

促生长益生菌和应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域和食品领域，具体涉及一种益生菌和其在促生长上的应用。

背景技术

近年来，肠道微生物在人体健康中的作用受到广泛关注。研究发现，肠道微生物在宿主的免疫系统发育、营养物质吸收和代谢稳态维持中都发挥着至关重要的作用。

发育迟缓儿童通常表现为生长迟缓、发育落后和发病率高。一些研究表明剖腹产或者奶粉哺育的儿童，因缺乏来自母体遗传的菌群，引发先天性体内菌群种类与数量低下，进而导致肠道菌群多样性下降、免疫力低下及生长迟缓等负面效应。肠道菌群紊乱与儿童生长迟缓有关。将营养不良儿童的菌群移植到无菌小鼠体内，能够使无菌小鼠体重下降，代谢紊乱。以上结果证明了微生物与营养不良之间的因果关系，也说明了通过调节肠道微生物组成对于人体代谢和生长状况具有积极作用。

益生菌是一类活性微生物，当摄入足量时，能够对宿主产生有益效应。目前有很多学者将益生菌用于促进动物的生长发育，一些益生菌例如嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus*、屎肠球菌 *Enterococcus faecium* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株在不同动物中都被独立证明可以促进生长，增加体重增加，防止病原体定植，并抑制肌肉萎缩。研究发现，益生菌能够通过产生淀粉酶等消化酶或 B 族维生素来增强营养物质的代谢利用并提高饲料效率。也有研究表明，益生菌及其细胞壁成分能够通过改善外周组织的生长激素敏感性和增加 IGF-1 的循环水平，进而促进慢性营养不良小鼠和果蝇的生长。益生菌补充是具备促进宿主生长的强力候选方案之一。

儿童生长与肠道菌群健康密切相关，荟萃分析发现，部分临床实验研究证明益生菌的添加能够提高 0-59 月龄的正常儿童的体重和身高，非

临床环境中的研究结果也证明益生菌能够促进营养不良儿童的生长。目前多数益生菌的治疗聚焦于疾病儿童的生长，而关于评估益生菌对正常儿童生长发育影响的研究很少。

此外，受地理环境、遗传基因和饮食习惯等影响，全球各国人类的肠道菌群组成存在显著差异。研究发现中国人群肠道菌群的多样性显著高于西方人群，且两者在肠道优势菌群组成上也存在显著差异。这就使得进口的益生菌菌种并不一定完全适应中国人的肠道环境，可能会出现定植效率低甚至无有益效果的情况。

因此，开发出一株能够促进正常儿童生长发育，且更适宜中国人肠道菌群的益生菌有着重要的现实意义。

发明内容

由于不同区域的人群，肠道菌群组成存在差异显著。本技术旨在筛选出符合我国正常饮食或营养背景下新的促生长的益生菌菌株；通过检测该菌株在不同模式生物（果蝇、斑马鱼）幼体中的促生长效果，探究其在正常营养背景下对宿主生长发育的影响，填补国内外市场上的技术空白。

此外，本发明比较了不同营养背景下（正常蛋白水平、低蛋白水平）益生菌的作用效果，为益生菌的合理应用及下游产品的研制提供理论依据。

本发明旨在评估一株益生菌在不同动物模型中的促生长效果，并探究其作用机制，具体内容包括：

1. 益生菌的分离鉴定及安全性评估

本发明从发酵食品中分离得到一株植物乳植杆菌 *Lactiplantibacillus plantarum*。利用表型鉴定、分子生物学鉴定、系统进化分析确定菌株为植物乳植杆菌。益生菌在发挥其益生功能之前需要穿过胃肠道进行定植，本实验检测了菌株的耐酸耐胆盐能力，同时利用溶血平板和各类抗生素检测益生菌的耐药情况，确定其安全性。

2. 益生菌对不同动物模型的促生长作用

本发明在正常营养背景下探究益生菌对不同模式动物生长性能的影响，检测果蝇的幼体大小、成蛹时间和羽化时间，斑马鱼的体重、体长和增重率。

3. 益生菌在不同营养背景下对宿主生长的影响

益生菌在不同营养背景下的作用效果可能不同。本发明设置正常蛋白水平、低蛋白水平两种不同的营养背景，比较不同营养背景下益生菌的作用效果。

第一方面，本发明提供了植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) Hi188，其保藏号为 CGMCC No.30250。

本发明还提供了包含植物乳植杆菌 Hi188 的制剂。

所述包含植物乳植杆菌 Hi188 的制剂为食品原料、益生菌菌粉、食品添加剂、饲料添加剂、药物、液态饮液、食品或保健品中的一种或几种。

所述包含植物乳植杆菌 Hi188 的制剂，其为固态或液态制剂；其中，当所述制剂为液态制剂时，其包含 1.0×10^5 CFU $\sim 1.0 \times 10^{12}$ CFU/ml 量的植物乳植杆菌 Hi188；当所述制剂为固态形式时，其包含 1.0×10^5 CFU $\sim 1.0 \times 10^{12}$ CFU/g 量的植物乳植杆菌 Hi188。

所述包含植物乳植杆菌 Hi188 的制剂，其还包含辅料，所述辅料包括菊粉、低聚果糖、脱脂乳粉、脱盐乳清粉、乳铁蛋白、酪蛋白磷酸肽或水解蛋黄粉中的一种或几种。

另一方面，本发明提供了植物乳植杆菌 Hi188 在制备用于促进受试者生长的制剂或试剂盒中的用途。

在实施方案中，促进受试者生长的制剂或试剂盒中所述植物乳植杆菌 Hi188 的量为 1.0×10^5 CFU $\sim 1.0 \times 10^{12}$ CFU/ml 或 1.0×10^5 CFU $\sim 1.0 \times 10^{12}$ CFU/g。

在本发明的具体实施方案中，所述植物乳植杆菌 Hi188 或包含所述植物乳植杆菌 Hi188 的制剂可以作为活性成分存在于试剂盒中；所述试剂盒是指包含所述活性成分的任何产品形式（例如保健品盒、药物盒等），其任选的还包括容纳装置、外包装和/或使用说明书。其中，所述使用说

说明书可用于提供所述活性成分的施用信息，例如施用量、施用频率，或者指示所述活性成分的用途，例如用于促进受试者体长或身高增加、促进受试者体重增加或促进受试者发育。

本发明还提供了包含植物乳植杆菌 Hi188 的制剂在促进受试者生长中的用途。

在实施方案中，促进受试者生长包括：促进受试者体长增加、促进受试者体重增加、促进受试者发育中的一项或几项。

在实施方案中，受试者为果蝇、斑马鱼或哺乳动物。

在实施方案中，所述哺乳动物为小鼠或人。

在本发明中，所述正常蛋白是指用于维持生物体正常生长发育而摄入的现有技术常规的蛋白水平；所述低蛋白是指显著影响生物体正常生长发育的蛋白水平，例如低于正常蛋白的 20%-60% 的蛋白水平。

益生菌在功能性食品时代的开发和应用是当前的研究热点，满足了人们对食品功能化、健康化的需求。其中，基于益生菌的功能性产品受到广大群众的欢迎。本发明的有益效果在于：本发明不仅关注正常营养背景下益生菌对幼体的促生长作用，还关注不同营养背景下益生菌的效果，扩大了益生菌合理应用的范围，为人类开发促生长益生菌的研究提供重要参考价值；同时也为生长迟缓儿童提供了改善身高问题的方案，也为有着更高期望身高需求的正常儿童提供了更多的选择。

附图说明

图 1 显示了植物乳植杆菌 Hi188 菌落形态，其中 A 为整体俯视图；B 局部图。

图 2 显示了植物乳植杆菌 Hi188 染色体基因组圈图。

图 3 显示了植物乳植杆菌 Hi188 系统进化树。

图 4 显示了植物乳植杆菌 Hi188 生长曲线。

图 5 显示了植物乳植杆菌 Hi188 溶血性检测。

图 6 显示了植物乳植杆菌 Hi188 对正常营养条件下的果蝇幼虫生长的影响，其中 A 为正常营养组和正常营养 Hi188 添加组的果蝇幼虫的第

5 天对比照片；B 为正常营养组和正常营养 Hi188 添加组的果蝇幼虫的第 5 天体长统计比较；其中 CD 为正常营养组，CD+Hi188 为正常营养添加 10^9 CFU 植物乳植杆菌添加 Hi188 组，**表示 $P<0.01$ 。

图 7 显示了植物乳植杆菌 Hi188 及对比菌株 LP299v、WCFS1 和正常营养条件下果蝇幼虫生长的效果比较，其中 A 为 CON、LP299v、Hi188、WCFS1 的果蝇幼虫的第 5 天对比照片；B 为 CON、LP299v、Hi188、WCFS1 的果蝇幼虫的第 5 天体长统计比较；其中 CON 为正常营养组；LP299v 为正常营养添加 10^9 CFU 植物乳植杆菌 LP299v 组，Hi188 为正常营养添加 10^9 CFU 植物乳植杆菌 Hi188 组，WCFS1 为正常营养添加 10^9 CFU 植物乳植杆菌 WCFS1 组。

图 8 显示了植物乳植杆菌 Hi188 对低营养条件下果蝇幼虫生长的影响其中 A 为正常营养组、低营养组和低营养 Hi188 添加组的果蝇幼虫的第 5 天对比照片；B 为正常营养组、低营养组和低营养 Hi188 添加组的果蝇幼虫的第 3 至 5 天体长统计比较；其中 CD 为正常营养组；LD 为低营养组；LD+Hi188 为低营养添加 10^9 CFU 植物乳植杆菌 Hi188 组。

图 9 显示了植物乳植杆菌 Hi188 对正常营养斑马鱼幼鱼生长的影响，其中 A 为正常营养组和正常营养 Hi188 添加组的斑马鱼幼鱼的第 4 周对比照片；B 为正常营养组和正常营养 Hi188 添加组的斑马鱼幼鱼的第 4 周体长统计比较；其中 CD 为正常营养组；CD+Hi188 为正常营养添加 10^9 CFU 植物乳植杆菌 Hi188 组，****表示 $P<0.0001$ 。

图 10 显示了植物乳植杆菌 Hi188 对低营养斑马鱼幼鱼生长的影响，其中 A 为正常营养组、低营养组和低营养 Hi188 添加组的斑马鱼幼鱼的第 4 周对比照片；B 为正常营养组、低营养组和低营养 Hi188 添加组的斑马鱼幼鱼的 1 至 4 周体长统计比较；其中 CD 为正常营养组；LD 为低营养组；LD+Hi188 为低营养添加 10^9 CFU 植物乳植杆菌 Hi188 组。

图 11 为三周龄小鼠的体重和体长对比，其中 A 为正常对照组(CON)、Hi188 组和 WJL 组的三周龄小鼠的体重对比；B 为正常对照组(CON)、Hi188 组和 WJL 组的三周龄小鼠的体长对比。

图 12 为四周龄小鼠的体重和体长对比,其中 A 为正常对照组(CON)、Hi188 组和 WJL 组的四周龄小鼠的体重对比; B 为正常对照组(CON)、Hi188 组和 WJL 组的四周龄小鼠的体长对比; C 为正常对照组(CON)、Hi188 组和 WJL 组的四周龄小鼠的体重增重; D 为正常对照组(CON)、Hi188 组和 WJL 组的四周龄小鼠的体长增长; *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$ 。

图 13 为四周龄小鼠的股骨和胫骨长度对比,其中 A 为正常对照组(CON)、Hi188 组和 WJL 组的四周龄小鼠的股骨长度对比; B 为正常对照组(CON)、Hi188 组和 WJL 组的四周龄小鼠的胫骨长度对比; **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$, ****表示 $P<0.0001$ 。

图 14 为四周龄小鼠股骨和胫骨的拍摄图,其中 A 为正常对照组(CON)、Hi188 组和 WJL 组的四周龄小鼠的股骨对比; B 为正常对照组(CON)、Hi188 组和 WJL 组的四周龄小鼠的胫骨对比。

保藏说明

分类学: 植物乳植杆菌

名称: Hi188

拉丁名: *Lactiplantibacillus plantarum*

保藏机构: 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

保藏机构简称: CGMCC

地址: 北京市朝阳区北辰西路一号院三号

保藏日期: 2024 年 4 月 2 日

保藏中心登记入册编号: CGMCC No.30250

具体实施方式

为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,并参照附图,对本发明作进一步的详细说明。

下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法,所用的试剂如无特别说明均为可商购的试剂。

在本发明的实施例中，所述果蝇和斑马鱼均为现有技术常规模式生物，其均可商购获得，例如野生型 Canton S 品系黑腹果蝇购自国家果蝇资源中心（中国，上海），斑马鱼 AB 系购自国家斑马鱼资源中心（中国，武汉）。

实施例 1 植物乳植杆菌 Hi188 的分离和鉴定

1) 分离和纯化

取腐乳液（上海市闵行区吴泾镇）2.5 mL 加入 10 mL 试管中，再加入 2.5 mL 1×PBS 缓冲液，3000 r/min 离心 5 min，取上清液 100 μL 加入 40 mL MRS 肉汤培养基（购自杭州百思生物技术有限公司），于 30℃、摇床 200 r/min 条件下恒温培养过夜。使用无菌 1×PBS 缓冲液以 10^4 倍稀释菌液，取 100 μL 用涂布器涂布于 MRS 固体培养基（于 MRS 肉汤培养基基础上加入 1.5% 琼脂）上，30℃ 倒置培养，得到乳酸菌单菌落。从平板上挑选出形态不同的单菌落，经过反复划线分离纯化后，将其置于 30℃ 的恒温培养箱中连续培养 48 h，然后重复以上步骤，直至获得纯菌落。

2) 传代和冻存

使用接种环刮取 MRS 固体培养基上的菌落，将其接种于 10 mL MRS 肉汤培养基中，30℃、200 r/min 摇床中培养 12 h，后将灭菌过的 60% 甘油与菌液以 1:3 的体积混合，使甘油终浓度为 15%，吹打混匀，-80℃ 保存菌种。

3) 菌株鉴定和系统进化分析

蘸取少量冻存菌种采用三区划线的方法于 MRS 固体培养基进行平板划线，观察单菌落形态。在普通 MRS 固体培养基上，植物乳植杆菌 Hi188 呈现乳白色、圆形、大小均一、微微凸起，表面湿润光滑、边缘整齐的菌落（图 1）。

采用新鲜单菌株菌液作为 PCR 扩增体系中的模板进行 PCR 扩增，所用细菌 16S rRNA 基因引物序列为：正向引物 27 F：5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO: 1)；反向引物 1492 R：

5'-GGTTACCTTGTTACGACTT -3' (SEQ ID NO: 2), 测序结果在 NCBI 数据库中 BLAST 软件进行同源序列比对, 比对结果通过 MEGA 软件建立系统发育树。将分离鉴定菌株命名为植物乳植杆菌 Hi188, 经 16S rRNA 基因测序, 获得 16S rRNA 基因的序列如下:

GCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGA
TTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAA
CCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATAC
CGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTT
CGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTG
GGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGG
GTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGG
AGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCT
GTTGTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGAC
GGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAA
GCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCT
CAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAA
GAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT
GGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTGA
CGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGAGGGTTTC
CGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAA
CCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGT
TCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT
TATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACG
AGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCA

GTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGT
CGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAA (SEQ ID NO: 3)。

菌株全基因组测序和分析结果表明，Hi188 由 1 个染色体 DNA 和 10 个质粒 DNA 组成，其中染色体序列长度为 3,108,079 bp，GC 含量为 44.75（图 2）。Hi188 系统进化树如图 3 所示，Hi188 株与其他四株植物乳植杆菌聚为一簇。Hi188 鉴定为植物乳植杆菌 *Lactiplantibacillus plantarum*，属于《可用于食品的菌种名单》中的允许用于食品的菌种。

实施例 2 植物乳植杆菌 Hi188 特性

1) 生长曲线测定

观察菌株在 MRS 肉汤培养基中 37 °C 连续培养 24 h 过程该菌生长曲线的变化。取单菌落接种于 40 mL MRS 肉汤培养基的离心管中，置于 37 °C、200 r/min 摇床中培养。每隔 2 h 取出混匀的菌悬液 200 μ L，以空白培养基作为对照，测定波长 600 nm 处的吸光度值 OD_{600nm}，设置三个平行，绘制生长曲线。该菌株 Hi188 在 6 h 进入了对数生长期，在 22 h 左右进入了稳定期（图 4）。

2) 耐胆盐能力检测

肠液的胆盐浓度为 0.03%-0.3%，为此检测了 Hi188 在 0.3%胆盐条件下的耐胆盐性能。

首先使用 MRS 肉汤和牛胆盐（购自北京索莱宝科技有限公司）配制含 0.3%胆盐的 MRS 肉汤培养基，于高压蒸汽灭菌锅 121 °C，15 min 灭菌后冷却待用。将菌株于 MRS 肉汤培养 8 h 后，按 1%的接种量分别接种于配制好的 40 ml MRS 肉汤培养基或者含 0.3%胆盐的 MRS 肉汤培养基中。以 0.3%胆盐的 MRS 肉汤加菌组作为处理组，0.3%胆盐的 MRS 肉汤（不加菌）组作为该处理组的阴性背景组，MRS 肉汤加菌组（不加胆盐）为阳性对照，MRS 肉汤不加菌（不加胆盐）作为该阳性对照的阴性背景组，每个处理和对照做 3 个重复。37 °C，200 r/min 摇床中培养 3 h，分别检测 0 h、1 h、2 h、3 h 菌液 OD 值，计算其存活率，其公式为：

存活率(%)=（处理组 OD 值-处理组的阴性背景 OD 值）/（阳性对照 OD 值-阳性对照组的阴性背景 OD 值）×100%

1 h、2 h、3 h 菌株的存活率详见下表 1，结果表明植物乳植杆菌 Hi188 具有较好的耐胆盐能力。

表 1 植物乳植杆菌 Hi188 耐胆盐存活率

耐受条件	时间		
	1 h	2 h	3 h
0.3% 胆盐	56.75%	48.42%	64.22%

3) 人工胃液和人工肠液耐受性检测

益生菌在发挥其益生功能之前需要经过胃肠道进行定植。本研究检测了 Hi188 在 pH=3 的人工胃液（购自上海创赛科技有限公司）、pH=6.8 的人工小肠液（购自上海创赛科技有限公司）中的耐受性。将 Hi188 菌株培养 24 h 后，将 1 ml 菌液接种于 9 ml 人工胃液或小肠液中。以人工胃液或小肠液的加菌组作为处理组，以未接种菌液的空白人工胃液或小肠液作为阴性对照，每个处理和对照做 3 个重复。37 °C，200 r/min 摇床中培养 3 h，统计 0 h、1 h、2 h、3 h 的活菌数，并计算其存活率，其公式为：

存活率(%)=处理组活菌数/0 h 处理组活菌数×100%

表 2 植物乳植杆菌 Hi188 耐人工胃肠液存活率

时间	存活率			
	0 h	1 h	2 h	3 h
人工胃液	100.00%	69.97%	57.76%	56.93%
人工小肠液	100.00%	99.82%	85.28%	77.13%

结果见表 2，植物乳植杆菌 Hi188 在人工胃液、人工小肠液中处理 3h 的存活率均可达 50%以上，表明植物乳植杆菌 Hi188 在人工胃肠液中的存活能力较强。

实施例 3 植物乳植杆菌 Hi188 安全性鉴定

1) 溶血性检测

将分离到的 Hi188 菌株单菌落接种于血平板（购自安徽芜湖欧克生物技术有限公司）上。置于 37 °C 培养箱中培养 36 h，观察有无溶血现象产生。如图 5 所示，植物乳植杆菌 Hi188 为白色光滑菌落，在血平板上无溶血现象，由此说明目标菌株无明显致病性，且安全性较高。

2) MIC 值检测

本实验使用微量稀释法进行菌株对抗生素氨苄青霉素（Ampicillin, Amp）、庆大霉素（Gentamicin, Gen）、卡那霉素（Kanamycin, Kan）、红霉素（Erythromycin, Ery）、克林霉素（Clindamycin, Cli）、四环素（Tetracycline, Tet）和氯霉素（Chloramphenicol, Chl）的耐药性测定，按照 ISO 10932/IDF223 中的标准方法进行。菌株的耐药性用最低抑制浓度（minimum inhibitory concentration, MIC）表示。

设置质量浓度的检测范围为 0.5~256 µg/mL，使用各类抗生素配制抗生素贮藏液，其中氨苄青霉素钠、硫酸卡那霉素、氯霉素购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司，庆大霉素、盐酸四环素购自上海源叶生物科技有限公司，红霉素购自上海麦克林生化科技有限公司，克林霉素购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。根据所用试剂效价精确称量抗生素，在适当的溶剂中溶解，震荡混匀。

LSM 液体培养基由 90% IST 液体培养基（购自山东拓普生物工程有限公司）和 10% MRS 肉汤（购自杭州百思生物技术有限公司）组成。该培养基用于 MIC 值的测定。将配置好的高浓度的抗生素贮藏液用 LSM 液体培养基稀释到 2 倍于测定的最高浓度。

测量活化后菌株的 OD_{600nm}，用 LSM 培养基稀释相应倍数，按照 1% 接种量接入含不同浓度梯度的抗生素稀释液中，使得接种活菌数为 3×10^5 CFU/ml。在 37 °C 下 96 孔酶标板中孵育 24 h 后，使用微孔板分光光度计测量 OD_{600nm}，将无细菌生长对应的最低抗生素浓度作为菌株的 MIC 值。测定 MIC 值时以植物乳植杆菌 LP^{WCFS1}（购自中国微生物菌种保藏中心）作为对照菌株，以加菌肉汤作为阳性对照孔，不加菌肉汤作为阴性对照孔，均设置 3 个平行，当平行组结果不一致时，进行重复实验。

MIC 检测结果如表 3 所示，其中-表示该抗生素浓度抑菌，+表示该抗生素浓度不抑菌，Hi188 与 LP^{WCFS1} 对各类抗生素的耐药性结果类似，Hi188 对卡那霉素、四环素、氯霉素敏感性高于 LP^{WCFS1}。

表 3 植物乳植杆菌 Hi188 及 LP^{WCFS1} 的耐药性差异比较

抗生素	组别	抗生素浓度(μg/ml)										阳性对照	阴性对照	MIC 值	临界值	耐药型
		256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5					
氨基青霉素	Hi188	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	4	2	R
	LP ^{WCFS1}	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	4		R
庆大霉素	Hi188	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.5	16	S
	LP ^{WCFS1}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.5		S
卡那霉素	Hi188	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	8	64	S
	LP ^{WCFS1}	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	16		S
红霉素	Hi188	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.5	1	S
	LP ^{WCFS1}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.5		S
克林霉素	Hi188	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.5	2	S
	LP ^{WCFS1}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.5		S
四环素	Hi188	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	8	32	S
	LP ^{WCFS1}	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	16		S
氯霉素	Hi188	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	4	8	S
	LP ^{WCFS1}	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	2		S

注：临界值采用 EFSA 标准, MIC 值>临界值时为耐药型(R), MIC 值≤临界值为敏感型(S)

实施例 4 植物乳植杆菌 Hi188 对果蝇的促生长作用

将成年果蝇交配产的卵于产卵后 8 小时内转移到无菌的正常蛋白培养基中，每个处理设置 5 个平行培养管。其中培养基为酵母-玉米粉培养基。将培养基煮 5 min 至煮沸，在 121 °C 下灭菌 15 min。将 10⁹ CFU 的植物乳植杆菌 Hi188 量重悬于 200 μL 无菌水中，均匀接种于培养基上，对照组添加等量无菌水，然后将卵置于 25 °C 培养箱中进行培养，进行 12/12 小时的暗/光循环，湿度约为 40%。第 3-5 天，每天随机收集在对照组和加 Hi188 组培养基中生长的幼虫，体式显微镜下使用 Image J 软件对果蝇幼虫进行拍照和体长测量。

设置正常蛋白水平、低蛋白水平两种不同的营养背景，比较不同营养背景下益生菌的作用效果。在正常蛋白背景的实验，酵母-玉米粉培养基配方为 1 L 饲料中含白糖 20 g、红糖 20 g、玉米粉 80 g、酵母 40 g、琼脂粉 10 g、丙酸 1.5~2%，其中酵母含量为 40 g/L。在低蛋白背景实验中，调整培养基中的酵母含量为 10 g/L，其他成分与正常蛋白培养基相同。

结果显示，在正常蛋白背景下，Hi188 添加组果蝇幼虫的体长显著长于对照组，表明植物乳植杆菌 Hi188 能够促进果蝇幼虫的生长(图 6)。以植物乳植杆菌 LP299v (分离自健康的人体肠粘膜，购自瑞典益生菌生产公司 Probi)、WCFS1 (分离自人体口腔唾液，购自中国微生物菌种保藏中心) 作为对比菌株，经生长效果比较，植物乳植杆菌 Hi188 对果蝇幼虫体长的促生长效果显著优于对照菌株植物乳植杆菌 LP299v，且 Hi188 促生长的效果也显著优于另一对照菌株 WCFS1 (图 7)。

在低蛋白营养背景下，根据第 5 天的拍摄图发现，低营养组果蝇幼虫的体长明显低于正常营养组，生长上表现为发育不良(图 8A)。同时观察到相比于低营养组，Hi188 添加组的果蝇成蛹时间提前，羽化时间提前，即减缓了低营养发育迟缓带来的不良影响。结合第 3 至 5 天的体长统计结果，在低营养条件下添加 10^9 CFU Hi188，Hi188 明显促进了果蝇幼虫的生长发育，减缓了低营养所带来的不利影响(图 8)。

进一步地，本实施例还验证了植物乳植杆菌 Hi188 添加量为 1.0×10^5 CFU 和 1.0×10^{12} CFU 时同样具有类似的效果。

实施例 5 植物乳植杆菌 Hi188 对斑马鱼的促生长作用

让斑马鱼亲本鱼交配 4~6 h，然后用含亚甲蓝 $9 \mu\text{L/L}$ 的咸水(海盐 1.5 mL/L)收集鱼卵，将鱼卵进行分组后置于培养箱中，在 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 的盐水中培养，14/10 小时的暗/光循环，对照组和处理组均设置三个平行。鱼卵孵化后的前两天，每天投喂卵黄两次。后续每日饲喂饲料两次，同时在喂食时将用无菌水重悬的 Hi188 菌液加入水体中，使得加 Hi188 组水体中 Hi188 的终浓度为 10^8 CFU/ml，对照组添加等量无菌水。1-4 周，

每周在体式显微镜下使用 Image J 软件对斑马鱼幼鱼进行拍照和体长测量。

设置正常蛋白水平、低蛋白水平两种不同的营养背景，比较不同营养背景下益生菌的作用效果。在正常蛋白背景的实验中，饲料配方为 1 L 饲料中含鱼粉 500 g，淀粉 300 g，鱼油 20 g，多维 15 g，多矿 15 g，羧甲基纤维素钠 4 g，纤维素 144.38 g，氯化胆碱 0.5 g，二丁基羟基甲苯 0.02 g，二甲基-β-丙酸噻亨 0.1 g，磷酸二氢钙 1 g，经凯式定氮法测定蛋白含量为 36%。在低蛋白背景的实验中，调整 1L 饲料中鱼粉为 300 g，鱼油为 40 g，纤维素为 324.38 g，其他成分与正常蛋白饲料相同，经凯式定氮法测定蛋白含量为 21%。

4 周后，对比正常营养组和正常营养 Hi188 添加组，结果显示，在正常蛋白背景下，Hi188 添加组斑马鱼幼鱼的生长发育明显，眼直径变宽，体长增长，体面积增大，证明了植物乳植杆菌 Hi188 的促进斑马鱼幼鱼生长的作用（图 9）。

低蛋白营养背景下的斑马鱼幼鱼较正常营养背景下相比，体长明显变小，发育明显迟缓。而与低营养组相比，低营养添加终浓度为 10^8 CFU/ml Hi188 的斑马鱼幼鱼生长发育明显，体长变长，眼直径变宽，身体面积也增大，一定程度上减缓了低蛋白带来的不利影响（图 10），证明了 Hi188 在低蛋白营养背景下的促生长作用。

实施例 6 植物乳植杆菌 Hi188 对小鼠的促生长作用

以三周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠（上海斯莱克实验动物有限责任公司）作为实验对象，实验周期为一周。对正常对照组（CON）的三周龄幼鼠灌胃无菌生理盐水，对 Hi188 组和 WJL 组小鼠分别等量的灌胃植物乳植杆菌 Hi188 或植物乳植杆菌 WJL（公开于 Martin Schwarzer *et al.*, (2023) Microbe-mediated intestinal NOD2 stimulation improves linear growth of undernourished infant mice. Science Doi: 10.1126/science.ade9767），灌胃剂量均为 1×10^9 CFU/只，灌胃体积均为 0.2 ml/只，正常对照组及 Hi188 组小鼠各 10 只（n=10），WJL 组小鼠 5 只（n=5）。

3 周龄时, Hi188 组小鼠的体重和体长与正常对照组幼鼠无显著差异(图 11), 而 4 周龄时, Hi188 组小鼠的体重和体长显著大于正常对照组幼鼠(图 12), 此结果表明 Hi188 菌株能够促进小鼠体重的增加和体长的线性生长。

3 周龄时, Hi188 组小鼠的股骨和胫骨长度与正常对照组幼鼠无显著差异, 而 4 周龄时, Hi188 组小鼠的股骨和胫骨长度显著大于正常对照组幼鼠(图 13 和 14), 此结果表明 Hi188 菌株能够促进小鼠股骨和胫骨的生长。

上述结果证明了 Hi188 菌株对小鼠的促生长作用。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例, 可以理解的是, 上述实施例是示例性的, 不能理解为对本发明的限制, 本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

权利要求

1. 一种植物乳植杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) Hi188, 其保藏号为 CGMCC No.30250。
2. 一种制剂, 其包含权利要求 1 所述的植物乳植杆菌 Hi188。
3. 根据权利要求 2 所述的制剂, 其为食品原料、益生菌菌粉、食品添加剂、饲料添加剂、药物、液态饮液、食品或保健品中的一种或几种。
4. 权利要求 2 或 3 所述的制剂, 其为固态或液态制剂; 其中所述制剂包含 1.0×10^5 CFU $\sim 1.0 \times 10^{12}$ CFU/mL 或 1.0×10^5 CFU $\sim 1.0 \times 10^{12}$ CFU/g 量的植物乳植杆菌 Hi188。
5. 权利要求 2 或 3 所述的制剂, 其还包含辅料, 所述辅料包括菊粉、低聚果糖、脱脂乳粉、脱盐乳清粉、乳铁蛋白、酪蛋白磷酸肽或水解蛋黄粉中的一种或几种。
6. 权利要求 1 所述的植物乳植杆菌 Hi188 在制备用于促进受试者生长的制剂或试剂盒中的用途。
7. 权利要求 6 所述的用途, 其中, 所述植物乳植杆菌 Hi188 的量为 1.0×10^5 CFU $\sim 1.0 \times 10^{12}$ CFU/ml 或 1.0×10^5 CFU $\sim 1.0 \times 10^{12}$ CFU/g。
8. 权利要求 6 或 7 所述的用途, 其中促进受试者生长包括: 促进受试者体长或身高增加、促进受试者体重增加或促进受试者发育中的一项或几项。
9. 权利要求 6 或 7 所述的用途, 其中所述受试者为果蝇、斑马鱼或哺乳动物。
10. 权利要求 9 所述的用途, 其中所述哺乳动物为小鼠或人。