

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00808820.9

[45] 授权公告日 2007 年 8 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1330748C

[22] 申请日 2000.6.9 [21] 申请号 00808820.9

[30] 优先权

[32] 1999.6.11 [33] US [31] 60/138,946

[86] 国际申请 PCT/EP2000/005403 2000.6.9

[87] 国际公布 WO2000/077186 英 2000.12.21

[85] 进入国家阶段日期 2001.12.11

[73] 专利权人 雀巢制品公司

地址 瑞士沃韦

[72] 发明人 G·施米德特 R·青克

审查员 冯 怡

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 刘 玥

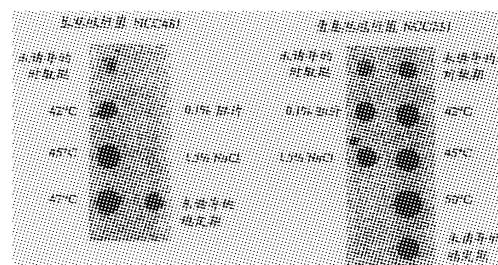
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 9 页

[54] 发明名称

细菌的保护

[57] 摘要

具有抵抗对非保护细菌细胞是致死的条件的保护作用的细菌细胞，其中受保护的细胞通过使细菌细胞经受亚致死水平的胁迫处理获得。



1. 一种保护约氏乳杆菌 La1 抵抗胁迫的方法，该方法包括用选自热休克、渗透休克、pH 休克、氧化胁迫、化学胁迫、营养胁迫、紫外胁迫和冷胁迫的亚致死水平胁迫处理该微生物的步骤。

2. 权利要求 1 的方法，该方法包括用大约 3.5% NaCl 处理 15 分钟的步骤。

3. 根据权利要求 1 的方法，该方法包括在大约 48℃ 处理大约 15 分钟的步骤。

细菌的保护

本发明涉及到一种具有抗胁迫保护的细菌细胞，这些胁迫包括极端温度改变和渗透休克的影响；一种含有受保护细菌细胞的营养或药物组合物；以及保护细菌抗胁迫的方法。

在这份说明书的上下文中，“含有”的意思是“除其他之外还包括”的意思。不应被解释为“仅由…组成”。另外，“胁迫”一词可被与术语“逆境”互换使用。其包括但不限于温度（热休克、冷休克），盐（渗透休克），pH（pH 休克），化学胁迫（抗生素，醇，双氧水等），营养胁迫，紫外胁迫，冷胁迫和氧浓度（氧化胁迫）的逆境。

本说明书使用 IUB 生物化学命名委员会定义的标准氨基酸，RNA 和 DNA 代码。

众所周知，细菌如乳酸细菌(LAB)在环境中是无所不在的，并且它们被大量地用于发酵产品的生产。例如，在食品工业中，细菌被用于奶制品的发酵和曲引培养物的生产。在曲引培养物的生产、食品发酵、加工和储藏过程中，被使用的细菌必需用不同种类的逆境处理，这些逆境通常有显著地降低它们的生活力、稳定性和活性的效果。这些逆境随生产需要而变化，包括热休克（冰冻-干燥或喷雾-干燥）、渗透休克（干燥）和 pH 休克（发酵）。人们认识到，在细菌被大规模使用的条件下，细菌对这些胁迫的敏感性或无法应付这些胁迫是一个问题。

在人类肠道主要是小肠和大肠中双歧杆菌或乳杆菌的存在通常被认为是有益于健康的促进因子。此外，认为双歧杆菌或乳杆菌在疾病包括胃肠感染的预防或治疗中可能是有用的。据此，已经有人建议在肠道中维持大量的双歧杆菌或乳杆菌群体和服用包括这种细菌的产品。通常这些产品包括不同种的双歧杆菌或乳杆菌。然而，产品加工和储藏过程中双歧杆菌和乳杆菌被暴露于其中的这些胁迫能显著地降低它们的生活力和/或生理活性。

细菌培养物对亚致死温度改变或其它亚致死胁迫（包括暴露于氧和渗透休克）的自然应答包括一组叫做“应激蛋白”的独特多肽的快速表达。这些蛋白已被表明能使革兰氏阳性细菌例如乳酸乳球菌，枯草芽孢杆菌，嗜酸乳杆菌，清酒乳杆菌，粪肠球菌和约氏乳杆菌适应其它

的限制生长的条件。

研究的最多的一种应激蛋白是热休克蛋白或伴侣蛋白。这些蛋白通常涉及到新合成蛋白的成熟，并且它们协助变性蛋白的重新折叠。在 LAB 中，许多的应激基因已被描述，包括那些编码涉及到新合成蛋白的正确折叠和那些变性蛋白复性的两种主要伴侣机制(groES/groEL 和 hrcA/grpE/dnaK/danJ)的基因。

引人注目地是，现在已经发现细菌包括双歧杆菌或乳杆菌能被保护，抵抗在非保护细菌中是致死的胁迫水平。令人惊讶地是，其可通过使细菌经受一种亚致死水平的胁迫处理而实现。令人惊讶地发现，在这种初始的胁迫处理后要对细菌有不利影响需要更高的胁迫水平。这是出乎意料的，因为一般认为被胁迫损害的细胞应付进一步的胁迫的可能性更小。事实上，相反的情况已被发现，预胁迫的细胞比未经预胁迫的对照细胞能忍受更高水平的胁迫。

通过用不相关的胁迫方式处理获得的抵抗一种胁迫的保护作用被称为“交叉保护作用”。这是出乎意料的，因为一般认为经受过一种胁迫处理损害的细胞对其它的亚致死或致死胁迫更为敏感。

因此，第一方面，本发明提供一种细菌细胞，其具有抵抗对于非保护细菌细胞是致死的条件的保护作用，其中，这种被保护的细胞是通过使细菌细胞经受亚致死水平的胁迫处理而获得。

第二方面，本发明提供一种营养组合物，该组合物含有具有抵抗对于非保护细菌是致死的条件的保护作用的细菌，其中，这种受保护的细菌是通过使细菌经受亚致死水平的胁迫处理并使其恢复而获得的。

再一方面，本发明提供一种保护细菌细胞抗胁迫的方法，该方法包括，用选自热休克、渗透休克、pH 休克、氧化胁迫、化学胁迫、营养胁迫、紫外胁迫、冷胁迫的亚致死水平胁迫处理细菌细胞的步骤。

优选，该方法包括允许该细胞恢复的步骤。

优选，化学胁迫通过用抗生素、醇、或双氧水处理提供。

优选，该细菌细胞选自双歧杆菌、乳酸细菌、肠球菌、链霉菌和杆菌。

更优选，该细菌是长双歧杆菌，青春双歧杆菌，短双歧杆菌或约氏乳杆菌。这些细菌所提供的优势是它们有能力快速地酸化它们的底物，

从而生产微生物学上安全的产品。此外，它们有益于人类和动物的健康。而且，它们显示出了抗肠道病原物攻击的保护作用，并被与抗致癌物质、抗诱变和抗致肿瘤的活性相关联。若不囿于理论，最近的报道显示它们可以在肠道中通过抗微生物活性直接地起作用，通过经由肠道细胞的免疫调节或通过改变土著微生物菌系而间接地起作用。

优选细菌，更优选双歧杆菌和乳杆菌，被亚致死浓度的盐处理以保护它们抗致死的盐浓度，或细胞被亚致死的热胁迫处理保护它们抗致死的温度。此外，结果表明盐处理（如 NaCl）能保护这些细菌抗致死的热胁迫或抗致死的反复冻融。据此，本发明也包括用盐处理细胞以保护抗热胁迫或用不利的温度条件处理以保护抗盐胁迫的步骤。

优选该细菌细胞选自长双歧杆菌，青春双歧杆菌或约氏乳杆菌。更优选该细菌选自长双歧杆菌，NCC481，青春双歧杆菌 NCC251 或约氏乳杆菌 Lal。

优选，抗致死盐浓度（如 0.1%~0.4%）的保护作用通过用大约 0.01~0.1% 的盐处理大约 15~60 分钟来进行。优选该盐为胆汁盐。

优选，抗致死的热胁迫（如大约 50~60℃）的保护作用通过用大约 37℃-50℃ 处理大约 15-60 分钟或通过大约 1%-4% 的盐浓度处理大约 30-60 分钟来进行。

优选，抗冻融（如 1-10 循环）的保护作用通过用 1%~4% 的盐浓度处理该细胞来进行。

优选长双歧杆菌 NCC481 细胞被保护。更优选，长双歧杆菌 NCC481 细胞抵抗致死的胆汁盐浓度（如大约 0.2%~0.3%，30 分钟）的保护作用，在它们生长周期的对数期通过在致死刺激之前使该细胞经受 0.1% 的胆汁盐处理大约 30 分钟而获得。

优选，长双歧杆菌 NCC481 细胞抵抗致死的胆汁盐浓度（如大约 0.075%~0.15%，大约 30 分钟）的保护作用，在它们生长周期的稳定期通过在致死刺激之前使该细胞经受 0.05% 的胆汁盐处理大约 30 分钟而获得。

优选，青春双歧杆菌 NCC251 细胞被保护。更优选，（如大约 0.3%~0.4%，30 分钟）的青春双歧杆菌 NCC251 细胞抵抗致死胆汁盐浓度的保护作用，在它们生长周期的对数期通过在致死刺激之前使该细胞经受 0.1% 的胆汁盐处理大约 30 分钟而获得。

优选，青春双歧杆菌 NCC251 细胞抵抗致死的胆汁盐浓度（如大约 0.15%，大约 30 分钟）的保护作用，在它们生长周期的稳定期通过在致死刺激之前使该细胞经受 0.1% 的胆汁盐处理大约 30 分钟而获得。

优选，青春双歧杆菌 NCC251 细胞抵抗否则会致死的冻融（如大约 3~4 次循环）（大约 -80℃~ 大约室温（优选大约 20℃~30℃，更优选 25℃））作用保护作用，在它们生长周期的稳定期通过使该细胞经受大约 2% NaCl 处理大约 1 小时而获得。

优选，青春双歧杆菌 NCC251 细胞抵抗否则会致死的 55℃ 20 分钟处理的保护作用，在它们生长周期的对数期通过在大约 45℃ 处理该细胞大约 30 分钟，在大约 47℃ 大约 15 分钟或用 1% 或 2% NaCl 处理大约 1 小时来进行。

优选，约氏乳杆菌 La1 细胞被保护。更优选，约氏乳杆菌 La1 细胞抵抗否则会致死的 55℃ 达 1 小时的保护作用，在它们生长周期的对数期通过用大约 3.5% NaCl 处理该细胞大约 15 分钟或大约 48℃ 处理 15 分钟来进行。

优选，约氏乳杆菌 La1 细胞抵抗否则会致死的 55℃ 达 1 小时的保护作用，在它们生长周期的对数期通过用大约 48℃ 处理 15 分钟或大约 3.5% NaCl 处理该细胞大约 15 分钟来进行。

参考本发明的附图，本发明的实施方案将被进一步详细描述如下：

图 1 显示了暴露于不同种类的胁迫 10 分钟后，来自于长双歧杆菌 NCC481 和青春双歧杆菌 NCC251 细胞 RNA 的点杂交结果。NCC481 和 NCC251 分别用特异性探针 GSR8 和 GSR5 进行杂交。

图 2 显示了对在对数期经不同前诱导后，青春双歧杆菌 NCC251 在 55℃ 的存活图。在 MRS 和半胱氨酸中，37℃ 下培养细胞至 OD600 为 0.4~0.7。细胞被分为几等份并使之分别经受 47℃ 处理 15 分钟、45℃ 处理 30 分钟、或 1.5% 或 2% NaCl 处理 1 小时；对照维持在 37℃。样品被转移至 55℃ 并在 10 分钟和 20 分钟后测定存活细胞数。

图 3 显示了经 3 和 4 次反复冻融后青春双歧杆菌 NCC251 的存活图。取稳定期细胞并使之经受 2% NaCl 处理 1 小时，对照不加盐。样品被转移至 -80℃ 并在室温融化。在测定存活细胞数之前，这种循环被重复 3~4 次。

图 4 显示了对在对数期致死胆汁盐条件下长双歧杆菌 NCC481 的存

活图。细胞培养至 OD600（在 600nm 处的光密度）为 0.4~0.7 并使之经受 0.1% 牛胆汁处理 30 分钟。对照不加牛胆汁。样品被分成几等份并转移至 0.2%、0.25% 和 0.3% 的牛胆汁处理 30 分钟，并测定存活细胞数。

图 5 显示了在稳定期致死胆汁盐条件下长双歧杆菌 NCC481 的存活图。细胞经 0.05% 牛胆汁处理 30 分钟。对照不加牛胆汁。样品被分成几等份并转移至 0.075%、0.1% 和 0.15% 的胆汁处理 30 分钟，并测定存活细胞数。

图 6 显示了对数期致死胆汁盐条件下青春双歧杆菌 NCC251 的存活图。细胞培养至 OD600（在 600nm 处的光密度）为 0.4~0.7 并使之经受 0.1% 牛胆汁处理 30 分钟。对照不加任何牛胆汁。样品被分成几等份并转移至 0.3% 和 0.4% 的牛胆汁处理 30 分钟，并测定存活细胞数。

图 7 显示了在稳定期致死胆汁盐条件下青春双歧杆菌 NCC251 的存活图。细胞经受 0.1% 牛胆汁处理 30 分钟。对照不加任何牛胆汁。样品被分成几等份并转移至 0.15% 的牛胆汁处理 30 分钟，并测定存活细胞数。

图 8 显示了在致死温度条件下约氏乳杆菌 La1 的存活图。在 MRS 中，37℃ 下培养细胞至 OD600（在 600nm 处的光密度）为 0.4~0.7。取出样品并使之经受 3.5% NaCl 或 48℃ 处理 15 分钟。对照维持在 37℃。然后样品被转移至 55℃ 并在 30 和 60 分钟后测定存活细胞数。

图 9 显示了在生长周期的稳定期在致死温度条件下约氏乳杆菌 La1 的存活图。取出样品并使之经受 3.5% NaCl 或 48℃ 处理 15 分钟。对照维持在 37℃。然后样品被转移至 55℃ 并在 60 分钟后测定存活细胞数。

菌株及生长条件

在补充有 0.5g/l 半胱氨酸的 MRS 培养基中，37℃、厌氧条件下（98% N₂ 和 2% H₂）培养青春双歧杆菌 NCC251，长双歧杆菌 NCC481，长双歧杆菌 NCC490，长双歧杆菌 NCC585，和短双歧杆菌 NCC298。在 MRS 培养基中，30℃ 培养乳酸乳球菌 MG1363。在 Luria-Bertani 培养基中，37℃ 培养大肠杆菌 TG1 (Amersham)。在 MRS 中，37℃ 培养约氏乳杆菌 La1。

胁迫处理

细胞培养至 OD600（在 600nm 处的光密度）为 0.4~0.7 或在稳定期取出并使之经受不同时间不同胁迫条件的处理。用于冻融试验的细胞在使之经受-80℃处理之前被浓缩于盐溶液中。通过向样品中加入 NaCl 来实施盐胁迫，而 OXGALL（商标）（Difco）被用于胆汁盐胁迫。

双歧杆菌的胁迫处理在厌氧条件下进行，而存活细胞数的测定在好氧条件下进行。在微好氧条件下培养乳杆菌，在好氧条件下进行胁迫处理和存活细胞数测定。

双歧杆菌

诱导及致死刺激的范围

	前诱导	致死刺激
pH(如 HCl)	pH 6.0-3.5	pH 2.5-2
胆汁（如牛胆汁）	0.01%-0.1%	0.075%-0.4%
温度	37℃-48℃	50℃-60℃
盐（如 NaCl）	0.5%-3%	3%-8%

前诱导及致死刺激的时间可根据菌株和胁迫条件在 5 分钟-2 小时间变化。

乳杆菌

诱导及致死刺激的范围

	前诱导	致死刺激
pH(如 HCl, 乳酸)	pH 6.0-4.5	pH 4.0-2
温度	40℃-50℃	50℃-60℃
盐（如 NaCl）	0.5%-3.5%	4%-8%

前诱导及致死刺激的时间可根据菌株和胁迫条件在 5 分钟-2 小时

间变化。

DNA 技术

染色体 DNA 的提取按照标准方法进行。

mRNA 的分析

至于斑点杂交，按照标准方法将总 RNA 提取、变性、转移至无电荷的尼龙膜（GeneScreen, NEN）。膜经预杂交（1 小时，40℃）并随后用 100pmol 地高辛标记的探针（Boehringer）杂交 4 小时。在含有 0.1% SDS 的 2xSSC 中 40℃ 洗膜两次，每次 5 分钟，并在对应于探针的温度下洗一次，对于两个 dnaK 特异性探针 GSR5(5'-CATCGAAGGTGCCGCCAC-3')和 GSR8(5'-TCGTCACCACC GAGGTG-3')，温度分别为 46℃ 和 48℃，对于通用探针 1028R (5'-CCTTCTC CCGAAGTTACGG-3')，温度为 51℃。检测按照操作说明进行。

PCR 扩增

用简并引物 HS1(5'-ATACIGTICCGICITA(T/C)TT(T/C)AA(T/C)GA-3') 和 HS2 (5'-CATIGT(T/C)TCIATICIA(A/G)IGAIA(G/A)IGG-3') 及 1μg 的染色体 DNA 作为模板扩增 dnaK 的核心区域。扩增在 100μl 体系（含 dATP, dCTP, dGTP 及 dTTP 各 200μM, 引物各 50pmol, 2.5 单位的 Super-Taq DNA 聚合酶（HT Biotechnology），和相应的 1xPCR 缓冲液）中进行。反应用 Perkin-Elmer 热循环仪进行：在 95℃ 预变性 5 分钟，接着 95℃ 1 分钟、55℃ 1 分钟、72℃ 1 分钟循环 30 次；最后 72℃ 延伸 10 分钟。

DnaK 基因的鉴定

在 Barril 等（1994）的序列比对的基础上，我们选择具有相同氨基酸序列的乳酸乳球菌，大肠杆菌和巨大芽孢杆菌的 DnaK 的两个区域并设计了两个简并引物 HS1 和 HS2，这两个引物分别对应乳酸乳球菌 DnaK 的 114-122 位和 366-374 位的氨基酸。这一对引物用于以 NCC481, NCC490, NCC585, NCC251 和 NCC298 的染色体 DNA 作为模板的 PCR

扩增。每个菌株获得两个片段。所有菌株中，大小与两个阳性对照大肠杆菌和巨大芽孢杆菌相对应的片段被从琼脂糖凝胶中分离、纯化并测序。每个片段鉴定出一个开放阅读框，显示了与已知的 DnaK 蛋白高度的序列相似性。尤其是与链霉菌和蓝细菌及清酒乳杆菌，杆菌和链球菌有高度同一性。

***dnaK* 基因表达的 mRNA 分析**

将细胞暴露于热休克和其它通常的胁迫条件下研究 *dnaK* 的转录诱导。对数期的长双歧杆菌 NCC481 和青春双歧杆菌 NCC251 细胞经受 0.1%胆汁盐、1.5% NaCl 或 42℃ 和 45℃ 热休克 10 分钟处理，NCC481 和 NCC251 分别进行了最高温度为 47℃ 和 50℃ 的试验。始终用来自于对数期和稳定期的未诱导细胞作对照。提取总 RNA 并进行点杂交。DnaK 特异性探针 GSR8 和 GRS5 分别被用于 NCC481 和 NCC251。通用探针被选用以检查膜上 RNA 的量和质量。随着处理温度的升高，观察到被处理细胞的 *dnaK* 特异性 mRNA 的浓度随之增加（图 1）。与 NCC251 相反，NCC481 的 *dnaK* 在进入稳定期时细胞中仅被微弱地诱导。而且在胆汁盐和 NaCl 处理后，在 NCC251 中观察到 *dnaK* 的微弱的诱导。在同样的条件下在 NCC481 中没有获得显著的诱导。

存活和交叉保护作用

在不同温度、胆汁盐和盐条件下进行约氏乳杆菌 La1，青春双歧杆菌 NCC251 和长双歧杆菌 NCC481 的生长和存活试验。

很显然，对数期的 NCC251 在经过亚致死的热胁迫后，显示出对一般致死的温度 55℃ 的更强抗性。在热休克 10 分钟和 20 分钟前使细胞经受 47℃ 处理 15 分钟，热耐受能力分别提高几乎 24 倍和 128 倍（图 2）。这些数字是值得注意的，因为它们表明细胞的前诱导对保护它们抵抗否则是致死的刺激具有出乎意料的效果。通过 1.5% NaCl 前处理 1 小时实现了抗 55℃ 的 9 倍和 15 倍的细胞交叉保护。通过 45℃ 前诱导 30 分钟或 2% NaCl 前诱导 1 小时，相等的抗热胁迫的保护作用也被观察到（图 2）。

约氏乳杆菌 La1 的处于生长周期对数期的细胞被用 3.5% NaCl 预处理或 48℃ 预处理 15 分钟后，显示了抗 55℃ 30 分钟 400 倍高的保护

作用。在 55℃ 1 小时后，用 3.5% NaCl 预处理或 48℃ 预处理 15 分钟

的样品，分别观察到抗 55℃ 的 10 倍和 5 倍高的保护作用（图 8）。

在 48℃ 用 3.5% NaCl 处理 15 分钟后，约氏乳杆菌 La1 的稳定期的

细胞显示了抗 55℃ 1 小时 20 倍高的显著的保护作用（图 9）。

如果用 2% NaCl 预胁迫 1 小时，处于稳定期青春双歧杆菌 NCC251

的细胞在连续的反复冻融后显示出了 14 倍高的存活（图 3）。在 4 次

反复冻融后，观察到 10 倍高的存活。

抗致死胆汁盐浓度的保护作用可在青春双歧杆菌 NCC251 和长双

歧杆菌 NCC481 的对数期及稳定期被观察到。在青春双歧杆菌 NCC251

的对数期用 0.1% 的胆汁盐预处理细胞（如 30 分钟）导致分别抗 0.3%

和 0.4% 胆汁盐的 300 倍和 21 倍的保护作用（图 6）。在 0.15% 胆汁盐

的致死浓度下青春双歧杆菌 NCC251（用 0.1% 胆汁盐前诱导）的稳定

期细胞的 81 倍高的存活被观察到（图 7）。从长双歧杆菌 NCC481 得

到了相似的结果。对数期细胞，用 0.15% 牛胆汁前诱导，显示了分别

抗 0.2%、0.25%、0.3% 牛胆汁的 400 倍、1800 倍及 580 倍的存活（图

4）。当稳定期的细胞被用 0.05% 的牛胆汁前诱导 30 分钟时，显示出了

抗 0.075%、0.1% 及 0.15% 的牛胆汁 30 分钟的 3 倍、29 倍及 150 倍

的存活（图 5）。

与 Flahaut 等（1996）发表的粪肠球菌细胞抗 0.3% 胆汁盐的保护

作用仅能达到 30 秒的结果相反，显然细胞能被保护抗致死的胆汁盐浓

度 30 分钟。这是没有预料到的。

长双歧杆菌 NCC481，长双歧杆菌 NCC490，长双歧杆菌 NCC585，

青春双歧杆菌 NCC251，和短双歧杆菌 NCC298 的 dnaK 的核心区域被

PCR 扩增并鉴定。随后的 mRNA 分析揭示了在 NCC251 和 NCC481 中，

dnaK 的诱导在转录水平被调控。转录通常被热诱导，而且对于 NCC251

也被盐和胆汁盐处理诱导。

根据这些结果得出结论：双歧杆菌和/或乳杆菌的胁迫预处理能导

致在否则是致死的相似的或不同的胁迫条件下显著增加的存活机会。

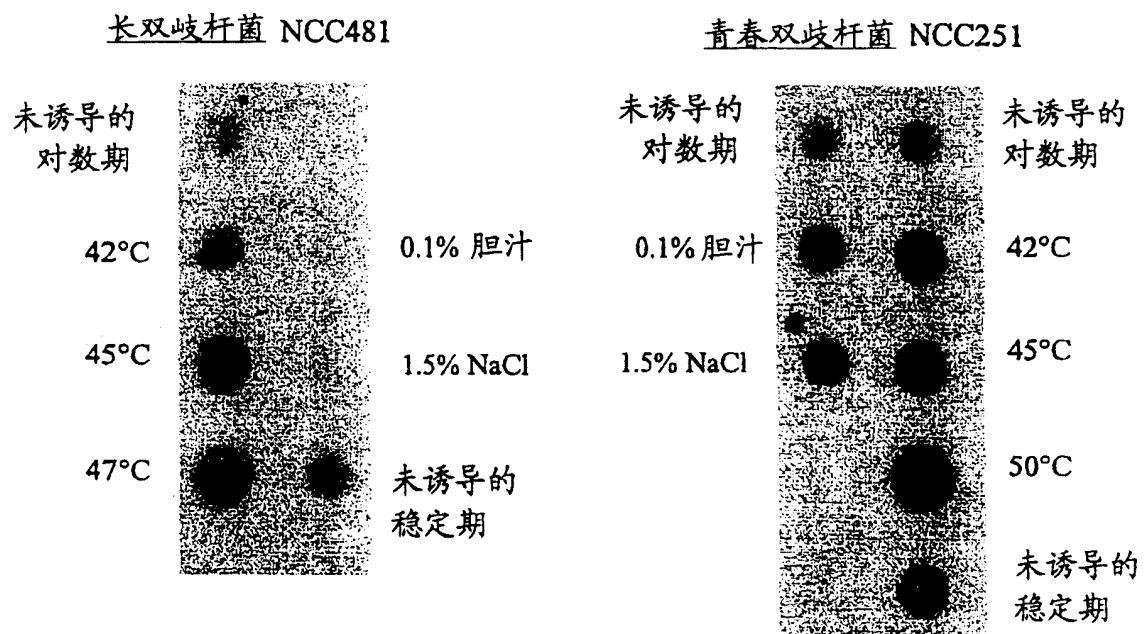


图 1

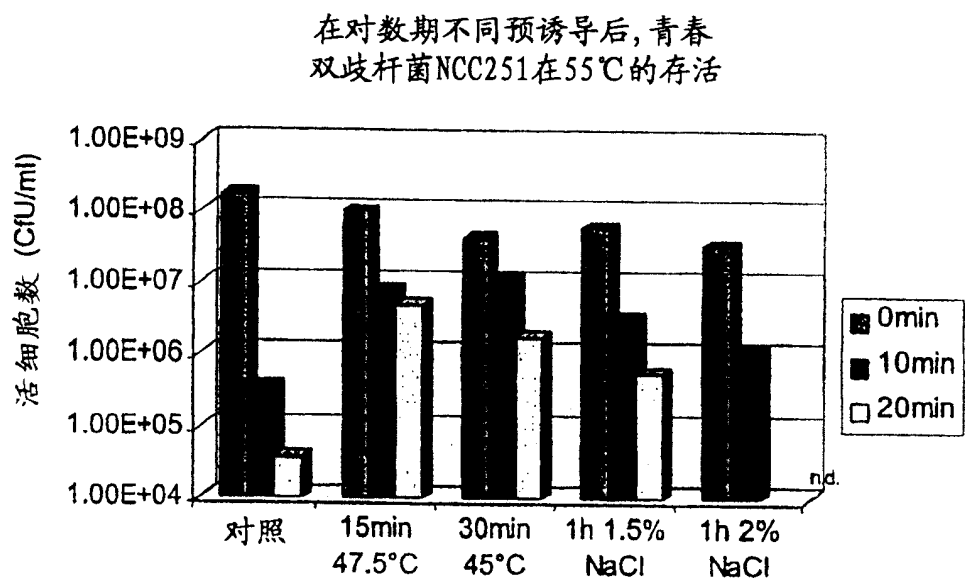


图 2

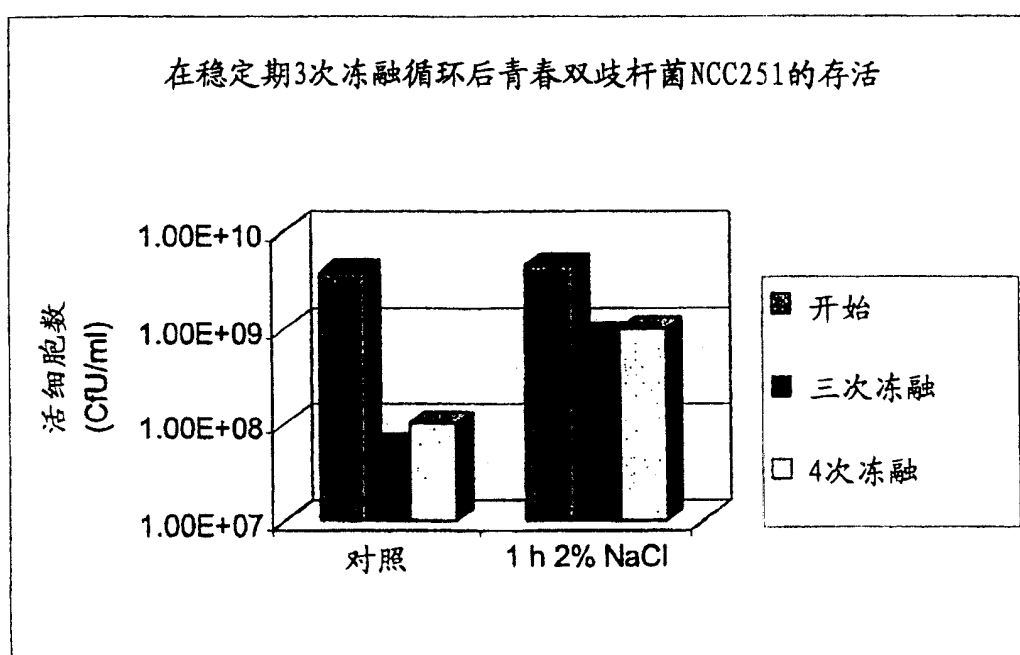


图 3

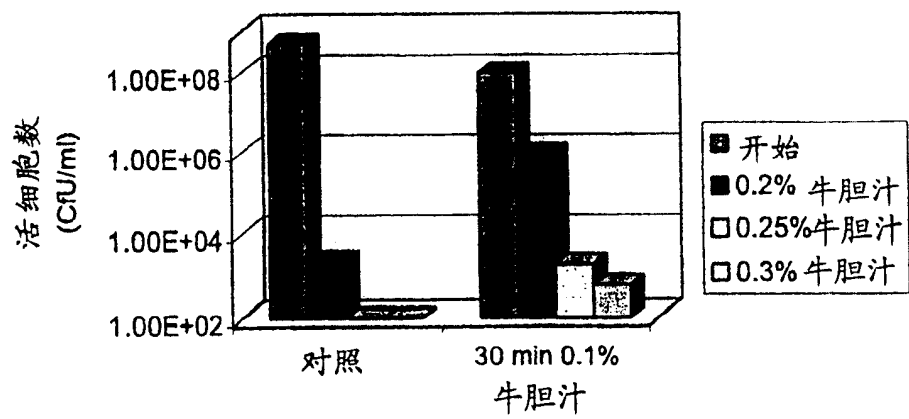


图 4

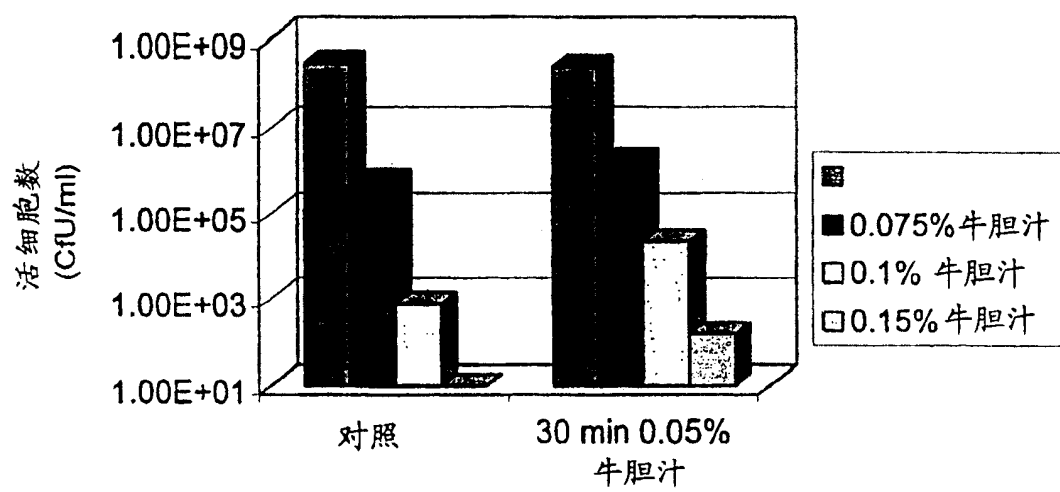


图 5

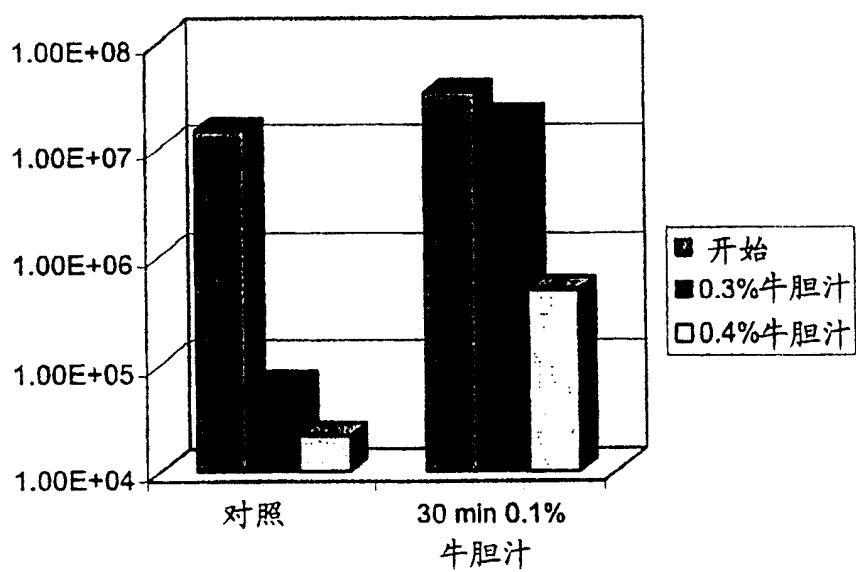


图 6

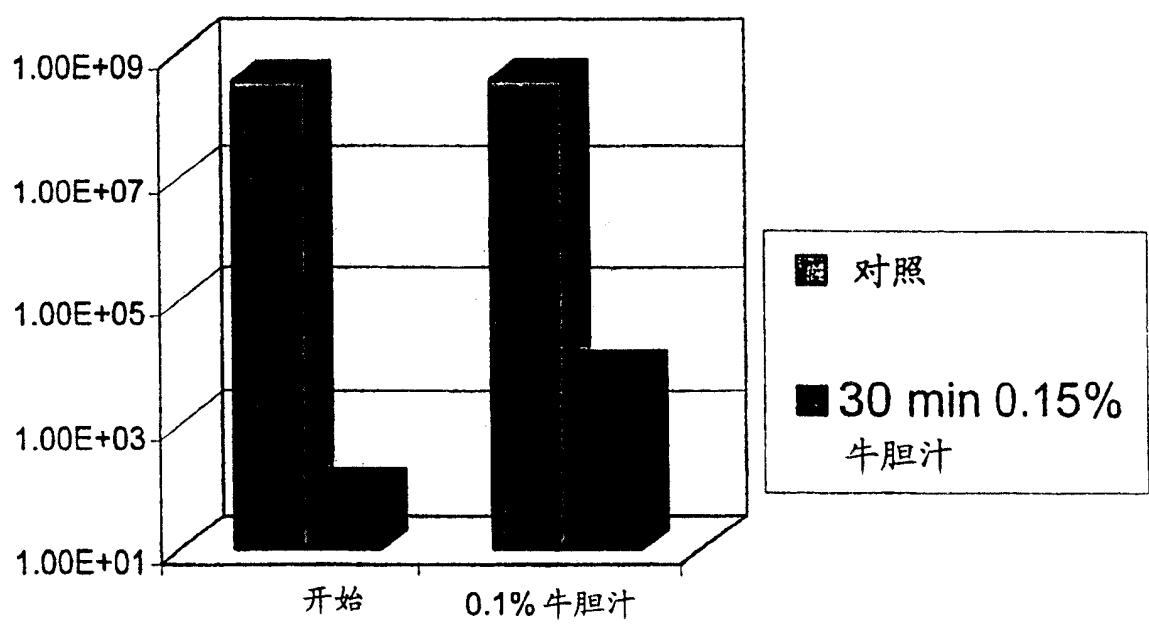


图 7

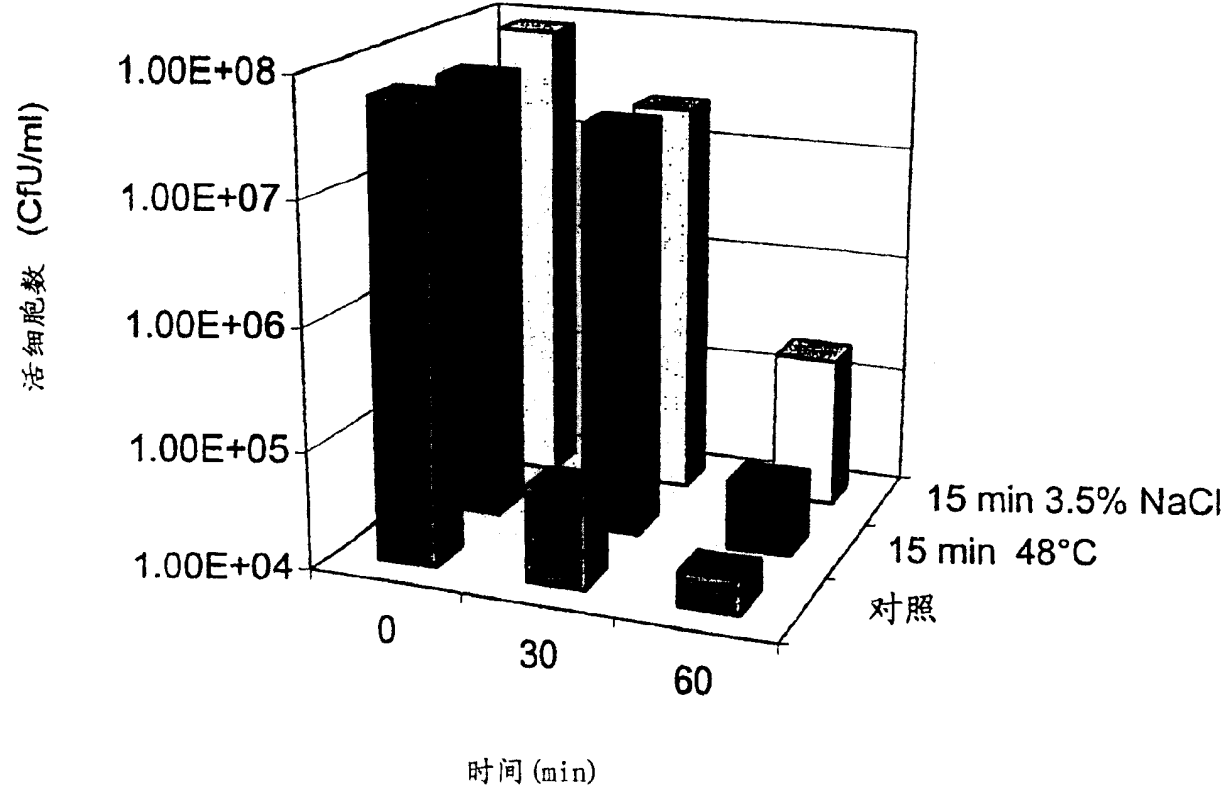


图 8

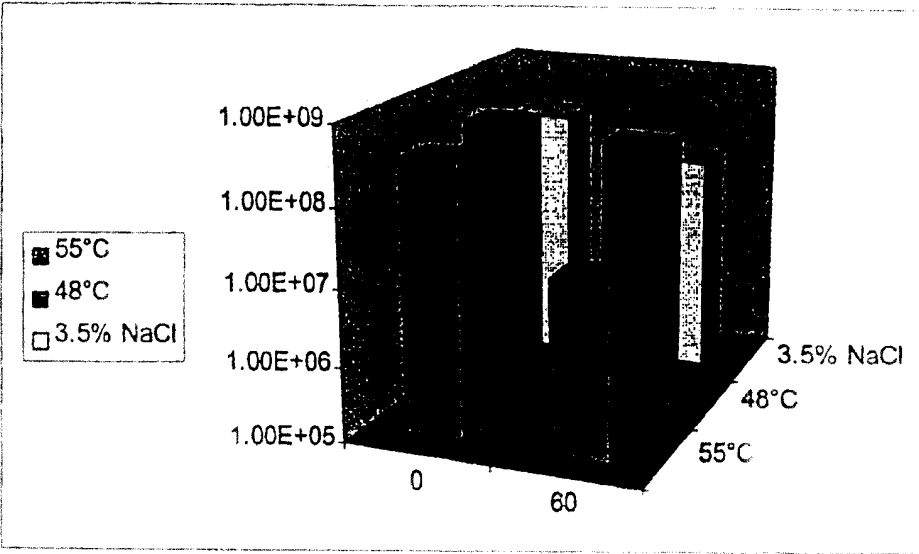


图 9