



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109563473 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(21)申请号 201780049252.5

(22)申请日 2017.08.07

(30)优先权数据

10-2016-0101355 2016.08.09 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.02.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2017/008487 2017.08.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/030730 KO 2018.02.15

(83)生物保藏信息

KCCM11829P 2016.04.12

(71)申请人 CJ第一制糖株式会社

地址 韩国首尔市

(72)发明人 金智恩 蔡灵洙 金星勋 池硕祐
李重受

(74)专利代理机构 北京市中伦律师事务所
11410

代理人 杨黎峰 钟锦舜

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A23K 10/16(2006.01)

A23K 50/75(2006.01)

C12R 1/225(2006.01)

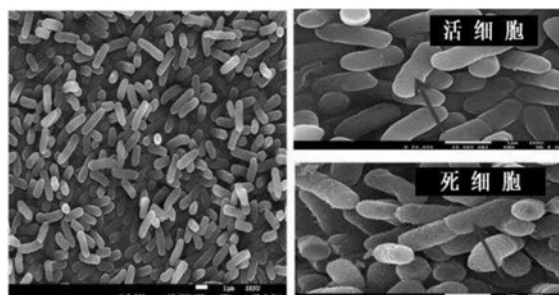
权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称

唾液乳杆菌CJLS1511,含该菌或死细胞的动物饲料添加组合物及生产死细胞的方法

(57)摘要

本发明涉及唾液乳杆菌CJLS1511,包含该菌或其灭活细菌细胞的动物饲料添加剂组合物,以及制备该灭活细菌细胞的方法。



1. 唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活细菌细胞。
2. 一种用于动物饲料添加剂的组合物, 包含唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活细菌细胞。
3. 根据权利要求2所述的用于动物饲料添加剂的组合物, 其中, 所述用于动物饲料添加剂的组合物含有所述灭活细菌细胞。
4. 根据权利要求2所述的用于动物饲料添加剂的组合物, 其中所述唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活细菌细胞的含量为每1g所述用于动物饲料添加剂的组合物中含 1.0×10^8 cfu至 1.0×10^{10} cfu。
5. 根据权利要求2~4中任一项所述的用于动物饲料添加剂的组合物, 还包含所述唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活细菌细胞的保护剂。
6. 根据权利要求5所述的用于动物饲料添加剂的组合物, 其中所述保护剂是选自由酵母、酵母提取物、单糖、多糖、淀粉和糖组成的组中的至少一种。
7. 根据权利要求2~4中任一项所述的用于动物饲料添加剂的组合物, 其中, 所述动物为肉鸡。
8. 根据权利要求2~4中任一项所述的用于动物饲料添加剂的组合物, 其中, 所述唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活细菌细胞的量为动物饲料总重量的0.1wt%~1wt%。
9. 一种动物饲料, 其包含根据权利要求8所述的用于动物饲料添加剂的组合物。
10. 一种用于制备灭活唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的方法, 包括:
培养唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 以制备培养液,
在70至160°C的温度下加热所述培养液,
将所述加热的培养液冷却至10至60°C的温度, 并且
从所述冷却的培养液中分离灭活唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P)。
11. 根据权利要求10所述的方法, 其中所述加热利用热交换器通过间接加热进行。
12. 根据权利要求10所述的方法, 其中所述冷却以10°C/min至60°C/min的速率进行。
13. 根据权利要求10-12中任一项所述的方法, 还包括将所述分离的灭活细菌细胞与保护剂混合。
14. 根据权利要求13所述的方法, 还包括粉碎所述混合的灭活细菌细胞。
15. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述保护剂是选自由酵母、酵母提取物、单糖、多糖、淀粉和糖组成的组中的至少一种。

唾液乳杆菌CJLS1511,含该菌或死细胞的动物饲料添加组合 物及生产死细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及新型唾液乳杆菌CJLS1511,包含该菌或其灭活细菌细胞的用于添加动物饲料的组合物,以及制备灭活细菌细胞的方法。

背景技术

[0002] 乳酸杆菌属微生物是进行同型发酵或异型发酵的乳酸杆菌,并且通常存在于包括人在内的动物的肠中,以及乳制品和蔬菜的发酵过程中。乳酸杆菌属微生物是通常在动物肠道中发现的产生乳酸的细菌,并且使用乳制品和蔬菜作为其底物进行同型发酵或异型发酵。已知乳酸杆菌属微生物在动物中维持肠道环境为酸性条件,抑制大肠杆菌和梭菌等有害细菌的过度生长,改善动物的腹泻和便秘,帮助维生素合成,降低血清胆固醇水平,并具有抗癌活性等。

[0003] 根据乳酸杆菌属微生物的上述特性,已经对益生菌作为饲料添加剂进行了研究。家畜的细菌性腹泻导致生长率和存活率降低。因此,为了提高家畜生产率,已经按药物给药向动物饲料中添加了各种抗生素。然而,近年来,由于其过度使用,已在全世界讨论了抗生素抗性的问题。因此,许多国家的政府已开始限制动物饲料中抗生素的使用。(韩国专利公开号10-1998-78358) (McEwen和Fedorka-Cray, Antimicrobial use and resistance in animals, Clinical infectious Diseases, 第34卷, 2002年6月, 第S93-S106页)。

[0004] 【相关技术资料】

[0005] (专利文献1) 韩国专利公开No.10-1998-78358

[0006] 【非相关艺术资料】

[0007] (非专利文献1) Clinical infectious Diseases, 第34卷, 2002年6月, 第S93-S106页

[0008] 【技术问题】

[0009] 本发明提供了一种包含新型乳杆菌属物种微生物的饲料添加剂,其能够促进动物体重增加、免疫状态、动物的抗病能力、抑制动物肠道内有害细菌的过度生长。

发明内容

[0010] 根据本发明的示例性实施方案,提供了唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活细菌细胞。

[0011] 根据本发明的另一个示例性实施方案,提供了一种用于动物饲料添加剂的组合物,其包含唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活细菌细胞。

[0012] 根据本发明的另一个示例性实施方案,提供了如上所述的动物饲料添加剂的形式。

[0013] 根据本发明的另一个示例性实施方案,提供了一种制备灭活唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的方法,包括:

- [0014] 培养唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 以制备培养液,
- [0015] 在70至160℃范围的一定温度下加热该培养液,
- [0016] 将加热的培养液冷却至10-60℃的一定温度,并且
- [0017] 从冷却的培养液中分离灭活的唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P)。
- [0018] **【有益效果】**
- [0019] 根据本发明示例性实施方案的唾液乳杆菌CJLS1511或其灭活细菌细胞可具有优异的中性脂质降解、内毒素吸附、病原菌生长抑制和增强消化酶活性的能力。
- [0020] 用于动物饲料添加剂或其混合饲料的组合物,包含根据本发明示例性实施方案的唾液乳杆菌CJLS1511或其灭活细菌细胞,可以增强动物生长性能并改善免疫状态,从而帮助动物对抗病原体衍生疾病。

附图说明

- [0021] 图1显示了唾液乳杆菌CJLS1511菌株或其灭活的细菌细胞的电子显微镜图像。
- [0022] 图2显示了唾液乳杆菌CJLS1511的系统发生树。

具体实施方式

- [0023] 在下文中,将详细描述本发明。本说明书中未描述的说明可由本领域技术人员或类似领域的技术人员充分认识和推断,因此,将省略其细节。
- [0024] 根据本发明的示例性实施方案,提供了唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活细菌细胞。
- [0025] “唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的灭活细菌细胞”可以是例如死的唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P),更具体地,热灭活的唾液乳杆菌CJLS1511。
- [0026] 本发明人从肉鸡收集小肠末端,用补充有0.001%溴苯丙醇紫(bromphenicol purple,BCP)的MRS培养基上划线的无菌蒸馏水洗涤,并在37℃下进行厌氧培养。在此,选择约50种产乳酸菌株并进行传代培养。通过形态学分离方法对这些菌株进行二次分离,从而获得24种杆菌。从抗菌活性和消化酶活性能力的角度比较,对24种杆菌进行三级分离,从而获得10菌株。测定产生乳酸的菌株的耐胆汁性、耐酸性和动物肠细胞壁粘附能力,其中,一种糖发酵、病原菌生长抑制、消化酶活性和中性脂质降解的菌株是最优秀的,被分离出来。
- [0027] 将分离的产乳酸菌株命名为唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)CJLS1511,并于2016年4月12日在韩国微生物培养中心(KCCM)保藏(登记号:KCCM11829P)。
- [0028] 唾液乳杆菌CJLS1511的形态学和生理学特征显示在下表1中。
- [0029] [表1]

[0030]

1.形态特征（在MRS固体培养基中生长时的形态）	
- 细胞形状	杆菌
- 细胞多态性	否
- 流动性	否
- 载脂蛋白形成	否
2.生理特征	
- 革兰氏染色	革兰氏阳性
- 过氧化氢酶	阴性
- 氧化酶	阴性
- 生长温度和时间	37℃, 18至48小时
- 氧气要求	兼性厌氧

[0031] 另外,唾液乳杆菌CJLS1511具有如图1所示的杆状,并且不形成孢子。当菌株被杀死时,活细胞和死细胞之间的差异通过细胞壁表面上的糖蛋白活性得到证实。

[0032] 通过使用API试剂盒进行唾液乳杆菌CJLS1511的生化分析。结果,它被鉴定为类似于唾液乳杆菌ATCC11741或KCCM 40210标准菌株的碳水化合物发酵能力,如下表2所示。根据由Macrogen, Inc.进行的16s rRNA分析,鉴定其具有与唾液乳杆菌ATCC11741或KCCM 40210标准菌株99%相似的分子生物学特性,如图2所示。

[0033] [表2]

[0034] 唾液乳杆菌CJLS1511的糖利用分析

[0035]

序号	碳水化合物类型	唾液乳杆菌CJLS1511
0	Temoin	-
1	丙三醇	-
2	赤藓糖醇	-
3	D-阿拉伯糖	-
4	L-阿拉伯糖	-
5	D-核糖	-
6	D-木糖	-
7	L-木糖	-
8	D-核糖醇	-
9	甲基- α D-木吡喃糖苷	+
10	D-半乳糖	+
11	D-葡萄糖	+
12	D-果糖	+
13	D-甘露糖	-
14	L-山梨糖	-
15	L-鼠李糖	-
16	D-半乳糖醇	-
17	肌醇	+
18	D-甘露醇	+

[0036]

19	D-山梨醇	+
20	甲基- α D-吡喃甘露糖苷	-
21	甲基- α D-吡喃葡萄糖苷	-
22	N-乙酰葡萄糖胺	+
23	苦杏仁甙	-
24	熊果苷	+
25	七叶苷	-
26	水杨甙	+
27	D-纤维二糖	-
28	D-麦芽糖	+
29	D-乳糖	+
30	D-蜜二糖	+
31	D-蔗糖	+
32	D-海藻糖	+
33	菊粉	-
34	D-松三糖	-
35	D-棉籽糖	+
36	淀粉	-
37	糖原	-
38	木糖醇	-
39	龙胆二糖	-
40	D-松二糖	-
41	D-来苏糖	-
42	D-塔格糖	-
43	D-岩藻糖	-
44	L-岩藻糖	-
45	D-阿拉伯糖醇	-
46	L-阿拉伯糖醇	-
47	葡萄糖酸盐	-
48	2-酮葡萄糖酸	-
49	5-酮葡萄糖酸	-

[0037] 唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 可具有优异的耐酸性、耐胆汁性、抗微生物活性, 消化酶活性和中性脂质的降解, 并且当用作动物饲料添加剂或其混合饲料时可有效地改善饲料效率和动物的体重增加。

[0038] 灭活的唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 显示出与肠道有害细菌的竞争性粘附抑制, 从而有助于形成肠道菌群, 以及脂质壁酸, 其是当灭活的细菌细胞的细胞膜在小肠中被破坏时洗脱的细胞壁成分, 可干扰肠粘膜中肠道有毒细菌的定植。此外, 灭活的唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 具有比活细胞更高的疏水性和絮凝性, 因此, 可以比活细胞更好地附着于病原微生物和内毒素, 从而提高抗病能力。此外, 当给动物喂食唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的灭活微生物时, 可以改善动物的体重和饲料转化率。

[0039] 唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活的细菌细胞可进一步包括保护剂。保护剂的实例包括酵母、酵母提取物、单糖、多糖、淀粉和糖 (例如粗糖和精制糖) 中的至少一种。具体地, 保护剂可包括选自酵母提取物、右旋糖和粗糖中的至少一种。当使用保护剂时, 可以防止唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其来自外部环境的灭活细菌细胞以防止污

染,并延长其保质期。

[0040] 根据本发明的另一个示例性实施方案,提供了一种用于动物饲料添加剂的组合物,其包含唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活的细菌细胞。具体地,用于动物饲料添加剂的组合物可包括唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的灭活细菌细胞。

[0041] 用于动物饲料添加剂的组合物可进一步包括赋形剂。赋形剂没有特别限制,可以是本领域常规使用的任何赋形剂。赋形剂的实例可包括糖类,如乳糖、D-甘露醇、D-山梨糖醇、蔗糖等,树胶类,如黄原胶、瓜尔胶、阿拉伯树胶等,淀粉类,如玉米淀粉、马铃薯淀粉等,无机盐类,如磷酸钙、硫酸钙、沉淀碳酸钙等。

[0042] 用于动物饲料添加剂的组合物可包括上述的唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活的细菌细胞,其量为每1g组合物中含 1.0×10^8 cfu至 1.0×10^{10} cfu。具体地,作为实例,该量可以是每1g组合物中 1.0×10^8 cfu至 3.0×10^9 cfu,并且可以是 5×10^8 cfu。

[0043] 用于动物饲料添加剂的组合物可以具有粉末、丸粒、颗粒等形式。用于动物饲料添加剂的组合物中的唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活的细菌细胞的量可以具有0.1wt%至10wt%,特别是0.1wt%至7wt%的范围。当组合物包含上述范围内的菌株或其灭活的细菌细胞时,可以最大化添加至动物食料中的组合物的中性脂质的降解、内毒素的吸附、病原菌生长的抑制、以及消化酶活性的增加。

[0044] 根据本发明的另一个示例性实施方案,提供了通过使用如上所述的用于动物饲料添加剂的组合物制备的动物饲料。该动物饲料可以通过将根据本发明示例性实施方案的用于动物饲料添加剂的组合物与常规动物饲料混合来制备。动物饲料中本发明的动物饲料添加剂组合物的量可以是动物饲料总重量的0.1wt%至1wt%。

[0045] 动物饲料没有特别限制,可以是家畜的饲料。“家畜”一词是指用于生产对人类有用的畜产品和水产品的动物和宠物,如牛奶、肉、蛋、头发、皮革、羽毛等。具体而言,动物饲料是提供给家畜的,例如狗、牛、鸡、猪、马等。更具体地说,它可以提供给家禽,更具体地说,提供给肉鸡。

[0046] 动物饲料可包括诸如碳水化合物、蛋白质、脂质、维生素、矿物质等成分,它们是动物生长的必需营养素。“蛋白质”可以是动物蛋白质或植物蛋白质,例如肉、家禽、鱼粉、大豆蛋白、乳蛋白、谷蛋白等。“碳水化合物”的实例可包括谷物或豆类,例如玉米、大米、小麦、大麦、燕麦、大豆或其混合物。“脂质”可以是动物脂肪、植物脂肪和肉类衍生的脂肪等。另外,除了上述组分之外,还可以包括为动物饲料添加功能性的其他组分。或者,可以掺入糖、盐、香料、调味料、调味增强剂等。

[0047] 根据本发明的另一个示例性实施方案,提供了一种制备唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的灭活细菌细胞的方法,包括:

[0048] 培养唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 以制备培养液,

[0049] 在70至160℃的温度下加热培养液,

[0050] 将加热的培养液冷却至10至60℃的温度,并且

[0051] 从冷却的培养液中分离唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的灭活细菌细胞。

[0052] 具体地,在培养唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 以制备培养液的步骤中,可以使用琼脂培养基,具体地,MRS培养基。培养可在25℃至40℃下进行5至48小时,更具体地在30至40℃下进行12至36小时,更具体地在35至40℃下进行20至30小时,从而制备培养液。

[0053] 然后,将培养液在70℃至160℃的温度下加热。加热可以通过直接加热装置或间接加热装置进行,但也可以通过间接加热装置如热交换器进行。加热可在80℃至150℃的温度范围内,更具体地90℃至120℃的范围内进行。唾液乳杆菌CJLS1511可以通过加热灭活或杀死。

[0054] 加热的培养液可以快速冷却至10℃至60℃,具体地20℃至50℃的温度,或者在一个实例中,可以快速冷却至4℃。冷却可以以10℃/min至60℃/min,具体地20℃/min至50℃/min,更具体地30℃/min至40℃/min的速率进行。然后,可以将灭活的细菌细胞与冷却的培养液分离,以获得唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的灭活细菌细胞。

[0055] 制备唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的灭活细菌细胞的方法可以进一步包括将分离的灭活细菌细胞与保护剂混合。另外,此后,该方法可以进一步包括粉碎所获得的灭活细菌细胞和保护剂的混合物。通过混合如上所述的保护剂并粉碎混合物,可以防止灭活的细菌细胞被外部环境污染并促进灭活的细菌细胞的分布。

[0056] 保护剂没有特别限制,但是例如,可以是酵母、酵母提取物、单糖、多糖、淀粉和糖(例如粗糖和精制糖)中的至少一种。具体地,保护剂可包括选自酵母提取物、右旋糖和粗糖中的至少一种。

[0057] 粉碎可以通过冷冻干燥、喷雾干燥或喷雾絮凝进行。更具体地,可以使用喷雾干燥。喷雾干燥也称为雾化器干燥,并且是一种在热流中一次喷射液体以立即获得液相的干燥产物方法。作为喷射液体的方法,有使用旋转盘的离心喷射方法和使用压力喷嘴的加压喷射方法。为了对脱脂乳等进行喷雾干燥,可以使用采用这些喷雾方法的已知喷雾干燥装置。

[0058] 考虑到操作的简单性,优选将灭活的细菌细胞和保护剂混合以制备混合物,然后将混合物悬浮在水中,将所得悬浮液进行喷雾干燥,其中具体地,热空气入口的温度为120至200℃,优选130至170℃,并且出口温度为30至150℃,优选50至100℃。基于100重量份的灭活细菌细胞,加入的保护剂的量可以为0.1至300重量份,特别是0.1至200重量份。

[0059] 作为实例,待添加的酵母或酵母提取物的量为0.04至50重量份,优选0.1至10重量份,待添加的单糖的量为1至100重量份,优选10至50重量份,并且待添加的糖的量为0.2至50重量份,优选0.4至10重量份。

[0060] 已经证实,当生理上可接受且无法溶于水的无机物质(例如碳酸钙)在粉碎操作中,特别地是在喷雾干燥操作中作为添加剂时,操作容易进行。此处,添加动物饲料的组合物中的无机物质的量为1至99wt%,特别是1至90wt%,更特别是1至10wt%。例如,用于动物饲料添加剂的组合物含有0.05至50wt%,优选0.5至20wt%,更优选0.5至15wt%的灭活细菌细胞粉末,和5至80wt%,优选5至50%更优选5至20wt%的无机物质。

[0061] 用于动物饲料添加剂的组合物可包含上述的唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 或其灭活的细菌细胞,其量为每1g组合物含 1.0×10^8 cfu至 1.0×10^{10} cfu。具体地,该量可以是 1.0×10^8 cfu至 3.0×10^9 cfu,并且在一个示例中可以是 5×10^8 cfu。

[0062] 在下文中,将通过本发明的优选示例性实施例更详细地描述本发明的组成和功能。应注意,提供下面描述的实施例仅用于具体举例说明本发明,因此,本发明不限于以下实施例。

[0063] 本说明书中未描述的描述可由本技术领域的技术人员充分且技术上推导出,因

此,将省略其细节。

[0064] 实施例

[0065] 实施例1-6

[0066] 使用本领域已知的唾液乳杆菌KCCM 40210作为参考菌株,如下评价本发明的唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 菌株的安全性、耐酸性、耐胆汁性、抗微生物活性、消化酶活性和甘油三酯降解活性。

[0067] 实验例1:唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的安全性评价

[0068] 为了评价唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 菌株的安全性,根据韩国生物技术产业组织标准提出的安全性评价试验方法进行溶血试验、明胶液化试验、有害代谢物(氨)发生的确认和苯丙氨酸脱氨试验。其结果如下表3所示。

[0069] [表3]

[0070]

菌株	项目			
	明胶液化试验	苯丙氨酸脱氨试验	溶血试验	氨试验
唾液乳杆菌CJLS1511	阴性	阴性	α -溶血, 安全	阴性

[0071] 如表3中所证实的,可发现唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 在明胶液化试验、苯丙氨酸脱氨试验和氨试验的确认中全部为阴性,并且在溶血试验中是安全的。

[0072] 实验例2:唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的耐酸性评价

[0073] 将预先在MRS培养基中培养的唾液乳杆菌CJLS1511菌株和作为比较菌株的唾液乳杆菌KCCM40210标准菌株分别用调节至pH 2、3和7的MRS溶液稀释 10^{-6} 倍。将各稀释的菌株溶液在37℃下培养,在预定时间内在MRS琼脂培养基上划线,进行厌氧培养48小时。然后,测量菌落数。耐酸性试验的结果显示在下表4中。

[0074] [表4]

[0075]

菌株	MRS培养基 (pH7)			MRS培养基 (pH2)			MRS培养基 (pH3)		
	活细胞计数 (CFU/mL)			活细胞计数 (CFU/mL)			活细胞计数 (CFU/mL)		
	0 h	1 h	3 h	0 h	1 h	3 h	0 h	1 h	3 h
唾液乳杆菌CJLS1511	5.8×10^8	6.0×10^8	6.2×10^8	5.8×10^8	2.3×10^5	2.0×10^5	5.8×10^8	3.5×10^8	2.0×10^8
唾液乳杆菌KCCM 40210	6.4×10^8	6.8×10^8	8.6×10^8	6.4×10^8	2.0×10^2	2.0×10^2	6.4×10^8	1.0×10^8	5.0×10^6

[0076] 如表4所证实,唾液乳杆菌CJLS1511在pH2至4下显示出比作为比较菌株的唾液乳杆菌KCCM40210标准菌株更小的活细胞计数下降,从而具有优异的耐酸性。

[0077] 实施例3:评价唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的耐胆汁性

[0078] 将预先在MRS培养基中培养的唾液乳杆菌CJLS1511菌株和作为比较菌株的唾液乳杆菌KCCM40210标准菌株分别调节至pH4,并将胆汁酸溶液(Oxgal1)的浓度调节至0%、0.3%和1%,分别用MRS溶液稀释 10^{-6} 倍。将各稀释的菌株溶液在37℃下培养,在预定时间内在MRS琼脂培养基上划线,进行厌氧培养48小时。然后,测量菌落数。活细胞计数的测量结

果总结在下表5中：

[0079] [表5]

[0080]

菌株	MRS培养基 (pH4)			MRS培养基 (pH4且Oxgall 0.3%)			MRS培养基 (pH4且Oxgall 1%)		
	活细胞计数 (CFU/mL)			活细胞计数 (CFU/mL)			活细胞计数 (CFU/mL)		
	0 h	1 h	3 h	0 h	1 h	3 h	0 h	1 h	3 h
唾液乳杆菌 CJLS1511	2.4×10^8	4×10^8	5.6×10^8	2.4×10^8	4.0×10^6	2.0×10^4	2.4×10^8	5.6×10^5	5.2×10^3
唾液乳杆菌 KCCM 40210	2.0×10^8	2.0×10^8	2.2×10^8	2.0×10^8	2.6×10^5	2.0×10^2	2.0×10^8	2.0×10^2	2.0×10^2

[0081] 从表5中可以看出,在pH4的胆汁酸(Oxgall)的0.3%和1%溶液中,唾液乳杆菌CJLS1511的活细胞数均降低。但是,与唾液乳杆菌KCCM 40210标准菌株相比,活细胞数的降低要低得多,因此,发现即使胆汁酸内源性地存在于动物体内,所施用的菌株也可以生长。

[0082] 实验例4:唾液乳杆菌CJLS1511(KCCM11829P)的抗微生物活性的评价

[0083] 三种病原体(大肠杆菌K88、大肠杆菌ATCC 25922、鼠伤寒沙门氏菌KCCM25922、猪霍乱沙门氏菌KCCM 10709)在TSB(胰蛋白酶大豆肉汤)培养基(BD,USA)中液体培养24小时,使用无菌棉签以 10^{5-6} cfu/ml均匀划线。

[0084] 划线之后,唾液乳杆菌CJLS1511和唾液乳杆菌KCCM 40210标准菌株用PBS缓冲液分别稀释至 10^9 cfu/mL,在直径为4mm的纸片内然后分发50 μ l。将稀释的溶液在室温下静置直至其充分渗透到纸盘中,然后在37℃下有氧培养18小时。此处,稀释溶液仅包括在培养后离心(3,000 $\times$ g,10分钟)上清液并用PBS缓冲液洗涤3次的菌株。通过整个透明环的直径和琼脂槽的直径之间的差来测量抑制环的尺寸。其结果如下表6所示。

[0085] [表6]

[0086]

菌株	大肠杆菌K88	大肠杆菌 ATCC 25922	鼠伤寒沙门氏菌 KCCM 25922	猪霍乱沙门氏菌 KCCM 10709
唾液乳杆菌 CJLS1511	++	++	++	+++
唾液乳杆菌KCCM	+	++	+	++

[0087]

40210				
10至15 mm: +, 15至20 mm: ++, 21至25 mm: +++				

[0088] 如表6中所证实的,唾液乳杆菌CJLS1511和唾液乳杆菌KCCM 40210标准菌株都显示出对病原微生物的增殖抑制作用。然而,证实唾液乳杆菌CJLS1511菌株具有比唾液乳杆菌KCCM 40210标准菌株更高的抗微生物活性。

[0089] 这些结果是由菌株本身而不是由唾液乳杆菌CJLS1511产生的代谢物的作用而获得的,这证明当施用于家畜时可以抑制有害微生物的生长。

[0090] 实验例5:唾液乳杆菌CJLS1511(KCCM11829P)的消化酶活性的评价

[0091] 进行评价消化酶降解活性的实验以确定该菌株是否为具有能够降解碳水化合物、蛋白质和磷的酶的乳酸杆菌。

[0092] 为了确定是否存在蛋白酶活性,将脱脂乳0.5(w/v)%加入MRS琼脂培养基中。为了确定是否存在纤维素酶活性,在MRS琼脂培养基中补充甲基纤维素0.2(w/v)%。为了确定是否存在 α -淀粉酶活性,将玉米淀粉0.2(w/v)%加入MRS琼脂培养基中。为了确定是否存在植酸酶活性,向培养基中加入植酸钙盐0.5(w/v)%。将在上述制备的每种培养基中分离的菌株划线,培养24小时,并观察。

[0093] 通过洗涤24小时培养基,用2%刚果红(Sigma,USA)试剂处理,然后用1M氯化钠(NaCl)洗涤,测定 α -淀粉酶活性和纤维素酶活性的存在或不存在,并确认颜色的存在与否。此外,通过透明环的存在确认蛋白酶活性和植酸酶活性的存在或不存在的确定,其结果显示在下表7中。

[0094] [表7]

[0095]

菌株	蛋白酶活性	植酸酶活性	脂肪酶活性	纤维素酶活性	淀粉酶活性
唾液乳杆菌 CJLS1511	+++	++	+	+++	+++
唾液乳杆菌 KCCM 40210	+	+	++	++	++

[0096] 1至10mm:+,11至20mm:++,21至30mm:+++

[0097] 从表7中证实,发现唾液乳杆菌CJLS1511具有比唾液乳杆菌KCCM 40210标准菌株更高的消化酶活性,例如蛋白酶活性、植酸酶活性、纤维素降解活性和淀粉酶活性。

[0098] 这些结果表明,当将唾液乳杆菌CJLS1511应用于家畜时,可以提高饲料效率。

[0099] 实施例6:评价唾液乳杆菌CJLS1511(KCCM11829P)的中性脂质降解活性

[0100] 作为寻求唾液乳杆菌CJLS1511的胆汁盐水解酶(BSH)活性的结果,证实补充有2mM牛磺脱氧胆酸盐水合物(TDCA,Sigma,USA)的MRS固体培养基中形成白色沉淀,因此,酶活性存在。此外,其沉降模式类似于唾液乳杆菌KCCM 40210标准菌株,其是TDCA阳性对照菌株。然而,在补充有2mM甘氨酸脱氧胆酸钠(GDCA,Sigma,USA)的培养基中,唾液乳杆菌CJLS1511菌株生长良好,但唾液乳杆菌KCCM 40210标准菌株未显示沉淀,并且生长不良。其结果如下表8所示。

[0101] [表8]

[0102]

复合胆酸/菌株名称	唾液乳杆菌CJLS1511	唾液乳杆菌KCCM 40210
TDCA	O	O
GDCA	+	-

[0103] O:形成沉淀,X:未形成沉淀,+:生长,-:未生长

[0104] 如从表8中所理解的,唾液乳杆菌CJLS1511具有高的耐胆汁性和被转换成能够通过产生BSH来降解中性脂质的形式,其结果发现,当应用于动物时,唾液乳杆菌CJLS1511为能够增加体重的功能性菌株。

[0105] 制备实施例1

[0106] 将唾液乳杆菌CJLS1511和唾液乳杆菌KCCM 40210标准菌株用环分别在MRS琼脂培养基上划线,并在37℃下培养48小时以制备培养液。

[0107] 然后,使用热交换器在100℃的温度下间接加热每种培养溶液,并以30至100L/min

的速率快速冷却至10℃。通过离心机(3,000×g,10分钟)从快速冷却培养液分离灭活的细菌细胞,分别制备唾液乳杆菌CJLS1511和唾液乳杆菌KCCM 40210的灭活细菌细胞。

[0108] 制备实施例2

[0109] 唾液乳杆菌CJLS1511和唾液乳杆菌KCCM 40210标准菌株分别用环划线接种在MRS琼脂培养基,并在37℃培养48小时,以制备培养液。

[0110] 然后,使用热交换器在100℃的温度下间接加热每种培养溶液,并以30至100L/min的速率快速冷却至10℃。通过离心机(3,000×g,10分钟)从快速冷却培养液中分离灭活的细菌细胞,以分别制备灭活的唾液乳杆菌CJLS1511和唾液乳杆菌KCCM 40210。然后,分别将酵母提取物、右旋糖和粗糖与其混合。将各混合物悬浮于水中,将所得悬浮液喷雾干燥,得到粉末。具体而言,喷雾干燥在热风入口温度为150℃,出口温度为100℃的条件下进行。基于100重量份的灭活细菌细胞,添加20重量份的酵母提取物、30重量份的葡萄糖,以及5重量份的粗糖,作为保护剂。

[0111] 通过下述方法测试制备实施例1中制备的灭活细菌细胞的疏水性和絮凝性。将补充了灭活的唾液乳杆菌CJLS1511的基础日粮和不含该细胞的基础日粮的体重增加和饲料转化率相互比较。

[0112] 实施例7:唾液乳杆菌CJLS1511(KCCM11829P)的活细胞和灭活细胞的疏水性和共聚集的评价

[0113] 为了证实唾液乳杆菌CJLS1511的活细胞和灭活细胞之间的疏水性和絮凝性的差异,评估了自絮凝反应和共聚集试验。

[0114] 通过向3mL稀释的乳酸杆菌中加入1mL甲苯进行共聚集试验,使得对唾液乳杆菌CJLS1511的活细胞和灭活细胞的OD₆₀₀为0.5,然后涡旋90秒。然后,将各混合物在37℃的水浴中静置1小时,除去甲苯,并测量水溶液层的OD₆₀₀。

[0115] 通过将唾液乳杆菌CJLS1511的活细胞和灭活细胞与相同量的病原微生物(大肠杆菌K88,鼠伤寒沙门氏菌KCCM 25922,猪霍乱沙门氏菌KCCM 10709)混合(病原微生物:活细胞或死细胞=1:1(每个1.5mL))来进行共聚集反应以制备混合物,并分别向3mL混合物中加入1mL甲苯,然后涡旋90秒。然后,将各混合物在37℃的水浴中静置1小时,除去甲苯,并测量水溶液层的OD₆₀₀。

[0116] 疏水性(%)通过 $100 \times (\text{初始OD}_{600} - 1 \text{小时后的OD}_{600}) / \text{初始OD}_{600}$ 计算。

[0117] 活细胞和灭活细胞之间的自聚集反应和共聚集反应的结果显示在下表9中。

[0118] [表9]

[0119]

项目 / 病原微生物菌株		唾液乳杆菌CJLS1511	
		活细胞	灭活细菌细胞
自动-聚集-		11%	23%
共聚集	大肠杆菌K88	54%	64%
	鼠伤寒沙门氏菌 KCCM 25922	45%	65%
	猪霍乱沙门氏菌 KCCM 10709	30%	45%

[0120] 从表9中可以看出,灭活的唾液乳杆菌CJLS1511的自絮凝反应和共聚集反应均显

示出比活细胞高1.5倍的活性。可认为细胞外疏水性和微生物的聚集受细胞表面蛋白的特征和表面结构的影响,灭活的唾液乳杆菌CJLS1511由于细胞表面上蛋白质结构与活细胞的不同而具有增加的疏水性和聚集性,如图1所示。结果,预期它将被用作通过粘附内毒素来影响抗病能力的功能性菌株。

[0121] 实施例8:包含灭活的唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的饲料与常规基础饲料的比较

[0122] 给肉鸡喂食补充有0.2% (w/w) 的灭活唾液乳杆菌CJLS1511的基础日粮和不含其(对照组)的基础日粮,时长为与正常喂养期相同的29天,并且分别测量初始平均体重(g),最终平均体重(g),平均日增重(g/d),平均日采食量(g/d)和饲料转化率。其结果如下表10所示。

[0123] [表10]

[0124]

类别	对照组	使用灭活的唾液乳杆菌CJLS1511 (KCCM11829P) 的处理组
试验动物数量	150	150
初始平均体重 (g)	38.48	38.47
最终平均体重 (g)	1582.00 ^a	1690.24 ^b
平均日增重 (g/d)	53.23 ^a	56.96 ^b
平均日采食量 (g/d)	78.76	79.48
饲料转化率	1.48 ^a	1.40 ^b

[0125] ^{a,b}具有不同特征的平均值显著不同 ($P < 0.05$)。

[0126] 如表10中所示,与未使用灭活的唾液乳杆菌CJLS1511处理的对照组相比,用本发明的灭活的唾液乳杆菌CJLS1511处理的组对体重增加和饲料转化率均显示出优异的效果。

[0127]

申请人或代理人档案号 P17-6119

国际申请号

关于微生物或其他生物学物质的保藏的说明

(PCT 细则 13 之二)

A.对说明书第 2 页，第 8 行所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明

B. 保藏事项

更多的保藏在附加页说明 ☐

保藏单位名称

KCCM 韩国微生物保藏中心

保藏单位地址（包括邮政编码和国名）

韩国首尔市西大门区弘济内 2 甲路 45 号友林大厦，120-091

保藏日期 2016 年 4 月 12 日

保藏号 KCCM11829P

C.补充说明（必要时）

更多信息在附加页中 ☐

D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）

E.补充说明（必要时）

下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”）

由受理局填

☐ 本页已经和国际申请一起收到

授权官员

由国际局填

☐ 国际局收到本页日期

授权官员

PCT/RO/134 表（1998 年 7 月，2004 年 1 月再版）

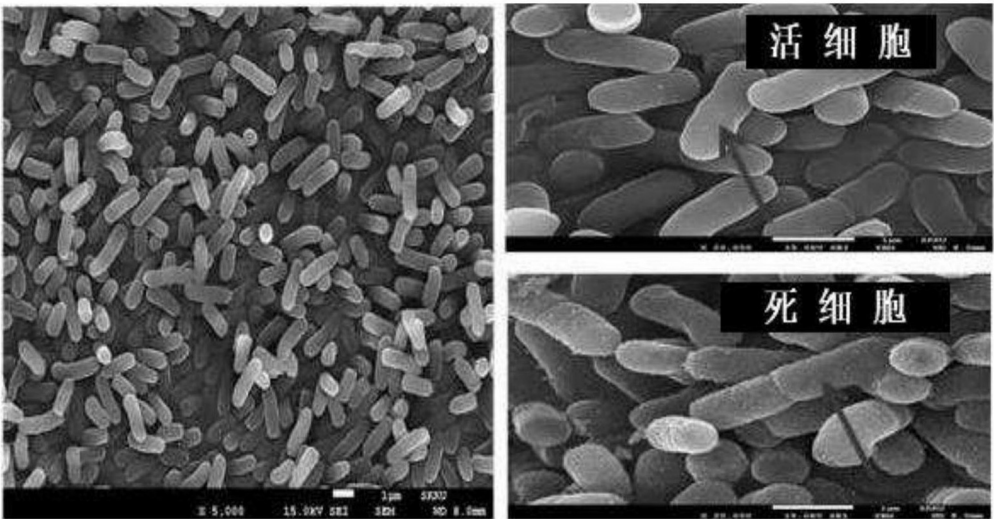


图1

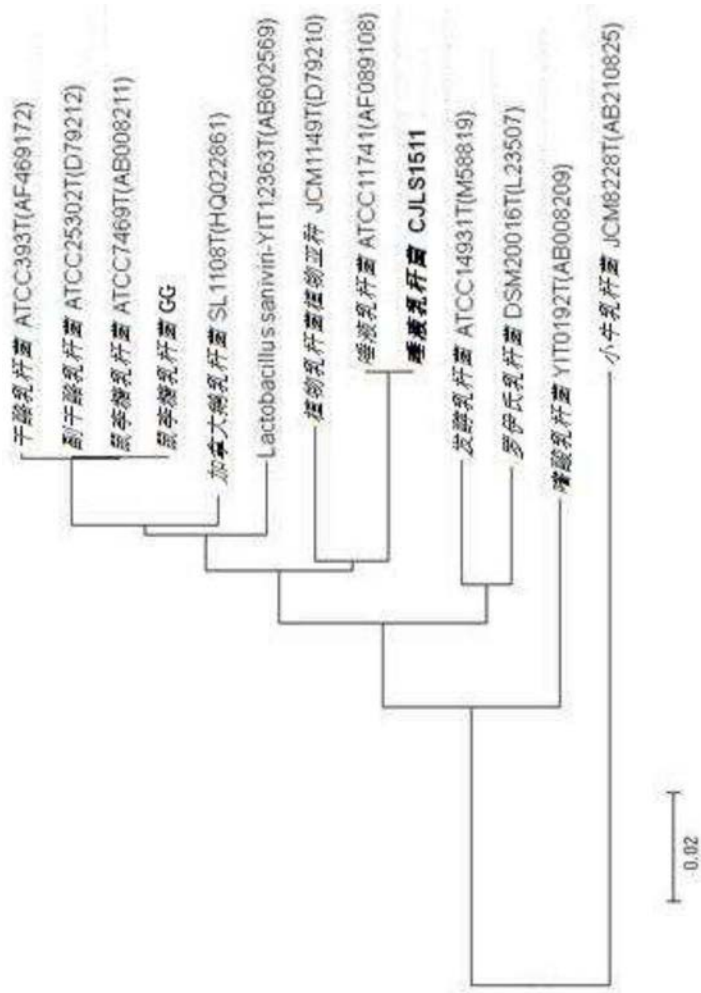


图2