat gcacgcaagt ctgatggagc aacgccgcgt gagtgaagaa 420

[0019] gggtttcggc tcgtaaagct ctgttgttaa agaagaacgt gggtgagagt aactgttcac 480

[0020] ccagtgacgg tatttaacca gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata 540

[0021] cgtaggtggc aagcgttatc cggatttatt gggcgtaaag cgagcgcagg cggtctttta 600

[0022] agtctaatgt gaaagccttc ggctcaaccg aagaagtgca ttggaaactg ggagacttga 660

[0023] ctgcagaaga ggagagtgga actccatgtg tagcggtgaa atgcgtagat atatggaaga 720

[0024] acaccagtgg cgaaggcggc tgtctggtct gtaactgacc ctgaggctcg aaagcatggg 780

[0025] tagcgaacag gattagatac cctggtagtc catgccgtaa acgatgatta ctaagtgttg 840

[0026] gagggtttcc gcccttcagt gctgcagcta acgcattaag taatccgcct ggggagtacg 900

[0027] accgcaaggt tgaaactcaa aagaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcctgtgg 960

[0028] tttaattcga agctacgcga agaaccttac caggtcttga catcttctgc caacctaaga 1020

[0029] gattaggcgt tcccttcggg gacagaatga caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg 1080

[0030] tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc ttattactag ttgccagcat 1140

[0031] taagttgggc actctagtga gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg ggacgacgtc 1200

[0032] aaatcatcat gccccttatg acctgggcta cacacgtgct acaatggatg gtacaacgag 1260

[0033] tcgcgaaacc gcgaggttta gctaatctct taaaaccatt ctcagttcgg actgtaggct 1320

[0034] gcaactcgcc tacacgaagt cggaatcgct agtaatcgcg gatcagcatg ccgcggtgaa 1380

[0035] tacgttcccg ggccttgtac acaccgcccg tcacaccatg agagtttgta acacccaaag 1440

[0036] ccggtggggt aacctttttag gagctagccg tctaagaacg gaaagttcgt tcgacttgta 1500

[0037] tgtattag 1508

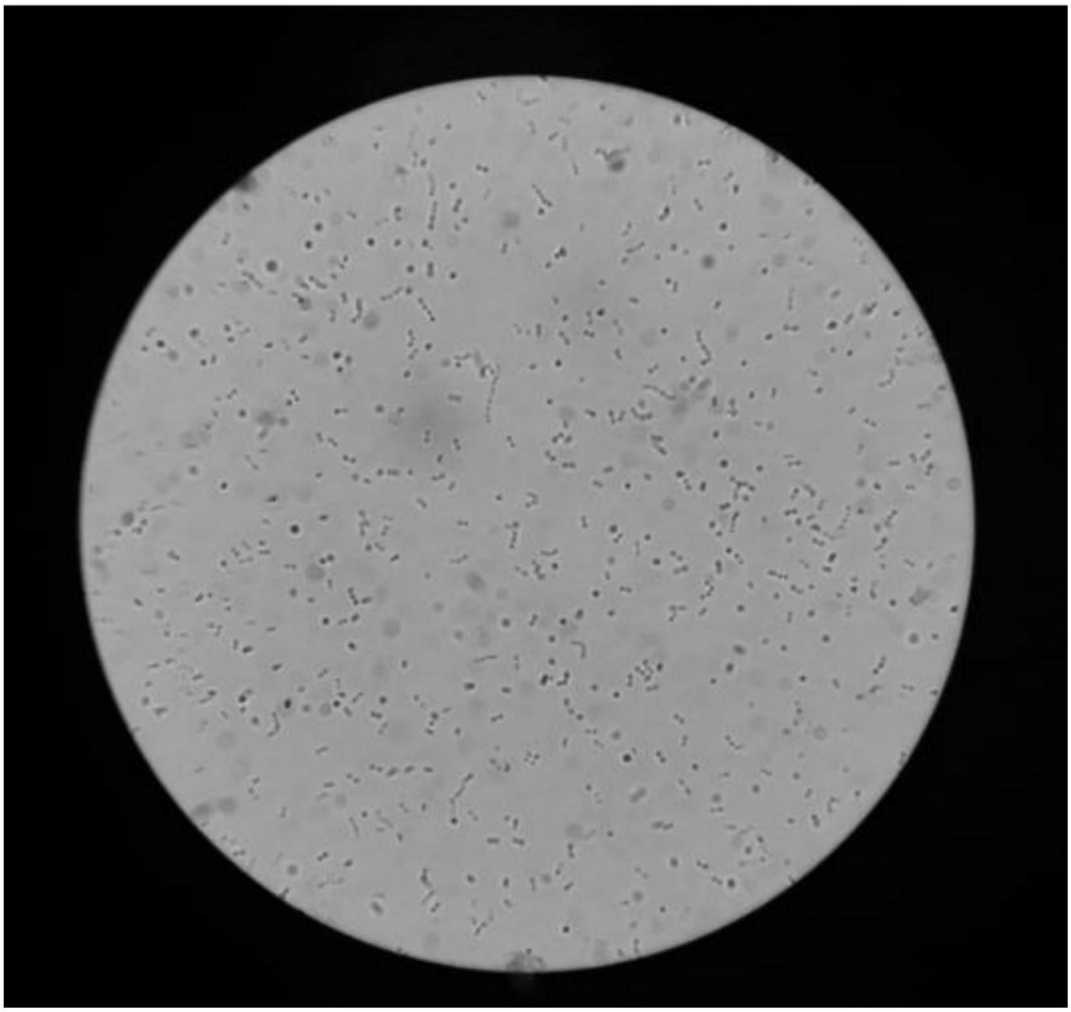


图1

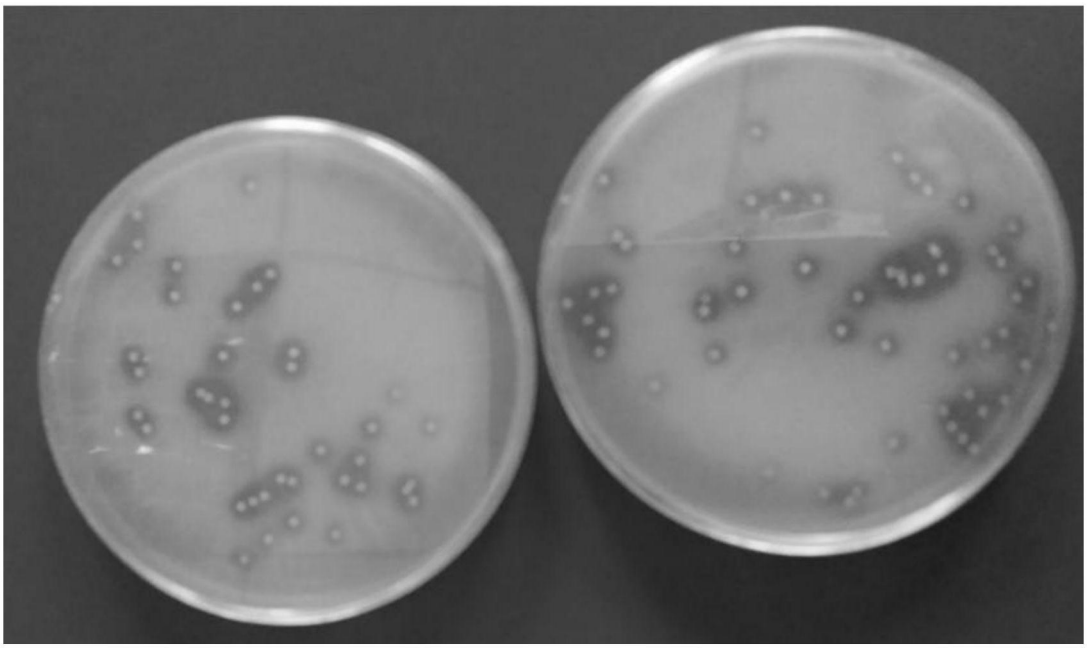


图2

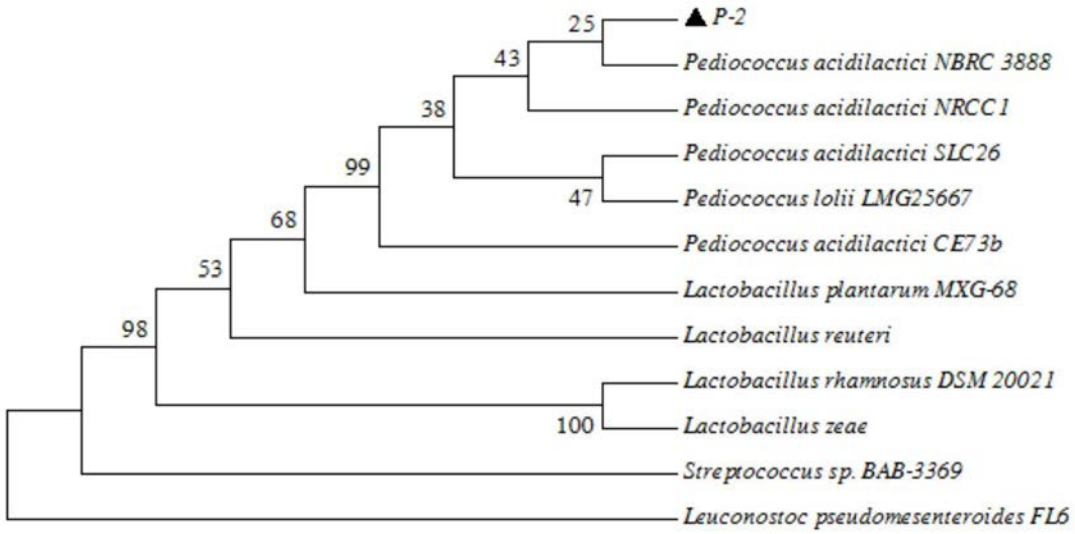

25
43
38
99
47
68
53
98
100
▲P-2
Pediococcus acidilactici NBRC 3888
Pediococcus acidilactici NRCC1
Pediococcus acidilactici SLC26
Pediococcus lolii LMG25667
Pediococcus acidilactici CE73b
Lactobacillus plantarum MXG-68
Lactobacillus reuteri
Lactobacillus rhamnosus DSM 20021
Lactobacillus zeae
Streptococcus sp. BAB-3369
Leuconostoc pseudomesenteroides FL6

图3

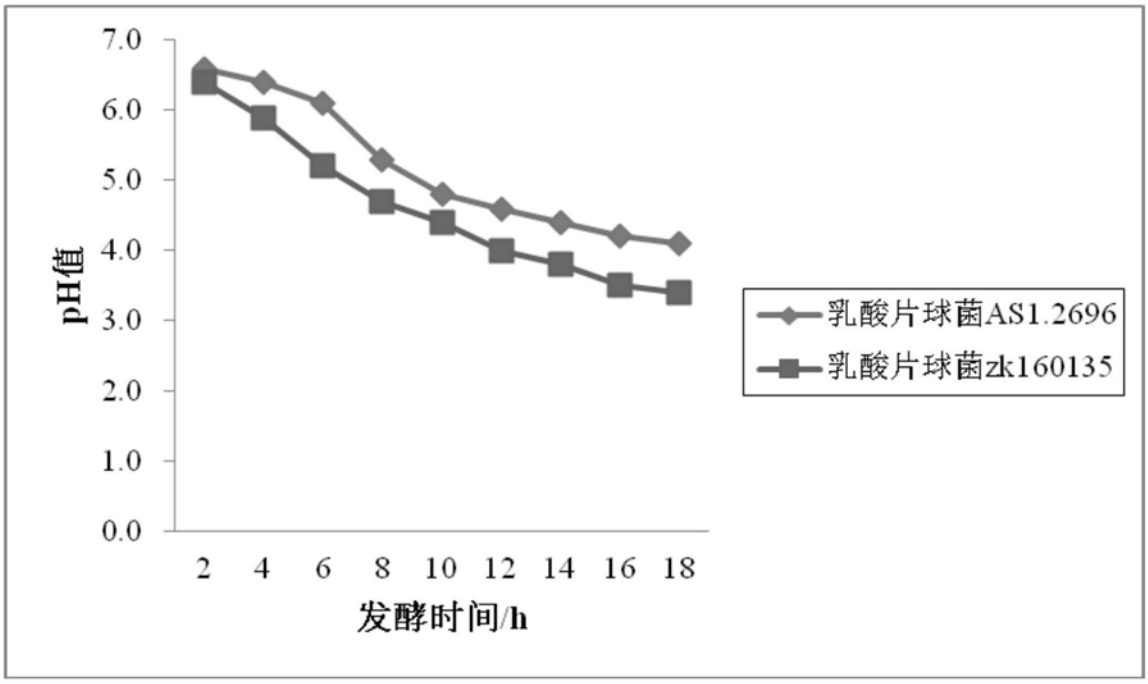

7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
pH值
2 4 6 8 10 12 14 16 18
发酵时间/h
乳酸片球菌AS1.2696
乳酸片球菌zk160135

图4

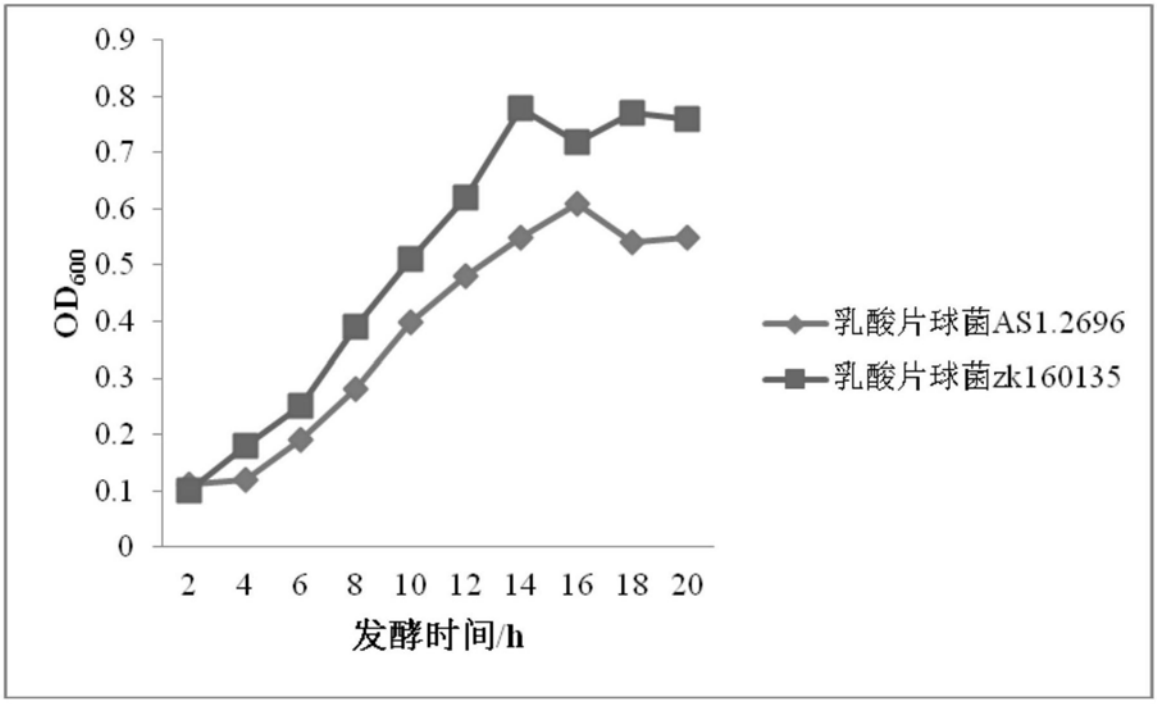

0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
OD600
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
发酵时间/h
乳酸片球菌AS1.2696
乳酸片球菌zk160135

图5