植物乳植杆菌 JN-7、菌粉、制备方法、益生菌组合物及其用途

[0001] 本申请要求于 2024 年 6 月 14 日提交的、申请号为 202410775747.8、发明名称为“植物乳植杆菌 JN-7、菌粉、制备方法、益生菌组合物及其用途”的中国专利申请的优先权，其内容应理解为通过引用的方式并入本申请中。

技术领域

[0002] 本文总体涉及生物应用技术领域，尤指一种植物乳植杆菌 JN-7、菌粉、制备方法、益生菌组合物及其用途。

背景技术

[0003] 益生菌是通过定殖在人体内，改变宿主某一部位菌群组成的一类对宿主有益的活性微生物。益生菌通过调节宿主黏膜与系统免疫功能或通过调节肠道内菌群平衡，促进营养吸收保持肠道健康的作用，从而产生有利于健康作用的单微生物或组成明确的混合微生物。

[0004] 植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)是一类常见的益生菌，广泛地应用于发酵乳制品、肉制品、植物产品和焙烤食品中。其主要作用在于能够产生乳酸、降低 pH，防止腐败菌繁殖，改善产品风味和质地等。近年来，研究发现，植物乳植杆菌具有良好的益生菌功能，可抑制包括幽门螺杆菌等的胃肠道致病菌、改善胃肠道功能和代谢、增强肠道屏障功能、降低感染风险等。

[0005] 食品中益生菌的稳定性和活度与益生菌所能达到的保健效果息息相关，亟需开发稳定性好并能长期保存的益生菌。

发明内容

[0006] 本申请提供了一种植物乳植杆菌 JN-7，其中，所述植物乳植杆菌 JN-7 的分类命名为植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)，保藏编号为 CGMCC No. 30605。

[0007] 在另一方面，本申请还提供了由本文描述的植物乳植杆菌 JN-7 制备得到的菌粉。

[0008] 在另一方面，本申请还提供了本文描述的菌粉的制备方法，包括以下步骤：

[0009] 1)发酵本文描述的植物乳植杆菌 JN-7；

[0010] 2)将发酵产物离心沉淀，冷冻干燥，即得菌粉。

[0011] 在另一方面，本申请还提供了一种益生菌组合物，包含本文描述的植物乳植杆菌 JN-7 或本文描述的菌粉。

[0012] 在另一方面，本申请还提供了本文描述的植物乳植杆菌 JN-7、本文描述的菌粉或本文描述的益生菌组合物在制备抗炎药物中的用途。

[0013] 在另一方面，本申请还提供了本文描述的植物乳植杆菌 JN-7、本文描述的菌粉或本文描述的益生菌组合物在制备食品或保健品中的用途。

[0014] 益生菌粉中存活的活细胞与益生菌产品的质量和生产成本密切相关。稳定性好的菌株可以提高益生菌粉中的活细胞数，从而有助于提高益生菌粉的质量并降低成本。

[0015] 本申请提供了一株在产量，稳定性，安全性，酸、胆盐和胃肠道耐受性，抗生素敏感性方面均较好的植物乳植杆菌，将其命名为植物乳植杆菌 JN-7。将其保藏于：中国普通微生物菌种保藏管理中心，地址：中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所，保藏日期为 2024 年 05 月 13 日。保藏编号为 CGMCC No. 30605。

[0016] 通过该菌株的基本特性分析(生长曲线、耐酸性、耐胆盐、耐胃肠液)、安全性评价(抗生素敏感性、溶血能力、产毒能力、细胞毒性)、黏附性评价、抗炎作用评价、生产性能评价(发酵产率和冻干产率)和稳定性测试(加速储存稳定性试验)，发现植物乳植杆菌 JN-7 是安全菌株，具有优良的生产性能、高稳定性和抗炎功效。由其生产得到的菌粉能够在较长时间内保持稳定及活性。

[0017] 本申请的其它特征和优点将在随后的说明书中阐述，并且，部分地从说明书中变得显而易见，或者通过实施本申请而了解。本申请的其他优点可通过在说明书以及附图中所描述的方案来实现和获得。

附图概述

[0018] 附图用来提供对本申请技术方案的理解，并且构成说明书的一部分，与本申请的实施例一起用于解释本申请的技术方案，并不构成对本申请技术方案的限制。

[0019] 图 1 为本申请的实施例中的植物乳植杆菌 JN-7 基因组圆图。圆图从外到内显示了七种信息：第一个圆是基因组位置信息，第二个圆是 GC 含量信息，第三个圆是正链上的编码基因(标记为红色)，第四个圆是负链上的编码基因(标记为绿色)，第五个圆是正链上的 ncRNA(标记为蓝色)，第六个圆是负链上的 ncRNA 信息(标记为紫色)，第七个圆是基因组上的长片段重复序列信息(标记为橙色)。

[0020] 图 2 为本申请实施例中植物乳植杆菌 JN-7 在 37℃和 200rpm 下从 OD 0.1 开始的生长曲线。

[0021] 图 3 为本申请实施例中植物乳植杆菌 JN-7 的溶血能力结果。

[0022] 图 4 示出了本申请实施例中植物乳植杆菌 JN-7 与肠上皮细胞 HT-29 的相互作用。其中， a：植物乳植杆菌 JN-7 不降低 HT-29 细胞活力。数据表示与植物乳植杆菌 JN-7 共孵育 18 小时后的细胞与纯培养基组细胞的存活率(n = 6)。b：鼠李糖乳酪杆菌 LGG 和植物乳植杆菌 JN-7 与 HT-29 细胞的黏附比。数值表示与 HT-29 孵育 4 小时后 LGG 和植物乳植杆菌 JN-7 的黏附率。数据用 Mean ± Sem 表示，*P <0.05，**P <0.01，***P <0.001。

[0023] 图 5 示出了本申请实施例中植物乳植杆菌 JN-7 调节 LPS 刺激的 THP-1 细胞产生炎症因子的抗炎能力。其中， a：白介素 6（IL）-6 mRNA； b：IL-8 mRNA； c： IL-10 mRNA。数据用 Mean ± Sem 表示， *P <0.05， **P <0.01， ***P <0.001。

[0024] 图 6A-图 6D 为本申请实施例中植物乳植杆菌 JN-7 菌粉(图 6A)、鼠李糖乳酪杆菌 LGG(图 6B)及其他 15 株植物乳植杆菌菌粉(图 6C-图 6D)在 40℃和 75%湿度下储存期间的活细胞数和水活度。

详述

[0025] 除非另有说明，本文使用的技术和科学术语具有与本申请所属领域技术人员通常所理解的相同的含义。当以范围、优选范围、或者优选的数值上限以及优选的数值下限的形式表述某个量、浓度或其他值或参数的时候，应当理解相当于具体揭示了通过将任

意一对范围上限或优选数值与任意范围下限或优选数值结合起来的任何范围，而不考虑该范围是否具体揭示。除非另有说明，本文所列出的数值范围旨在包括范围的端点和该范围内的所有整数和分数(小数)。

[0026] 术语“约”、“大约”当与数值变量并用时，通常指该变量的数值和该变量的所有数值在实验误差内(例如在平均值 95%的置信区间内)或在指定数值的±10%内，或更宽范围内。

[0027] 表述“包含”或与其同义的类似表述“包括”、“含有”和“具有”等是开放性的，不排除额外的未列举的元素、步骤或成分。表述“由…组成”排除未指明的任何元素、步骤或成分。表述“基本上由…组成”指范围限制为指定的元素、步骤或成分，加上任选存在的不会实质上影响所要求保护的主题的基本和新的特征的元素、步骤或成分。应当理解，表述“包含”涵盖表述“基本上由…组成”和“由…组成”。

[0028] 表述“至少一种(个)”或“一种(个)或多种(个)”表示 1、2、3、4、5、6、7、8、9种(个)或更多种(个)。

[0029] 提高功能菌株稳定性的研究大多是通过细菌粉末保护剂的开发来实现的。由于每种菌株固有的稳定性，保护剂在稳定益生菌粉末方面的作用有限。开发稳定性好的菌株用于商业益生菌粉的复合物，是解决益生菌产品在保质期内细菌活性低的问题的另一种途径。

[0030] 基于此，本申请提供了一种植物乳植杆菌 JN-7，其中，植物乳植杆菌 JN-7的分类命名为植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)，保藏编号为 CGMCC No.30605。

[0031] 在另一方面，本申请还提供了由本文描述的植物乳植杆菌 JN-7 制备得到的菌粉。

[0032] 在另一方面，本申请还提供了本文描述的菌粉的制备方法，包括以下步骤：

[0033] 1)发酵本文描述的植物乳植杆菌 JN-7；

[0034] 2)将发酵产物离心沉淀，冷冻干燥，即得菌粉。

[0035] 在一些实施方案中，本文描述的菌粉的制备方法包括以下步骤：

[0036] 1)将本文描述的植物乳植杆菌 JN-7 在生物反应器中发酵培养，pH 4.5-5.3、温度 35-40℃、搅拌器速度 160-200rpm；

[0037] 2)将发酵产物离心沉淀，将沉淀与保护剂混合，在真空冷冻干燥机中冷冻干燥并粉碎成粉末，即得菌粉。

[0038] 在另一方面，本申请还提供了一种益生菌组合物，包含本文描述的植物乳植杆菌 JN-7 或本文描述的菌粉。

[0039] 在一些实施方案中，益生菌组合物还包含一种或更多种选自以下的益生菌：双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳酪杆菌属(*Lacticaseibacillus*)、粘液乳杆菌属(*Limosilactobacillus*)、乳植杆菌属(*Lactiplantibacillus*)、联合乳杆菌属(*Ligilactobacillus*)、广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、丙酸菌属(*Acidipropionibacterium*)、魏茨曼氏菌属(*Weizmannia*)、动物球菌属(*Mammaliicoccus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和片球菌属(*Pediococcus*)和枯草芽孢杆菌 DE111(*Bacillus subtilis DE111*)。

[0040] 在一些实施方案中，益生菌组合物还包含一种或更多种选自以下的益生菌：青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、动物双歧杆菌动物亚种(*Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*)、动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*)、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)、长双歧杆菌长亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*)、长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)、德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、德氏乳杆菌乳亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*)、格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)、马乳酒样乳杆菌马乳酒样亚种(*Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*)、干酪乳酪杆菌(*Lacticaseibacillus casei*)、副干酪乳酪杆菌(*Lacticaseibacillus paracasei*)、鼠李糖乳酪杆菌(*Lacticaseibacillus rhamnosus*)、发酵粘液乳杆菌(*Limosilactobacillus fermentum*)、罗伊氏粘液乳杆菌(*Limosilactobacillus reuteri*)、植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)、唾液联合乳杆菌(*Ligilactobacillus salivarius*)、弯曲广布乳杆菌(*Latilactobacillus curvatus*)、清酒广布乳杆菌(*Latilactobacillus sakei*)、唾液链球菌嗜热亚种(*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*)、乳酸乳球菌乳亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、乳酸乳球菌乳亚种(双乙酰型)(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis biovar diacetylactis*)、乳脂乳球菌(*Lactococcus cremoris*)、费氏丙酸杆菌谢氏亚种(*Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii*)、产丙酸丙酸菌(*Acidipropionibacterium acidipropionici*)、肠膜明串珠菌肠膜亚种(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、凝结魏茨曼氏菌(*Weizmannia coagulans*)、小牛动物球菌(*Mammaliicoccus vitulinus*)、木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosus*)、肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)、马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)和枯草芽孢杆菌DE111(*Bacillus subtilis DE111*)。

[0041] 在另一方面，本申请还提供了本文描述的植物乳植杆菌 JN-7、本文描述的菌粉或本文描述的益生菌组合物在制备抗炎药物中的用途。在一些实施方案中，药物通过口服施用。

[0042] 在另一方面，本申请还提供了本文描述的植物乳植杆菌 JN-7、本文描述的菌粉或本文描述的益生菌组合物在制备食品或保健品中的用途。

[0043] 在一些实施方案中，食品或保健品为乳制品、豆制品、肉制品、果蔬制品、饮料或零食。在一些实施方案中，食品或保健品还包含食用辅料。

[0044] 在一些实施方案中，食品为保健食品；或食品包括乳制品、豆制品、肉制品或果蔬制品；或食品为饮料或零食。在一些实施方案中，食品包含本文描述的植物乳植杆菌 JN-7 和食用辅料。

[0045] 本申请描述了多个实施例，但是该描述是示例性的，而不是限制性的，并且对于本领域的普通技术人员来说明显的是，在本申请所描述的实施例包含的范围内可以有更多的实施例和实现方案。尽管在附图中示出了许多可能的特征组合，并在具体实施方式中进行了讨论，但是所公开的特征的许多其它组合方式也是可能的。除非特意加以限制的情况，任何实施例的任何特征可以与任何其它实施例中的任何其他特征结合使用，或可以替代任何其它实施例中的任何其他特征。

[0046] 本申请包括并设想了与本领域普通技术人员已知的特征的组合。本申请已经公开的实施例和特征也可以与任何常规特征组合，以形成由权利要求限定的独特的发明方案。任何实施例的任何特征也可以与来自其它发明方案的特征组合，以形成另一个由权利

要求限定的独特的发明方案。因此，应当理解，在本申请中示出和/或讨论的任何特征可以单独地或以任何适当的组合来实现。因此，除了根据所附权利要求及其等同替换所做的限制以外，实施例不受其它限制。此外，可以在所附权利要求的保护范围内进行各种修改和改变。

[0047] 此外，在描述具有代表性的实施例时，说明书可能已经将方法和/或过程呈现为特定的步骤序列。然而，在该方法或过程不依赖于本文所述步骤的特定顺序的程度上，该方法或过程不应限于所述的特定顺序的步骤。如本领域普通技术人员将理解的，其它的步骤顺序也是可能的。因此，说明书中阐述的步骤的特定顺序不应被解释为对权利要求的限制。此外，针对该方法和/或过程的权利要求不应限于按照所写顺序执行它们的步骤，本领域技术人员可以容易地理解，这些顺序可以变化，并且仍然保持在本申请实施例的精神和范围内。

[0048] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照国家标准测定。下述实施例中未注明出处的实验材料，均为市售原料。下述实施例中的各步骤中采用的设备均为常规设备。若没有相应的国家标准，则按照通用的国际标准、常规条件、或按照制造厂商所建议的条件进行。除非另有定义或说明，本申请中所使用的所有专业与科学用语与本领域技术熟练人员所熟悉的意义相同。此外任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本申请方法中。

[0049] **实施例 1. 植物乳植杆菌 JN-7 的获得与鉴定**

[0050] 本申请提供的植物乳植杆菌 JN-7 分离自四川成都自家腌制泡菜中。

[0051] 1. 植物乳植杆菌 JN-7 的 16s 测序

[0052] JN-7 细菌基因组 DNA 使用 Takara Mini-BEST 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 3.0 版提取。16S rRNA 基因通过通用引物 27F：5'-AGAGTTTTGATCCTGTCCAG-3'(SEQ ID NO:1)和 1492R：5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (SEQ ID NO:2)扩增。PCR 循环：94℃初始活化 2min；循环步骤为：94℃变性 30s；55℃退火 1min；72℃延伸 1 分钟；最后在 72℃持续 10 分钟。PCR 产物经过纯化进行一代测序，测得的 16s rRNA 序列如 SEQ ID NO:3 所示。

[0053] 经过 NCBI 网站 Blast 比对植物乳植杆菌后发现其与模式菌株 *Lactiplantibacillus plantarum* SRCM100442 的相似性达到 99.93%，综合菌株 JN-7 有关生理生化指标和分子生物学鉴定结果，结合其形态学特征，我们将其命名为 *Lactiplantibacillus plantarum* JN-7，于 2024 年 5 月 13 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心，其保藏编号为 CGMCC No. 30605。

[0054] 2. 植物乳植杆菌 JN-7 的全基因组测序

[0055] 为了进行基因组测序，使用 MRS 肉汤在 37℃厌氧条件下培养植物乳植杆菌 JN-7 24 小时。单菌落在 MRS 肉汤中培养过夜。将肉汤在 8000 ×g、4℃、5min 下离心。沉淀送至 GENEWIZ 测序公司(中国)进行测序、组装、注释和生物信息学分析。

[0056] 全基因组测序在 Illumina PE150 平台和 PacBio Sequel 系统上进行。对于 PacBio 测序文库，使用 g-TUBE 装置将 5-10μg 基因组 DNA 剪切成 10-15Kb 的片段。然后使用 SMRTbell® Express Template Preparation Kit 2.0 构建文库。简而言之，DNA 剪切片段经过单链突出端去除、DNA 损伤修复、末端修复、A 加尾、带有条形码的突出端接头连接。使用 Qubit 3.0 荧光计(Invitrogen，卡尔斯巴德，加利福尼亚州)对文库进行定量，并使用 Agilent2100 生物分析仪系统检查文库的大小。按照制造商的说明进行后续步骤来准备 SMRTbell 库。使用 PacBio Sequel 平台对文库进行测序。PacBio 读段使用 Hifiasm/Canu

进行组装。然后使用Pilon软件使用之前的Illumina数据重新校正基因组。Prodigal/Augustus基因查找软件已用于查找编码基因。使用程序 tRNAscan-SE 和默认参数设置在基因组中检测转移 RNA(tRNA)。rRNA 通过使用 Barrnap 进行鉴定。其他 RNA 通过 rfam 数据库鉴定。编码基因通过 Diamond 用国家生物技术信息中心(NCBI)nr 数据库进行注释。然后通过 GO(Gene Ontology)数据库注释基因的功能，并使用 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库注释通路。基因编码的蛋白质通过 COG(Clusters of Orthologous Groups)数据库进行系统发育分类。使用 Diamond 在 CAZy 数据库、Swiss_Prot 数据库、Pfam 数据库、CARD 数据库、VFDB 数据库或 DFVF 数据库中检索 E<1e-5 的蛋白质序列。

[0057] 对植物乳植杆菌 JN-7 的基因组序列进行组装和分析。基本基因组信息序列如表 1 所示。基因组长度为 3255213bp，共有 3218 个基因，3090 个蛋白质编码基因。使用 Circos(版本 0.69)软件创建显示基因、ncRNA、GC 含量和重复序列信息的基因组圆图，见图 1。

[0058] 表 1 植物乳植杆菌 JN-7 的基本基因组信息

特征	**值**	**占总数的%**
总基因	3218	100
大小(bp)	3255213	100
RNA 基因	128	3.98
蛋白质编码基因	3090	96.02
酶的蛋白质编码基因	1058	32.88
具有跨膜螺旋的基因	850	26.41
具有信号肽的基因	162	5.03
分配到 COG 的基因	2328	72.34
G+C 含量(bp)	1450568	44.56
COG 簇	1264	54.3

[0059] 3. 植物乳植杆菌 JN-7 的鉴定

[0060] 植物乳植杆菌 JN-7 的鉴定是通过使用在线 ANI 计算器(http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/)计算 JN-7 基因组序列与植物乳植杆菌 *Lactiplantibacillus plantarum* SRCM100442 标准菌株之间的平均核苷酸同一性(Average Nucleotide Identity ，ANI)来进行的。ANI 计算器使用两个基因组数据集之间的最佳命中(单向 ANI)和相互最佳命中(双向 ANI)来估计平均核苷酸同一性。通过比较 JN-7 和植物乳植杆菌参考菌株，得到 99.21%的 ANI 结果，表明 JN-7 菌株属于植物乳植杆菌种。

[0061] 利用 Makeblastdb 软件建立了选自 NCBI 的 1215 个(检索于 2024.2.20)植物乳植杆菌基因组数据库。植物乳植杆菌筛选的标准是已上传至 NCBI 的完整基因组或者基因组草图。通过 Blastn 将组装的 JN-7 基因组与植物乳植杆菌基因组数据库进行比较，生成比较条目中的不匹配区域以及不匹配区域的数量。未查询到和组装结果相比完全一致的或容许至多 1000 个 mismatch 的参考，表明植物乳植杆菌 JN-7 是 NCBI 中从未报道过的菌株。

[0062] **实施例 2. 植物乳植杆菌 JN-7 的表征**

[0063] 植物乳植杆菌 JN-7 的特征

[0064] 对植物乳植杆菌 JN-7 进行发酵培养，并测定菌株的以下特征

[0065] 1) 植物乳植杆菌 JN-7 生长曲线

[0066] 使用 Growth profiler 960(Enzyscreen B.V.，Heemstede，Netherlands)在 37℃的温度绘制 JN-7 的生长曲线。具体操作如下：JN-7 MRS 液体培养 16 小时后接种到新鲜的 MRS 肉汤中并调整最终 OD_{600} 为 0.1。将调整好 OD 的菌液加入无菌 96 孔板中，确保每孔添加量为 250μL，共进行 11 组平行(A1-A11)。在有氧条件下，以 200rpm、37℃培养 48 小时，每 30 分钟对 OD 值进行一次采集。

[0067] 如图 2 所示，通过 Growth Profiler 960 拟合出一条典型的二次曲线。在 37℃、200rpm 条件下培养，初始 OD 为 0.1 的植物乳植杆菌 JN-7 在 18 小时内达到指数生长期，并在接下来的 48 小时内处于稳定期。

[0068] 2) 酸、胆盐和胃肠道耐受性

[0069] 将在 MRS 肉汤中培养 16h 的新鲜菌液 12000rpm、4℃离心 2 分钟，留取沉淀。用无菌 PBS 缓冲液洗涤沉淀两次，重悬于无菌 PBS(pH=7)中并调节菌体浓度至 10^8 CFU/mL。此菌液按照 5%的添加量接种到 MRS (N0)、pH3.0 的 MRS (N1)或含 0.3%胆盐(w/v，Sigma，美国)的 MRS (N1)液体培养基中。37℃放置 4h 后，对不同培养基中植物乳植杆菌 JN-7 的活细胞进行计数。

[0070] 为了检测植物乳植杆菌 JN-7 的胃肠道耐受性，挑取新鲜单菌落接种到 MRS 肉汤中并在 37℃培养 16h。取 5mL 菌液在 12000rpm, 4℃条件下离心 2 分钟。用无菌 PBS(pH=7)洗涤沉淀并重悬至菌体浓度为 10^7CFU/mL。将 100μL 菌悬液加入 900μL 模拟胃液中，模拟胃液由 125mM NaCl、7mM KCl、45mM $NaHCO_3$ 和 3g/L 胃蛋白酶(Sigma，美国)组成，并用 HCl 调节 pH 至 3.0。在 37℃孵育 3 小时后，将 250μL 胃液混合物加入 6mL 模拟肠液中，模拟肠液由 45mM NaCl、1g/L 胰蛋白酶(Sigma，美国)和 3g/L 胆盐(Sigma，美国)组成，pH 值由 NaOH 调节为 8.0，然后在 37℃孵育 3 小时。

[0071] 植物乳植杆菌 JN-7 在酸、胆盐和胃肠道处理下的存活率按下式计算：

[0072] 存活率(%)=(N1÷N0)×100%

[0073] 其中，N1 是 MRS(pH3.0、0.3%胆盐)、或胃肠液共处理 6 小时后的活细胞计数；N0 是 MRS 及胃肠液处理 0h 的活细胞计数。

[0074] 结果显示，植物乳植杆菌 JN-7 在 pH3.0 的 MRS 和 0.3%胆盐的 MRS 中的存活率分别为 28.47%和 44.68%。在模拟胃液中评估 JN-7 在胃肠液中的存活能力 3 小时，然后在模拟肠液中评估 3 小时。处理 6h 后，JN-7 的活细胞数减少至处理前的 12.32%。

[0075] 3) 对抗生素的敏感性和 MIC

[0076] 选用庆大霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素、四环素、红霉素和克林霉素 7 种临床常用抗生素对菌株进行抗生素敏感性分析，分别配制 256 mg/L 的抗生素母液并进行两倍稀释，将培养 16 h 后的新鲜菌液 OD 稀释至 0.0002，最终以 1：1 的接种量接种至上述不同浓度抗生素溶液中。37℃培养 24h 后观察结果，确定最小抑制浓度(MIC)，以欧洲食品安全局(EFSA)制定的细菌对抗生素抗性的规定为标准进行比较评定。

[0077] 氨苄青霉素、庆大霉素、卡那霉素、红霉素、克林霉素、四环素和氯霉素对植物乳植杆菌 JN-7 的 MIC 见表 2。结果显示，所有 7 种抗生素的 MIC 值均低于 EFSA 指南规定的抗生素临界值，表明该菌株对抗生素是不耐药的，具备抗生素安全性。

[0078]

[0079] 表 2 不同抗生素对植物乳植杆菌 JN-7 的 MIC(mg/L)

氨苄青霉素	庆大霉素	卡那霉素	红霉素	克林霉素	四环素	氯霉素
1	8	64	1	1	16	4

[0080] 4) 溶血活性

[0081] 不存在溶血活性和抗生素耐药性被认为是选择益生菌菌株的安全先决条件(FAO/WHO，2002)。

[0082] 将活化两代后的植物乳植杆菌 JN-7 划线于含 5%脱纤维羊血的哥伦比亚血琼脂培养基(3400071，Haibo Co., China)，37℃培养 48 小时，若出现草绿色溶血环，即为α-溶血；若出现无色透明的溶血环，即为β-溶血；若无溶血环，即为γ-溶血。

[0083] 结果如图 3 所示，植物乳植杆菌 JN-7 在血琼脂上培养后，菌落周围无溶血环出现，为γ-溶血。由此说明，植物乳植杆菌 JN-7 无溶血能力。

[0084] 5) D-乳酸、L-乳酸的产生及 L-乳酸/D-乳酸比的分析

[0085] 挑取新鲜单菌落在 MRS 肉汤中 37℃培养 18 小时。使用 D,L-乳酸市售定量试剂盒(Jingmei Co.，中国)按照制造商的方案，通过酶法对培养物上清液进行 D,L-乳酸分析。

[0086] 在 37℃的 MRS 肉汤中培养菌株 18 小时后，对植物乳植杆菌 JN-7 产生的 D-乳酸和 L-乳酸进行了分析。JN-7 发酵过程中产生 1.2nmol/L D-乳酸和 4.28nmol/L L-乳酸。L-乳酸/D-乳酸比为 3.57，见表 3。

[0087] 表 3 D-乳酸、L-乳酸含量及 L-乳酸/D-乳酸比

名称	**D-乳酸(nmol/L)**	**L-乳酸(nmol/L)**	**L/D 乳酸比**
JN-7	1.20	4.28	3.57

[0088] 6) 生物胺检测

[0089] 将菌株在 MRS 液体培养基中培养过夜，分别添加至含有 0.1g/L 的组氨酸、酪氨酸、鸟氨酸、赖氨酸和 0.05g/L 吡哆醛-5-磷酸的 MRS 液体培养基中至终浓度为 OD 0.01 并进行传代，每 24 h 传代一次，共五次。上述液体培养基按 2%接种量相应地接种于含 1%组胺、酪氨酸、尸胺和腐胺的 MRS 培养基中培养 72h 并观察培养基的颜色变化。若培养基颜色变为紫色则为阳性，若培养基变为黄色则为阴性。鼠李糖乳酪杆菌 LGG 为阴性对照，大肠杆菌做为阳性对照。

[0090] 结果显示，JN-7 在四种生物胺检测培养基中生长三天后均呈黄色，则表示该菌株不产生腐胺、尸胺、组胺和酪胺。

[0091] 7) API 50CH 糖发酵实验

[0092] 将培养 16h 的新鲜菌液于 12000rpm 转速下离心 2min。弃上清，将沉淀用无菌 PBS 进行两次洗涤，后重新悬浮于无菌 PBS 中，调整 OD 至 0.3，为菌液 a。取 1mL 菌液 a 至 10mL 的 50CHL 培养基 (50410, API, 法国) ，为菌液 b。在 50CH 试条 (50300, API, 法国) 试孔中依次加入 150 μL 菌液 b，置于 37℃培养 48h。通过颜色变化来判定结果，与对照组相比颜色为黄色代表阳性(其中七叶苷阳性为紫色)，未发生变化记录为阴性。

[0093] 结果显示，植物乳植杆菌 JN-7 能代谢 D-核糖(5)、D-半乳糖(10)、D-葡萄糖(11)、D-果糖(12)、D-甘露醇(13)、甘露醇(18)、山梨醇(19)、甲基-α-D-吡喃甘露糖苷(20)、N-乙酰葡萄糖胺(22)、苦杏仁苷(23)、熊果苷(24)、七叶苷(25)、水杨苷(26)、D-纤维二糖(27)、D-麦芽糖(28)、D-乳糖(29)、D-密二糖(30)、D-蔗糖(31)、D-海藻糖(32)、D-松三糖(34)、

D-棉子糖(35)、D-龙胆二糖(39)、D-土伦糖(40)、D-塔格糖(42)和葡萄糖酸钾(47)，并发酵产酸。

[0094] 实施例 3. 植物乳植杆菌 JN-7 的细胞毒性和黏附性

[0095] 实验方法：

[0096] HT-29 细胞的培养

[0097] HT-29 是人肠上皮细胞系细胞，用来进行细菌的细胞毒性和黏附性测试。HT-29 用含 10%FBS 和 1%P/S(青霉素/链霉素)的 RPMI 1640 培养基培养。在含 5%CO_2，37℃培养箱中培养约 36h-72h，细胞密度达到 90%左右，用胰酶消化传代种板。

[0098] 细胞活性检测

[0099] CCK-8 是一种通用的检测细胞增殖、毒性的方法。本实验检测 HT-29 细胞增殖活性使用 CCK-8 试剂盒（C0037，碧云天）。细胞计数按合适的密度接种到 96 孔板，加入总体积 1/10 的 CCK-8 溶液，避光孵育，在 37℃孵育 2 小时，排出气泡，酶标仪测量 450 nm 处的 OD 值。

[0100] 黏附性检测

[0101] 将 HT-29 细胞以 5×10^5 个细胞/mL 的浓度从培养瓶接种至 24 孔板中，换成不含抗生素的培养基培养，待细胞贴壁完全后可进行实验。添加细菌之前，用无菌 PBS 洗涤孔板中细胞两次，再向每个孔中加 500 μL 浓度为 10^8 CFU/mL(V_0)的细菌。将 24 孔板转移至 37℃的 5%CO_2 培养箱中培养 4h 使其黏附。PBS 溶液洗涤每孔细胞 5 次，以洗脱没有黏附的细菌和代谢分泌物。每个孔中加入 200μL 的 1% Triton X-100 进行消化，然后收集每孔内溶液进行梯度稀释并计数(V_1)。黏附率(%)计算方法如下：

[0102] 黏附率(%)=(V_1/V_0)×100%

[0103] 为了评估植物乳植杆菌 JN-7 对 HT-29 肠上皮细胞的潜在细胞毒性作用，在与植物乳植杆菌 JN-7 细菌细胞共培养 18 小时后进行 CCK-8 测定。该试验的感染倍数(MOI)约为 1:200。如图 4 中的 a 所示，在该 MOI 下植物乳植杆菌 JN-7 对肠上皮细胞的存活无影响。将植物乳植杆菌 JN-7 的黏附能力与商业益生菌鼠李糖乳杆菌(LGG)的黏附能力进行比较(图 4 中的 b)。结果显示，LGG 黏附细胞的效率是 JN-7 的两倍。

[0104] 实施例 4. 植物乳植杆菌 JN-7 的抗炎作用

[0105] 实验方法：

[0106] THP-1 的培养及处理

[0107] THP-1 是人单核白血病细胞，可在佛波酯(PMA)诱导下分化成为巨噬细胞，用来进行细菌抗炎作用的检测。THP-1 用含 10% FBS 和 1% P/S 的 RPMI 1640 培养基培养。在含 5% CO_2，37℃培养箱中培养，细胞密度达到至 8-10×10^5 个细胞/mL 时进行传代，细胞正常状态为悬浮生长可进行半培养基传代。

[0108] 将 THP-1 细胞以 5×10^5 个细胞/mL 种于 6 孔板中，在 37℃的 CO_2 培养箱过夜培养。添加浓度为 100 ng/mL 的 PMA 诱导分化细胞，48h 后细胞贴壁形状为梭形或多边形，分化成巨噬细胞。

[0109] 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

[0110] 根据制造商的说明，使用 Trizol 试剂（R701-01-AA，诺唯赞）从细胞中分离总 mRNA。使用 HiScript II select qRT supermix（R222-01，诺唯赞）在含有 1μg RNA 的 20 μL 终体积中进行逆转录(Reverse transcription PCR，RT-PCR)。使用基因特异性引物和

SYBR Green （Q712-02，诺唯赞）在实时荧光定量 PCR (quantitative Real-timePCR, qRT-PCR)检测系统上进行 qRT-PCR。所有引物均由我们自己设计并在金唯智生物科技有限公司(中国北京)合成。以 β-actin 为参考基因，采用 2-ΔΔt 方法进行数据分析。

[0111] 具体操作步骤如下：

[0112] RNA 的提取：(1)收集细胞于 1.5 mL 无酶 EP 管中，加入 200μL Trizol 试剂，匀浆充分裂解细胞。室温孵育 5min 后，4℃，12000rpm 离心 5min。(2)转移上清至新 EP 管中，加入 4/5 体积的异丙醇，上下颠倒摇晃 10 次以充分混匀后室温下静置 10 min。(3) 4℃，12000rpm 离心 10 min，弃上清，出现白色羽毛状沉淀即为 RNA，用 800μL 含 75%乙醇的 DEPC 水洗涤两次，弃上清，挥干沉淀，用 20μL 的 DEPC 水于冰上溶解沉淀即得 RNA。(4)用 NanoDrop 微量分光光度计测定 RNA 的浓度。

[0113] RT-PCR 合成 cDNA：用诺唯赞的 RT-PCR 试剂盒(HiScript II Q RT SuperMix for qPCR)合成 cDNA。

[0114] 表 4 配制第一链 cDNA 合成反应液

试剂	体积
RNase-free ddH_2O	to 20 μL
5×HiScript II qRT SuperMix	4 μL
Total RNA	1μg/定量浓度

[0115] 轻轻混匀后 500rpm，离心 1min 至底部。

[0116] 表 5 按下列条件进行第一链 cDNA 合成反应

50℃	15 min
85℃	5 sec

[0117] 得到的 20μL 产物可立即用于 qRT-PCR 反应，或者在-20℃保存(半年内可用)；长期存放建议分装后在-80℃保存并避免反复冻融。

[0118] qRT-PCR：

[0119] 表 6 共 20μL 反应体系如下：

试剂	**体积**
2× Taq Pro SYBR Green PCR Mix	10 μL
正向引物(10 μM)	0.4 μL
反向引物(10 μM)	0.4 μL
cDNA	1 μL
ddH2O	8.2 μL

[0120] 轻弹混匀后将液体离心至底部，于实时荧光定量 PCR 仪上扩增。

[0121] 反应条件为 94℃持续 30 s；94℃持续 5 s；60℃持续 30 s，反复 40 个循环。Bio-Rad CFX Manager Software 自动记录扩增数据及溶解曲线等，扩增数据以 threshold cycle(CT 值)表示，采用 2-ΔΔt 方法进行数据分析。引物序列（SEQ ID NO:4-11）如下表所示。

[0122] 表 7 引物序列

基因名称	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')
IL-6	AGACAGCCACTCACCTCTTCAG	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG
IL-8	GAGAGTGATTGAGAGTGGACCAC	CACAACCCTCTGCACCCAGTTT
IL-10	TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA	TCAGACAAGGCTTGGCAACCCA
β-actin	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT

[0123] JN-7 对 LPS 刺激的 PMA 分化的 THP-1 细胞的抗炎作用

[0124] JN-7 下调 LPS 刺激的细胞促炎因子 mRNA 的表达(如图 5)。将 JN-7 和 LGG 分别与 THP-1 分化形成的巨噬细胞共培养，通过检测促炎因子 IL-6、IL-8 和抗炎细胞因子 IL-10 mRNA 的表达水平，评价菌株的抗炎作用。与 LPS 刺激对照组相比，LPS 刺激后含 JN-7 和 LGG 的细胞 IL-6、IL-8 mRNA 表达降低，IL-10 mRNA 表达升高。此外，LGG 对 LPS 刺激的 IL-8 mRNA 表达下调效果优于 JN-7。JN-7 促进 IL-10 释放的能力高于 LGG，提示 JN-7 与 LGG 一样具有抗炎作用。

[0125] **实施例 5. 植物乳植杆菌 JN-7 菌粉生产及稳定性分析**

[0126] 1) JN-7 发酵及菌粉生产

[0127] 将植物乳植杆菌 JN-7 接种于 MRS 肉汤中，37℃培养 18h，活化两次并在 5L 生物反应器(BioFlo®320，Eppendorf)中培养 12 小时。发酵结束后，在 4℃、10000rpm、10 min 收集菌体。所得菌体与保护剂(1-10 g/L 多聚糖、20-50 g/L 二糖、1-20 g/L 维生素 C 或其盐类物质、及 1-10 g/L 蛋白胨)混合，并在-80℃条件下预冻 24 小时。将菌粉经真空冷冻干燥机(PO14416，Telstar LyoQuest-55plus)冷冻干燥并粉碎成粉末后，真空包装于铝箔袋中。

[0128] 在 5L 生物反应器中发酵 12 小时离心后共收集 41.5g 植物乳植杆菌沉淀。将沉淀与保护剂混合，并将混合物冷冻干燥，产生 6.6g 菌粉，其活细胞数为 7.07×10^{11}CFU/g。

[0129] 2) 植物乳植杆菌 JN-7 菌粉稳定性的评价

[0130] 将包装好的植物乳植杆菌装入铝箔袋中植物乳植杆菌 JN-7 菌粉保存在 40℃、75%湿度的恒湿箱中进行加速试验，同时用市售的鼠李糖乳酪杆菌 LGG 菌粉及 15 株同样分离自发酵蔬菜的植物乳植杆菌（菌粉生产过程同 JN-7）在同样温度和湿度下储藏做对照，在 90 天内取样 JN-7 菌粉、LGG 菌粉以及 15 株植物乳植杆菌菌粉，按照国标 GB 4789.35 检测菌粉中乳酸菌数量并测定菌粉的水分活度。

[0131] 储存期间植物乳植杆菌 JN-7(图 6A)，鼠李糖乳酪杆菌 LGG(图 6B)及其他 15 株植物乳植杆菌菌粉(图 6C)的活细胞计数和水活度，见图 6A-图 6C。从图中可知，JN-7 菌粉的稳定性要显著高于另外 16 种菌粉。JN-7 70 天内活细胞从 7.07×10^{11} 减少到 1.73×10^{11}CFU/g，相应的水活度从 0.024 增加到 0.053。对照组 LGG 70 天内活细胞从 3.53×10^{11} 减少到 3.92×10^{8}CFU/g，相应的水活度从 0.091 增加到 0.134。通过 70 天的测试，对 JN-7 活细菌的减少进行了线性拟合(r^2=0.80)。通过拟合可以预测，在加速稳定性试验条件下，活菌数减少 1 个 log 所需时间为 136.99 天，比起拟合预测 LGG 所需的 24.63 天延长了 112.36 天。

[0132] 总的来说，本申请从自然发酵产品中分离并鉴定出一种植物乳植杆菌 JN-7。经过全基因组测序并与 NCBI 可检索到的所有植物乳植杆菌基因组进行比较，我们发现菌株植物乳植杆菌 JN-7 是一个新菌株。通过该菌株的基本特性分析(生长曲线、耐酸性、耐胆盐、耐胃肠液)、安全性评价(抗生素敏感性、溶血能力、产毒能力、细胞毒性)、黏附性评价、抗炎作用评价、生产性能评价(发酵产率和冻干产率)和稳定性测试(加速储存稳定性试验)，发现植物乳植杆菌 JN-7 是安全菌株，具有优良的生产性能、高稳定性和抗炎功效。

权 利 要 求 书

1. 一种植物乳植杆菌 JN-7，其中，所述植物乳植杆菌 JN-7 的分类命名为植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)，保藏编号为 CGMCC No.30605。

2. 由权利要求 1 所述的植物乳植杆菌 JN-7 制备得到的菌粉。

3. 权利要求 2 所述的菌粉的制备方法，包括以下步骤：

1)发酵所述植物乳植杆菌 JN-7；

2)将发酵产物离心沉淀，冷冻干燥，即得菌粉。

4. 一种益生菌组合物，包含权利要求 1 所述的植物乳植杆菌 JN-7 或权利要求 2 所述的菌粉。

5. 根据权利要求 4 所述的益生菌组合物，其中，所述益生菌组合物还包含一种或更多种选自以下的益生菌：双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳酪杆菌属(*Lacticaseibacillus*)、粘液乳杆菌属(*Limosilactobacillus*)、乳植杆菌属(*Lactiplantibacillus*)、联合乳杆菌属(*Ligilactobacillus*)、广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、丙酸菌属(*Acidipropionibacterium*)、魏茨曼氏菌属(*Weizmannia*)、动物球菌属(*Mammaliicoccus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和片球菌属(*Pediococcus*)和枯草芽孢杆菌 DE111(*Bacillus subtilis DE111*)。

6. 权利要求 1 所述的植物乳植杆菌 JN-7、权利要求 2 所述的菌粉或权利要求 4 或 5 所述的益生菌组合物在制备抗炎药物中的用途。

7. 根据权利要求 6 所述的用途，其中，所述药物通过口服施用。

8. 权利要求 1 所述的植物乳植杆菌 JN-7、权利要求 2 所述的菌粉或权利要求 4 或 5 所述的益生菌组合物在制备食品或保健品中的用途。

9. 根据权利要求 8 所述的用途，其中，所述食品或保健品为乳制品、豆制品、肉制品、果蔬制品、饮料或零食。

10. 根据权利要求 8 所述的用途，其中，所述食品或保健品还包含食用辅料。