



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104430853 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410751480. 5

C12R 1/245(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 12. 10

(71) 申请人 杭州元佩特生物科技有限公司

地址 310052 浙江省杭州市滨江区建业路  
511 号华业大厦 7 层 739 室

(72) 发明人 吴渊 邓惟 张哲滔

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

A23C 9/127(2006. 01)

C12N 15/03(2006. 01)

C12N 15/01(2006. 01)

C12R 1/07(2006. 01)

权利要求书3页 说明书14页

(54) 发明名称

选育纳豆芽孢杆菌与干酪乳杆菌共发酵制备  
富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种选育纳豆芽孢杆菌与干酪乳杆菌共发酵制备富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法,包括:将产纳豆激酶兼吡咯喹啉醌的纳豆芽孢杆菌 10261 和 10263 分别进行亚硝基胍诱变,然后混合二者诱变后代,进行细胞融合传代培养,高通量筛选得到高产纳豆激酶兼吡咯喹啉醌的纳豆芽孢杆菌;将干酪乳杆菌进行亚硝基胍诱变,从中筛选出甲硫氨酸营养缺陷型的干酪乳杆菌;将筛选出的纳豆芽孢杆菌和干酪乳杆菌共发酵鲜羊乳,得到富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳。本发明得到的富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳中,吡咯喹啉醌含量达到 100-134ng/mL,纳豆激酶活力达到 1725-1900U/mL。

1. 一种选育干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌共发酵制备富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1)、将产纳豆激酶兼吡咯喹啉醌的纳豆芽孢杆菌 10261 和纳豆芽孢杆菌 10263 分别进行亚硝基胍诱变;然后混合二者诱变后代,进行细胞融合传代培养,高通量筛选得到高产纳豆激酶兼吡咯喹啉醌的纳豆芽孢杆菌,命名为纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101;

2)、将干酪乳杆菌进行亚硝基胍诱变,从中筛选出甲硫氨酸营养缺陷型的干酪乳杆菌,命名为干酪乳杆菌 LcS-Met<sup>-</sup>;

3) 将纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101 和干酪乳杆菌 LcS-Met<sup>-</sup>共发酵鲜羊乳,得到富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳。

2. 根据权利要求 1 所述的选育干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌共发酵制备富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法,其特征在于,步骤 1) 中,所述的高通量筛选具体包括:①制备 2 个平板豆芽汁鲜羊乳固体培养基,其中一个将小鼠抗 PQQ IgG 单抗 PQQ-mAb 配入,形成平板 A,另一个将琼脂糖-纤维蛋白配入,形成平板 B;②将纳豆芽孢杆菌 10261 和纳豆芽孢杆菌 10263 的诱变融合后代涂布其中一个平板后,再用纤维素膜影印至另一个平板,使平板 A 和平板 B 互为影印平板;③平板 A 中,高产吡咯喹啉醌的诱变融合后代菌落周围形成肉眼可见沉淀圈,根据沉淀圈直径大小可肉眼判断产吡咯喹啉醌量大小;④平板 B 中,高产纳豆激酶的诱变融合后代菌落周围形成透明圈,根据透明圈直径大小可肉眼判断产纳豆激酶活力高低;⑤平板 A 与平板 B 中,高产吡咯喹啉醌菌落与高产纳豆激酶菌落处于同一位置者,即为高产纳豆激酶兼吡咯喹啉醌的纳豆芽孢杆菌。

3. 根据权利要求 2 所述的选育干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌共发酵制备富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法,其特征在于,步骤 1) 中,所述的平板豆芽汁鲜羊乳固体培养基以 1L 计,由以下量的组分组成:

鲜羊乳	100~150mL;
蔗糖	4.0~6.0g;
琼脂	1.5~2.0g;
豆芽汁	余量。

4. 根据权利要求 1 所述的选育干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌共发酵制备富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法,其特征在于,步骤 2) 中,所述的从中筛选出甲硫氨酸营养缺陷型的干酪乳杆菌,具体包括:①制备 2 个平板 MRS 固体培养基,其中一个将甲硫氨酸配入,为平板 C,另一个为单纯 MRS 固体培养基平板,为平板 D;②将诱变后的干酪乳杆菌涂布其中一个平板后,再用纤维素膜影印至另一个平板,使平板 C 和平板 D 互为影印平板;③在平板 C 与平板 D 的同一位置,平板 C 出现菌落而平板 D 未出现菌落,或平板 C 上的菌落显著大于平板 D 上的菌落,则该菌落为甲硫氨酸营养缺陷型干酪乳杆菌。

5. 根据权利要求 4 所述的选育干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌共发酵制备富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法,其特征在于,步骤 2) 中,所述的平板 MRS 固体培养基以 1L 计,由以下量的组分组成:

蛋白胨	10.0g;
牛肉膏	10.0g;
酵母膏	5.0g;
柠檬酸氢二铵	2.0g;
葡萄糖	20.0g;
乙酸钠	5.0g;
磷酸氢二钾	2.0g;
硫酸镁	0.58g;
硫酸锰	0.25g;
琼脂	20g;
吐温 80	1.0mL;
水	余量;

该 MRS 固体培养基的 pH 值保持在 6.2 ~ 6.4。

6. 根据权利要求 1 所述的选育干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌共发酵制备富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法, 其特征在于, 步骤 3) 中, 在共发酵之前, 将纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101 和干酪乳杆菌 LcS-Met<sup>-</sup> 分别进行活化培养, 纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101 在豆芽汁鲜羊乳液体培养基中进行活化培养, 培养温度为 34 ~ 36℃, 干酪乳杆菌 LcS-Met<sup>-</sup> 在 MRS 液体培养基中进行活化培养, 培养温度为 36 ~ 38℃。

7. 根据权利要求 6 所述的选育干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌共发酵制备富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法, 其特征在于, 步骤 3) 中, 所述的豆芽汁鲜羊乳液体培养基以 1L 计, 由以下量的组分组成:

鲜羊乳	100 ~ 150mL;
蔗糖	4.0 ~ 6.0g;
豆芽汁	余量;

所述的 MRS 液体培养基以 1L 计, 由以下量的组分组成:

蛋白胨	10.0g;
牛肉膏	10.0g;
酵母膏	5.0g;
柠檬酸氢二铵	2.0g;
葡萄糖	20.0g;
乙酸钠	5.0g;
磷酸氢二钾	2.0g;
硫酸镁	0.58g;
硫酸锰	0.25g;
吐温 80	1.0mL;
水	余量;

该 MRS 液体培养基的 pH 值保持在 6.2 ~ 6.4。

8. 根据权利要求 1 所述的选育干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌共发酵制备富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法, 其特征在于, 步骤 3) 中, 将纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101 和干酪乳杆菌 LcS-Met<sup>-</sup>共发酵鲜羊乳, 具体包括: 将活化后的纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101 和干酪乳杆菌 LcS-Met<sup>-</sup>混合, 形成混合菌液, 将混合菌液接种至含鲜羊乳的发酵培养基, 纱布封口培养后得到富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳。

9. 根据权利要求 8 所述的选育干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌共发酵制备富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法, 其特征在于, 步骤 3) 中, 所述的含鲜羊乳的发酵培养基以 1L 计, 由以下量的组分组成:

蔗糖	50.0g;
酪氨酸	0.5g;
谷氨酸	0.5g;
麦芽糖	20.0g;
豆芽汁	100mL;
鲜羊乳	余量。

10. 根据权利要求 8 所述的选育纳豆芽孢杆菌与干酪乳杆菌共发酵制备富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法, 其特征在于, 步骤 3) 中, 所述混合菌液中的纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101 和干酪乳杆菌 LcS-Met<sup>-</sup>的菌数密度比为 1:2 ~ 1:5;

所述的混合菌液接种至含鲜羊乳的发酵培养基的接种量为 1% ~ 5%;

所述的纱布封口培养的条件为: 37℃ ~ 42℃ 六层纱布封口培养 24h ~ 36h。

## 选育纳豆芽孢杆菌与干酪乳杆菌共发酵制备富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌的发酵羊乳的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物工程与发酵领域,具体涉及一种选育干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌共发酵制备富含纳豆激酶 (NK) 和吡咯喹啉醌 (PQQ) 的发酵羊乳的方法。

### 背景技术

[0002] 纳豆由大豆经纳豆芽孢杆菌 (*Bacillus natto*) 发酵而成,具有多重生理功效:

[0003] ①纳豆对心血管系统的作用:纳豆中一种标志性生理活性物质纳豆激酶 (Nattokinase, NK) 是能够溶解血栓的蛋白质,由 275 个氨基酸残基组成,分子量 27KD 左右,无毒、无副作用,是一种丝氨酸蛋白酶,其溶栓效果甚至超过溶栓制剂尿激酶。纳豆激酶除具有直接溶栓作用外,还具有促进静脉内皮细胞产生纤维蛋白溶酶原激活剂的能力,从而间接表现其溶栓活性。纳豆中亚油酸占全脂质的 50%,亚油酸能够降低血浆中胆固醇含量,有预防动脉硬化、心脏病和高血压的功效,具有血栓溶解作用;

[0004] ②纳豆对消化系统的作用:大豆蛋白质经纳豆酶的作用转化成可溶性多肽和氨基酸,有利于人体吸收。1g 纳豆中含有 10 亿个以上纳豆菌,纳豆菌繁殖快,能消耗肠道中的氧,可以抑制引起肠内异常发酵的痢疾杆菌等腐败菌,促进乳酸菌繁殖,调节肠内细菌平衡,预防痢疾、肠炎和便秘等。大豆经过纳豆菌发酵蓄积了大量蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、酯酶、纤维素酶和脲酶等酶群,这些生物酶在消化系统中能够有效调理促进消化吸收。纳豆芽孢杆菌在通过分解利用大豆蛋白进行繁殖的过程中,可以产生大量酵素、维生素、多聚谷氨酸和多聚果糖等粘性物质,其被覆在胃肠粘膜表面起到保护作用,饮酒时可缓解酒醉。纳豆菌还能杀死肠道出血性大肠杆菌;

[0005] ③纳豆对免疫系统的作用:通过接种纳豆菌的动物实验发现,纳豆可以提高机体抵抗力,排除侵入的葡萄球菌,还可以诱发机体干扰素生成,增强机体免疫力;纳豆中含有活性物质如皂草甙、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 E 等,每天食用可除去体内致癌物质,预防癌症发生,并可软化血管,促进肌肤光滑;

[0006] ④促进骨骼发育:维生素 K<sub>2</sub> 可促进钙与蛋白质结合从而促进骨骼形成,在骨骼形成过程中起着重要作用,而纳豆中维生素 K<sub>2</sub> 含量是其他发酵食品的数百倍,有预防骨质疏松、腰痛等老年病的功效。

[0007] 近年发现纳豆还具有其它更丰富广泛的生理功效,源于其另一种标志性生理活性物质——吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone, PQQ),它是继黄素核苷酸和烟酰胺核苷酸之后在细菌脱氢酶中发现的第三种辅基,化学名称为 4,5- 二氢 -4,5- 二氧化 -1- 氢吡咯 (2,3f) 醛 -2,7,9- 三羧酸,又名 Methaxatin。虽然自然条件下仅少数细菌如 *Methylorovorus*、*Deinococcus radiodurans*、*Gluconobacter oxydans*、*Klebsiella pneumoniae* 等能够合成 PQQ,但在各种植物、动物以及人体内都发现含有微量 PQQ。日本科学家测定了 26 种常见食物中的 PQQ 含量,发现 1 克食物中 PQQ 含量在 3.65-61 纳克不等,例如,蔬菜中的欧芹、青椒,水果中的奇异果、木瓜,饮品中的绿茶、乌龙茶,以及人们常吃的豆腐。值得注意的是,日本

传统食物纳豆当中 PQQ 含量最高,达到 61 纳克 / 克。

[0008] PQQ 作为一种普遍存在于动物和植物组织中的氧化还原酶辅基,虽然含量非常低,但作用重要,不仅是一种新发现的线粒体呼吸链组分,参与催化生物体内氧化还原反应,还具有非常多样的生物活性,缺乏时会引起哺乳动物诸多代谢障碍,被认为是一种新型维生素。PQQ 对哺乳动物的主要生理作用有 :

[0009] ①全面提高人体免疫功能 :PQQ 作为人类发育的必要因子,能刺激人体细胞生长,尤其是激活人体 B 细胞、T 细胞,提高人体免疫功能 ;

[0010] ②防治肝损伤 :PQQ 能显著降低血清胆红素和谷丙转氨酶水平,调理肝损伤,对肝脏疾病有极好疗效 ;

[0011] ③减少自由基对人体的伤害 :PQQ 是一种氧化还原酶辅基,参与生物体内氧化还原反应,能有效清除体内自由基,减少自由基对人体伤害所引发的各种疾病,如心脏病、癌症以及各类炎症 ;

[0012] ④调理各种神经系统疾病 :PQQ 在体内能促进神经因子合成,调理各种神经系统疾病 ;

[0013] ⑤促进氨基酸吸收 :PQQ 是酰蛋白酶的辅基,参与呼吸链电子传递,在人体内能促进氨基酸吸收 ;

[0014] ⑥促进生长因子合成 :生长因子是人类生长的激素, PQQ 能刺激人体细胞生长,增加细胞密度,微量 PQQ 就能提高生物体组织的代谢能力和生长机能 ;

[0015] ⑦防治老年痴呆症 :PQQ 具有修复神经纤维、活化神经元、激活休眠神经细胞的能力,能有效防治老年痴呆症和改善记忆力 ;

[0016] ⑧促进谷胱甘肽合成 :谷胱甘肽具有重要抗氧化作用和整合解毒作用, PQQ 能促进机体谷胱甘肽合成,防止白内障发生和肝脏胆红素积累 ;

[0017] ⑨极强的抗癌功能 :PQQ 激活自然杀伤细胞 (NK) 细胞为 ANK 细胞,使其具有杀肿瘤作用 ;使 NK 细胞等免疫细胞聚集,更有效地杀灭肿瘤细胞 ;封闭肿瘤细胞载铁蛋白受体,阻断其功能,抑制肿瘤生长、转移 ;破坏肿瘤细胞脂质双层,使肿瘤细胞溶解死亡 ;阻止肿瘤细胞 DNA 复制,促其凋亡。

[0018] 在天然食品中,纳豆独有 NK,并且 PQQ 含量最丰富。纳豆中的 NK 和 PQQ 由纳豆芽孢杆菌产生。纳豆是日常健康食品,纳豆芽孢杆菌是公认安全的食品级微生物 (GRAS 微生物),对纳豆芽孢杆菌进行定向选育,然后与乳酸菌共发酵,制备富含 NK 和 PQQ 的食品,对于人们在日常饮食中补充 NK 和 PQQ、充分发挥 NK 和 PQQ 的生理调理作用具有重要意义。

[0019] 羊乳是最接近人乳的高营养乳品。羊乳蛋白质主要是酪蛋白和乳清蛋白,与牛乳相比,羊乳酪蛋白含量低而乳清蛋白含量高,与人乳接近,而酪蛋白在胃酸作用下可形成较大凝固物,其含量越高蛋白质消化越低,所以羊乳蛋白质消化率比牛乳高 ;羊乳脂肪含量为 3.6% -4.5%,脂肪球直径 2 微米左右,而牛乳脂肪球直径为 3-4 微米,羊乳脂肪球直径小使其更容易消化吸收 ;羊乳还富含短链脂肪酸,低级挥发性脂肪酸占所有脂肪酸含量的 25% 左右,而牛乳中则不到 10% ;羊乳中还含有丰富矿物质和维生素,钙、磷、钾、镁、氯和锰等含量均比牛乳高,每 100 克羊乳所含 10 种主要维生素总量为 780 微克,其中维生素 A、维生素 B1、维生素 B2、维生素 C、泛酸和尼克酸等含量可充分满足婴儿需要 ;羊乳中胆固醇含量较低,每 100 克羊乳胆固醇含量为 10-13 毫克,对降低人动脉硬化和高血压发生有一定意义。

[0020] 酸乳是以鲜乳为原料,经过巴氏杀菌再通过乳酸菌发酵后冷却包装的乳制品。酸乳发酵过程使乳中糖、蛋白质有 20% 左右被水解成为小分子(如半乳糖和乳酸、肽和氨基酸等),脂肪酸可比鲜乳增加 2 倍,这些变化使酸乳更易消化和吸收,各种营养素的利用率得以提高,并且在发酵过程中除保留了鲜乳的全部营养成分外,还产生人体营养所必需的诸多维生素。羊乳是优质鲜乳,经乳酸菌发酵后,将进一步形成乳酸菌素、活性脂肪酸、以乳酸为主的有机酸等诸多食疗物质。

[0021] 乳酸菌发酵除能产生诸多食疗成分外,还能赋予怡人的甜酸口感。纳豆芽孢杆菌发酵则能产生 NK 和 PQQ。本发明通过选育纳豆芽孢杆菌和干酪乳杆菌及其共发酵,开发出富含 NK 和 PQQ 的食疗发酵羊乳。

[0022] 但如果干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌在同一体系中生长不平衡会导致一种菌在竞争中排斥另一种,共发酵无法顺利进行。关于生理特性,即使在野生状态下,乳酸菌胞壁蛋白酶 PrtS 也只有少数菌株具有且活力不高,分解羊乳蛋白质获得必需氨基酸的能力不足,而纳豆芽孢杆菌具有较强蛋白酶活力,其分解蛋白质产生氨基酸和肽可满足乳酸菌对氨基酸的需求。纳豆芽孢杆菌兼性厌氧,通过消耗氧气也促进乳酸菌生长和产酸。在本发明中,除了纳豆芽孢杆菌和干酪乳杆菌两者之间存在不严格偏利共生关系外,更通过选育手段使干酪乳杆菌因形成甲硫氨酸营养缺陷 ( $\text{Met}^-$ ) 而与纳豆芽孢杆菌形成严格偏利共生关系,从而保证了干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌的共发酵顺利进行。

[0023] 纳豆芽孢杆菌合成 NK 和 PQQ 的代谢途径迄今尚未完全明了,从而无法通过理性优化手段提高纳豆芽孢杆菌合成 NK 和 PQQ 的产率。而且由于糖、氨基酸、脂类、核苷酸四大有机物代谢之间的相通和密切关联,使得微生物细胞代谢网络既显示出刚性 (Rigidity) 又显示出柔性 (Plasticity),处于严格控制之中,刚性表现为牵一发而动全身,从而在许多情形下,即使明了代谢途径,定点理性突变也并不能获得理想表型,而柔性表现为对整个代谢网络中处于不同节点但又相关的途径进行协同突变后,会表现出新的代谢属性。欲提高纳豆芽孢杆菌合成 NK 和 PQQ 的产率,不明了其代谢途径并不成为不可逾越的障碍,只要有合适的非理性优化手段 (Unrational optimization technique),对所有可能与 NK 和 PQQ 合成有关的主流及旁支途径统筹优化,实现多位点协同突变,并通过高通量筛选使多位点协同突变的表型从突变库中凸显,即可实现提高纳豆芽孢杆菌合成 NK 和 PQQ 产率的目标。

[0024] 随机突变是最常见的非理性优化手段,虽然它能够产生突变位点数量足够大的突变库,但在突变库中,各突变位点往往是分散独立于单个细胞中,相互之间无法优化组合,而且大多不产生可见表型,从而使得绝大多数突变隐没于突变库中而不能得到筛选。

[0025] 基因组重排 (Genome Shuffling) 是在随机突变的基础上发展起来的新型诱变育种技术。它是在通过随机突变产生突变位点数量足够大的突变库的基础上,进一步通过细胞融合使各突变位点优化组合,从而使突变指数级上升特别是增加大量表型可见突变。基因组重排为利用微生物代谢网络这种柔性进行多点协同突变的菌种选育提供了技术支撑。Zhang 等 (2002) 首先以传统诱变方法获得一个突变库,筛选出若干个正向突变株作为出发株,然后通过多轮递推原生质体融合的方式使众多基因随机重组,实现基因组重排,最终从突变库中筛选出性状被提升的目的菌株;Stephanopoulos (2002) 通过基因组重排改造了细菌表型;Patnaik 等 (2002) 利用基因组产品技术实现了乳酸杆菌的一株工业菌株的改良,令其在 pH 4.0 下乳酸产量为出发野生菌株的 3 倍;Gao 等 (2012) 通过两轮基因

组重排,使 *Clostridium acetobutylicum* CICC 8012 产 Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) 提高了 34.53%;Ge 等 (2012) 通过基因组重排获得 *Saccharomyces cerevisiae* GS3-10, 其对五碳糖和六碳糖的转化率达到 69.48% 和 100%, 而出发菌株为 14.83% 和 100%, 乙醇产率达到 47.08g/L, 而出发菌株为 18.12g/L;Kang 等 (2011) 通过基因组重排, 使 *Aureobasidium pullulans* 产普鲁蓝多糖大幅度提高, 并且遗传稳定;Zheng 等 (2010) 通过基因组重排提高了 *Sporolactobacillus inulinus* ATCC 15538 的 D- 乳酸产率和耐酸性;John 等 (2008) 通过原生质体融合式的基因组重排, 获得了以木薯 - 甘蔗渣为基质的乳酸高产菌株;Yu 等 (2008) 通过基因组重排获得了糖耐度提高从而乳酸产率增加的 *Lactobacillus rhamnosus*;Wang 等 (2007) 通过基因组重排获得了耐酸度提高从而乳酸产率增加的 *Lactobacillus rhamnosus*。

[0026] 基因组重排也为进行微生物代谢组学分析提供了支撑。经过基因组重排而代谢优化的目的菌其遗传背景来源于出发菌, 故通过比对目的菌与出发菌的蛋白表达谱差异, 辅以代谢流和代谢控制分析技术, 即可解析导致代谢优化的关键酶及有关途径的调控机制。Luo 等 (2012) 通过基因组重排使 *Streptomyces gilvosporeus* ATCC 13326 的游霉素 (natamycin) 产率明显升高, *Streptomyces gilvosporeus* ATCC 13326 的蛋白表达谱发生明显改变, 34 种蛋白表达上升而 20 种蛋白表达下降, 提示与游霉素合成有关的牵涉广泛的代谢网络得到优化;Zhang 等 (2010) 通过基因组重排, 使 *Propionibacterium shermanii* 产  $V_{B12}$  大幅度提高, 重排后菌株 38 种蛋白表达发生改变, 其中 22 种蛋白表达上升而 16 种蛋白表达下降, 在表达上升的 22 种蛋白中, 有 6 种是  $V_{B12}$  合成途径中的酶, 提示与  $V_{B12}$  合成有关的牵涉广泛的代谢网络得到优化。

[0027] 但目前基因组重排在策略上存在一定缺陷, 主要是选育培养基与发酵培养基之间无关联, 使得选育到的菌株在发酵时目标产物产率远低于预期。针对此问题, 本发明在进行基因组重排选育时, 选育平板中添加一定比例的发酵培养基组分, 而发酵培养基中添加一定比例的选育平板组分, 使得选育与发酵两环节之间形成关联, 保障了选育环节表现出高产表型的菌株在发酵时依然表现出高产表型, 此即为本发明的底物诱导适应性策略。因此, 在对纳豆芽孢杆菌高产 NK 兼 PQQ 表型进行基因组重排选育时, 在选育平板中添加一定比例鲜羊乳, 而在羊乳发酵时则添加一定比例豆芽汁。

## 发明内容

[0028] 本发明提供了一种选育干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌共发酵制备富含纳豆激酶 (NK) 和吡咯喹啉醌 (PQQ) 的发酵羊乳的方法。本发明在基因组重排技术基础上进一步采用底物诱导适应性策略, 对纳豆芽孢杆菌所有可能与 NK 和 PQQ 合成有关的主流及旁支途径统筹优化, 实现多位点协同突变, 进而通过高通量筛选使多位点协同突变的表型从突变库中凸显, 获得能够在羊乳发酵中高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101。同时, 通过随机诱变获得甲硫氨酸营养缺陷 ( $Met^-$ ) 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei* Shirota- $Met^-$ , *LcS-Met^-*)。*LcS-Met^-* 在生长速度上高于 BN-NKPQQ-RWX-101, 但前者对后者营养依赖, 两者之间形成稳定共生关系, 保障了共发酵顺利完成, 从而获得富含 NK 和 PQQ 的发酵羊乳。

[0029] 一种选育干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌共发酵制备富含纳豆激酶 (NK) 和吡咯

喹啉醌 (PQQ) 的发酵羊乳的方法,包括以下步骤:

[0030] 1)、将产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌 10261 和纳豆芽孢杆菌 10263 分别进行亚硝基胍诱变;然后混合二者诱变后代,进行细胞融合传代培养,在基因组重排技术基础上进一步采用底物诱导适应性策略,高通量筛选得到高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌,命名为纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101;

[0031] 细胞融合传代培养实现基因组改组,使纳豆芽孢杆菌 10261 和 10263 所有诱变后代的优势突变得到优化整合。如有必要,可对融合后代进行第二轮或者多轮诱变及融合,直至选育出 NK 兼 PQQ 产率高且生长旺盛、遗传稳定、适合作为生产菌株的高产 NK 兼 PQQ 纳豆芽孢杆菌。

[0032] 2)、将干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei* Shirota) 进行亚硝基胍诱变,从中筛选出甲硫氨酸营养缺陷型的干酪乳杆菌,命名为干酪乳杆菌 LcS-Met<sup>-</sup> (*Lactobacillus casei* Shirota-Met<sup>-</sup>);

[0033] 3) 将纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101 和干酪乳杆菌 LcS-Met<sup>-</sup> 共发酵鲜羊乳,得到富含 NK 和 PQQ 的发酵羊乳。

[0034] 本发明在基因组重排技术基础上进一步采用底物诱导适应性策略,对纳豆芽孢杆菌所有可能与 NK 和 PQQ 合成有关的主流及旁支途径统筹优化,实现多位点协同突变,进而通过高通量筛选使多位点协同突变的表型从突变库中凸显,获得能够在羊乳发酵中高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101。同时,通过随机诱变获得甲硫氨酸营养缺陷 (Met<sup>-</sup>) 干酪乳杆菌 LcS-Met<sup>-</sup>。

[0035] 欲使干酪乳杆菌与纳豆芽孢杆菌顺利共发酵,两者之间应形成共生关系。本发明的策略是使通常情况下竞争占优的干酪乳杆菌成为甲硫氨酸营养缺陷 (LcS-Met<sup>-</sup>),从而在代谢上对纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101 形成依赖,其所需要的甲硫氨酸 (Met) 由纳豆芽孢杆菌供给,即形成严格的偏利共生关系。虽然 LcS-Met<sup>-</sup> 在生长速度上高于 BN-NKPQQ-RWX-101,但前者对后者营养依赖,两菌之间形成稳定共生关系,保障了共发酵顺利完成,从而获得富含 NK 和 PQQ 的发酵羊乳。

[0036] 所用纳豆芽孢杆菌和干酪乳杆菌均属于食品级安全微生物,共发酵得到的富含 NK 和 PQQ 的发酵羊乳中, PQQ 含量达到 100-134ng/mL, 高于天然食品中含量最高的纳豆 (55-63ng/mL) 和豆腐 (25-30ng/mL), 与人乳中 (140-180ng/mL) 相当。NK 活力达到 1725-1900U/mL。所获得的发酵羊乳除富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌之外, 呈均一乳白色, 组织细腻均匀, 略有乳清析出, 并具有酸乳固有的滋味及羊乳特有的风味。

[0037] 步骤 1) 中, 纳豆芽孢杆菌 10261 和纳豆芽孢杆菌 10263 采用现有技术, 纳豆芽孢杆菌 10261 来自中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC), 地址: 北京市朝阳区酒仙桥中路 24 号院 6 号楼; 保藏日期为 2002 年, 菌种保持编号为 10261; 纳豆芽孢杆菌 10263 来自中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC), 地址: 北京市朝阳区酒仙桥中路 24 号院 6 号楼; 保藏日期为 2002 年, 菌种保持编号为 10263; 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei* Shirota) 来自养乐多 (上海) 有限公司; 小鼠抗 PQQ IgG 单抗 PQQ-mAb 采用市售产品, 购自嘉兴元科生物科技有限公司, 商品号为 YK-Ab-013。

[0038] 所述的底物诱导适应性基因组重排后的高通量筛选具体包括: ① 制备 2 个平板豆芽汁鲜羊乳固体培养基 (鲜羊乳占平板总量的 10% -15%), 使得选育培养基与发酵培养基

之间发生关联,此即为本发明的底物诱导适应性策略),其中一个将小鼠抗 PQQ IgG 单抗 PQQ-mAb 配入,形成平板 A,另一个将琼脂糖-纤维蛋白配入,形成平板 B;②将纳豆芽孢杆菌 10261 和纳豆芽孢杆菌 10263 的诱变融合后代涂布其中一个平板后,再用纤维素膜影印至另一个平板,使平板 A 和平板 B 互为影印平板;③平板 A 中,高产 PQQ 诱变融合后代菌落周围形成肉眼可见沉淀线,根据沉淀圈直径大小可肉眼判断产 PQQ 量大小;④平板 B 中,高产 NK 诱变融合后代菌落周围形成透明圈,根据透明圈直径大小可肉眼判断产 NK 活力高低;⑤平板 A 与平板 B 中,高产 PQQ 菌落与高产 NK 菌落处于同一位置者,即为高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌。

[0039] 所获得的高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101 保藏于斜面豆芽汁鲜羊乳固体培养基中。

[0040] 所述的平板豆芽汁鲜羊乳固体培养基和斜面豆芽汁鲜羊乳固体培养基以 1L 计,由以下量的组分组成:

[0041]

鲜羊乳	100~150mL;
蔗糖	4.0~6.0g;
琼脂	1.5~2.0g;
豆芽汁	余量。

[0042] 进一步优选,所述的平板豆芽汁鲜羊乳固体培养基和斜面豆芽汁鲜羊乳固体培养基以 1L 计,由以下量的组分组成:

[0043]

鲜羊乳	100~150mL;
蔗糖	5.0g;
琼脂	1.5~2.0g;
豆芽汁	余量。

[0044] 所述的豆芽汁的制备:刚出芽的大豆 500g,加水 2500mL,煮沸浓缩至 1000mL 后过滤,得到豆芽汁。

[0045] 该平板豆芽汁鲜羊乳固体培养基的配方有利于纳豆芽孢杆菌菌落形成和高通量筛选。该斜面豆芽汁鲜羊乳固体培养基的配方有利于纳豆芽孢杆菌保藏。

[0046] 本发明中,采用基因组重排技术选育纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101 时,选育平板中添加一定比例的发酵培养基组分(鲜羊乳),而发酵培养基中添加一定比例的选育平板组分(豆芽汁),使得选育与发酵两环节之间形成关联,促使选育环节表现出高产表型的菌株在发酵时依然表现出高产表型,此即为本发明的底物诱导适应性策略。

[0047] 步骤 2) 中,所述的从中筛选出甲硫氨酸营养缺陷型的干酪乳杆菌,具体包括:①制备 2 个平板 MRS 固体培养基,其中一个将甲硫氨酸(Met)配入(Met 添加量为 10~15mg/L),为平板 C,另一个为单纯 MRS 固体培养基平板(平板 D),为平板 D;②将诱变后的干酪乳杆菌(Lactobacillus casei Shirota)涂布其中一个平板后,再用纤维素膜影印至另一个平板,使平板 C 和平板 D 互为影印平板;③在平板 C 与平板 D 的同一位置,平板 C 出现菌落

而平板 D 未出现菌落,或平板 C 上的菌落显著大于平板 D 上的菌落,则该菌落为甲硫氨酸营养缺陷型干酪乳杆菌,命名为干酪乳杆菌 LcS-Met<sup>-</sup>,保藏于斜面 MRS 固体培养基中。

[0048] 所述的平板 MRS 固体培养基和斜面 MRS 固体培养基以 1L 计,由以下量的组分组成:

[0049]

蛋白胨	10.0g;
牛肉膏	10.0g;
酵母膏	5.0g;
柠檬酸氢二铵	2.0g;
葡萄糖	20.0g;
乙酸钠	5.0g;
磷酸氢二钾	2.0g;
硫酸镁	0.58g;
硫酸锰	0.25g;
琼脂	20g;
吐温 80	1.0mL;
水	余量;

[0050] 该 MRS 固体培养基的 pH 值保持在 6.2 ~ 6.4。

[0051] 该 MRS 固体培养基有利于干酪乳杆菌菌落形成和甲硫氨酸营养缺陷型干酪乳杆菌的筛选。

[0052] 本发明中,采用随机诱变技术获得甲硫氨酸营养缺陷 (Met<sup>-</sup>) 的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei* Shirota-Met<sup>-</sup>, LcS-Met<sup>-</sup>)。LcS-Met<sup>-</sup> 在生长速度上高于 BN-NKPQQ-RWX-101,但前者对后者营养依赖,两者之间形成稳定共生关系,通过构建共生关系的策略实现纳豆芽孢杆菌与干酪乳杆菌的共发酵,获得富含 NK 和 PQQ 的发酵羊乳。

[0053] 步骤 3) 中,在共发酵之前,将 BN-NKPQQ-RWX-101 和 LcS-Met<sup>-</sup> 分别进行活化培养, BN-NKPQQ-RWX-101 在豆芽汁鲜羊乳液体培养基中进行活化培养,培养温度为 34 ~ 36°C (优选 35°C), LcS-Met<sup>-</sup> 在 MRS 液体培养基中进行活化培养,培养温度为 36 ~ 38°C (优选 37°C)。

[0054] 所述的豆芽汁鲜羊乳液体培养基以 1L 计,由以下量的组分组成:

[0055] 鲜羊乳 100 ~ 150mL;

[0056] 蔗糖 4.0 ~ 6.0g;

[0057] 豆芽汁 余量。

[0058] 所述的豆芽汁鲜羊乳液体培养基以 1L 计,优选的,由以下量的组分组成:

[0059] 鲜羊乳 100 ~ 150mL;

[0060] 蔗糖 5.0g;

[0061] 豆芽汁 余量。

[0062] 该豆芽汁鲜羊乳液体培养基的配方有利于纳豆芽孢杆菌增殖培养。豆芽汁制备：刚出芽的大豆 500g, 加水 2500mL, 煮沸浓缩至 1000mL 后过滤, 得到豆芽汁。

[0063] 所述的 MRS 液体培养基以 1L 计, 由以下量的组分组成：

[0064]

蛋白胨	10.0g;
牛肉膏	10.0g;
酵母膏	5.0g;
柠檬酸氢二铵	2.0g;
葡萄糖	20.0g;
乙酸钠	5.0g;
磷酸氢二钾	2.0g;
硫酸镁	0.58g;
硫酸锰	0.25g;
吐温 80	1.0mL;
水	余量;

[0065] 该 MRS 液体培养基的 pH 值保持在 6.2 ~ 6.4。

[0066] 该 MRS 液体培养基有利于干酪乳杆菌增殖培养。

[0067] 将 BN-NKPQQ-RWX-101 和 LcS-Met<sup>-</sup> 共发酵鲜羊乳, 具体包括：将活化后的 BN-NKPQQ-RWX-101 和 LcS-Met<sup>-</sup> 混合, 形成混合菌液, 将混合菌液接种至含鲜羊乳的发酵培养基, 纱布封口培养后得到富含 NK 和 PQQ 的发酵羊乳。

[0068] 所述的含鲜羊乳的发酵培养基以 1L 计, 由以下量的组分组成：

[0069]

蔗糖	50.0g;
酪氨酸	0.5g;
谷氨酸	0.5g;
麦芽糖	20.0g;
豆芽汁	100mL;
鲜羊乳	余量。

[0070] 混合菌液中, 所述的 BN-NKPQQ-RWX-101 和 LcS-Met<sup>-</sup> 的混合密度比为 1:2 ~ 1:5。

[0071] 所述的混合菌液接种至含鲜羊乳的发酵培养基的接种量为 1% ~ 5%。

[0072] 所述的纱布封口培养的条件为：37℃ ~ 42℃ 六层纱布封口培养 24h ~ 36h。

[0073] 共发酵时, 在羊乳发酵培养基 (即含鲜羊乳的发酵培养基) 中, 添加酪氨酸和谷氨酸对 BN-NKPQQ-RWX-101 进行代谢调控, 促进 PQQ 合成, 添加麦芽糖对 BN-NKPQQ-RWX-101 进行代谢调控, 促进 NK 生成, 添加豆芽汁促进 BN-NKPQQ-RWX-101 在羊乳发酵过程中的增殖。本发明中, 纳豆芽孢杆菌与干酪乳杆菌选育及其共发酵制备的发酵羊乳, 富含纳豆激酶和

吡咯喹啉醌，呈均一乳白色，组织细腻均匀，并具有酸乳固有的滋味及羊乳特有的风味。

[0074] 与现有技术相比，本发明具有如下优点：

[0075] 一、本发明使用的纳豆芽孢杆菌和干酪乳杆菌均属于食品级安全微生物。

[0076] 二、首次采用基因组重排技术优化 NK 和 PQQ 合成途径，对纳豆芽孢杆菌所有可能与 NK 和 PQQ 合成有关的主流及旁支途径统筹优化，实现多位点协同突变，进而通过高通量筛选使多位点协同突变的表型从突变库中凸显。同时，在基因组重排技术基础上进一步采用底物诱导适应性策略，保障了选育环节表现出高产表型的菌株在发酵时依然表现出高产表型，获得能够在羊乳发酵中高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101。

[0077] 三、首次采用构建共生关系的策略实现纳豆芽孢杆菌与干酪乳杆菌的共发酵。通过随机诱变获得甲硫氨酸营养缺陷 ( $\text{Met}^-$ ) 干酪乳杆菌  $\text{LcS-Met}^-$ 。 $\text{LcS-Met}^-$  在生长速度上高于 BN-NKPQQ-RWX-101，但前者对后者营养依赖，两者之间形成稳定共生关系，保障了共发酵顺利完成，从而获得富含 NK 和 PQQ 的发酵羊乳。

[0078] 四、从结构上看，PQQ 通过酪氨酸和谷氨酸之间形成肽键连接环化而成。本发明通过在含鲜羊乳的发酵培养基中添加酪氨酸和谷氨酸对 BN-NKPQQ-RWX-101 进行代谢调控，促进 PQQ 合成。通过在含鲜羊乳的发酵培养基中添加麦芽糖对 BN-NKPQQ-RWX-101 进行代谢调控，促进 NK 生成。通过在含鲜羊乳的发酵培养基中添加豆芽汁促进 BN-NKPQQ-RWX-101 在羊乳发酵过程中的增殖，从而得到富含 NK 和 PQQ 的发酵羊乳，PQQ 含量达到 100–134ng/mL，远高于天然食品中含量最高的纳豆 (55–63ng/mL) 和豆腐 (25–30ng/mL)，与人乳中 (140–180ng/mL) 相当。NK 活力达到 1725–1900U/mL。所获得的发酵羊乳除富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌之外，呈均一乳白色，组织细腻均匀，并具有酸乳固有的滋味及羊乳特有的风味。

## 具体实施方式

[0079] 在实施例中，有关培养基配制如下，

[0080] (a) 所述的豆芽汁鲜羊乳液体培养基配制完成后，121℃灭菌 15min，以 1L 计，由以下量的组分组成：

[0081] 鲜羊乳 130mL；

[0082] 蔗糖 5.0g；

[0083] 豆芽汁 余量；

[0084] 该豆芽汁鲜羊乳液体培养基的配方有利于纳豆芽孢杆菌增殖培养。豆芽汁制备：刚出芽的大豆 500g，加水 2500mL，煮沸浓缩至 1000mL 后过滤，得到豆芽汁。

[0085] (b) 所述的豆芽汁鲜羊乳固体培养基 (平板) 配制完成后，121℃灭菌 15min，以 1L 计，由以下量的组分组成：

[0086]

鲜羊乳 130mL；

蔗糖 5.0g；

[0087]

琼脂	1.8g;
豆芽汁	余量;

[0088] 该豆芽汁鲜羊乳固体培养基(平板)的配方有利于纳豆芽孢杆菌菌落形成和高通量筛选。

[0089] (c) 所述的豆芽汁鲜羊乳固体培养基(斜面)配制完成后,121℃灭菌15min,以1L计,由以下量的组分组成:

[0090]

鲜羊乳	130mL;
蔗糖	5.0g;
琼脂	1.8g;
豆芽汁	余量;
倒试管斜面	

[0091] 该豆芽汁鲜羊乳固体培养基(斜面)的配方有利于纳豆芽孢杆菌的保藏。

[0092] (d) 所述的MRS液体培养基配制完成后,121℃灭菌15min,以1L计,由以下量的组分组成:

[0093]

蛋白胨	10.0g;
牛肉膏	10.0g;
酵母膏	5.0g;
柠檬酸氢二铵	2.0g;
葡萄糖	20.0g;
乙酸钠	5.0g;
磷酸氢二钾	2.0g;
硫酸镁	0.58g;
硫酸锰	0.25g;
吐温80	1.0mL;
水	余量;
pH 6.2~6.4	

[0094] 该MRS液体培养基有利于干酪乳杆菌增殖培养。

[0095] (e) 所述的MRS固体培养基(平板)配制完成后,121℃灭菌15min,以1L计,由以下量的组分组成:

[0096]

蛋白胨	10.0g;
牛肉膏	10.0g;
酵母膏	5.0g;

[0097]

柠檬酸氢二铵	2.0g;
葡萄糖	20.0g;
乙酸钠	5.0g;
磷酸氢二钾	2.0g;
硫酸镁	0.58g;
硫酸锰	0.25g;
琼脂	20g;
吐温 80	1.0mL;
水	余量;

pH 6.2~6.4

[0098] 该 MRS 固体培养基有利于干酪乳杆菌菌落形成和筛选。

[0099] (f) 所述的 MRS 固体培养基 (斜面) 配制完成后, 121℃ 灭菌 15min, 以 1L 计, 由以下量的组分组成:

[0100]

蛋白胨	10.0g;
牛肉膏	10.0g;
酵母膏	5.0g;
柠檬酸氢二铵	2.0g;
葡萄糖	20.0g;
乙酸钠	5.0g;
磷酸氢二钾	2.0g;
硫酸镁	0.58g;
硫酸锰	0.25g;
琼脂	20g;
吐温 80	1.0mL;
水	余量;

pH 6.2~6.4

倒试管斜面

[0101] 该 MRS 固体培养基 (斜面) 有利于干酪乳杆菌保藏。

[0102] (g) 所述的含鲜羊乳的发酵培养基以 1L 计, 由以下量的组分组成:

[0103]

蔗糖	50.0g;
酪氨酸	0.5g;
谷氨酸	0.5g;

[0104]

麦芽糖	20.0g;
豆芽汁	100mL;
鲜羊乳	余量。

[0105] 本发明实施例中, 纳豆芽孢杆菌 10261 和纳豆芽孢杆菌 10263 采用现有技术, 纳豆芽孢杆菌 10261 来自中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC), 地址: 北京市朝阳区酒仙桥中路 24 号院 6 号楼; 保藏日期为 2002 年, 菌种保持编号为 10261; 纳豆芽孢杆菌 10263 来自中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC), 地址: 北京市朝阳区酒仙桥中路 24 号院 6 号楼; 保藏日期为 2002 年, 菌种保持编号为 10263; 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei* Shirota) 来自养乐多 (上海) 有限公司; 小鼠抗 PQQ IgG 单抗 PQQ-mAb 采用市售产品, 购自嘉兴元科生物科技有限公司, 商品号为 YK-Ab-013。

[0106] 实施例 1

[0107] 本发明通过纳豆芽孢杆菌与干酪乳杆菌选育及其共发酵制备富含 NK 和 PQQ 的发酵羊乳, 包括以下步骤:

[0108] (1) 高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101 的选育

[0109] 采用底物诱导适应性策略, 通过基因组重排及高通量筛选技术获得高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101, 具体方法为: 首先构建纳豆芽孢杆菌突变库, 将已获得的产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌 10261 和 10263 分别进行亚硝基胍诱变; 然后混合二者诱变后代, 进行细胞融合 (促融剂为聚乙二醇 4000), 传代培养, 实现基因组改组, 使纳豆芽孢杆菌 10261 和 10263 所有诱变后代的优势突变得到优化整合, 选育出 NK 兼 PQQ 产率高且生长旺盛、遗传稳定、适合作为生产菌株的高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌。

[0110] 突变库高通量筛选: ①制备 2 个豆芽汁鲜羊乳固体培养基平板 (鲜羊乳占平板总量的 10~15%, 使得选育培养基与发酵培养基之间发生关联, 此即为本发明的底物诱导适应性策略), 其中一个将小鼠抗 PQQ IgG 单抗 PQQ-mAb 配入, 形成平板 A, 另一个将琼脂糖-纤维蛋白配入, 形成平板 B; ②将纳豆芽孢杆菌 10261 和纳豆芽孢杆菌 10263 的诱变融合后代涂布其中一个平板后, 再用纤维素膜影印至另一个平板, 使平板 A 和平板 B 互为影印平板; ③平板 A 中, 高产 PQQ 诱变融合后代菌落周围形成肉眼可见沉淀线, 根据沉淀圈直径大小可肉眼判断产 PQQ 量大小; ④平板 B 中, 高产 NK 诱变融合后代菌落周围形成透明圈, 根据透明圈直径大小可肉眼判断产 NK 活力高低; ⑤平板 A 与平板 B 中, 高产 PQQ 菌落与高产 NK 菌落处于同一位置者, 即为高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌。所获得的高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌命名为 BN-NKPQQ-RWX-101, 保藏于豆芽汁鲜羊乳固体培养基 (斜面) 中。

[0111] (2) 甲硫氨酸营养缺陷 ( $\text{Met}^-$ ) 的干酪乳杆菌 ( $\text{LcS-Met}^-$ ) 的选育

[0112] 将干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei* Shirota) 进行亚硝基胍诱变, 从中筛选出甲硫氨酸营养缺陷型 ( $\text{LcS-Met}^-$ )。

[0113]  $\text{LcS-Met}^-$ 筛选: ①制备 2 个 MRS 固体培养基平板, 其中一个将甲硫氨酸 ( $\text{Met}$ ) 配入 (平板 C,  $\text{Met}$  添加量为 10–15mg/L), 另一个为单纯 MRS 平板 (平板 D); ②将干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei* Shirota) 的诱变后代涂布其中一个平板后, 再用纤维素膜影印至另一个平板, 使平板 C 和平板 D 互为影印平板; ③在平板 C 与平板 D 的同一位置, 平板 C 出现菌落而平板 D 未出现菌落, 或平板 C 上的菌落显著大于平板 D 上的菌落, 则该菌落甲硫氨酸营养缺陷型干酪乳杆菌, 命名为  $\text{LcS-Met}^-$ , 保藏于 MRS 固体培养基 (斜面) 中。

[0114] (3) BN-NKPQQ-RWX-101 的活化培养

[0115] 将保存于豆芽汁鲜羊乳固体培养基 (斜面) 中的 BN-NKPQQ-RWX-101 取一环, 接种至豆芽汁鲜羊乳液体培养基活化, 培养温度 35°C, 培养结束菌种密度达到  $10^9 \text{ cfu/mL}$  左右。

[0116] (4)  $\text{LcS-Met}^-$ 的活化培养

[0117] 将保存于 MRS 固体培养基 (斜面) 中的  $\text{LcS-Met}^-$ 取一环, 接种至 MRS 液体培养基 37°C 活化培养, 培养结束菌种密度达到  $10^9 \text{ cfu/mL}$  左右。

[0118] (5) 富含 NK 和 PQQ 的发酵羊乳的发酵制备

[0119] 将活化的 BN-NKPQQ-RWX-101 与  $\text{LcS-Met}^-$ 混合, 使混合菌液中二者密度比为 1:2 ( $1 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ :  $2 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ ), 混合菌液以 1% 接种量接种含鲜羊乳的发酵培养基, 42°C 六层纱布封口培养 24h, 得到富含 NK 和 PQQ 的发酵羊乳。发酵羊乳培养基 (即含鲜羊乳的发酵培养基) 中所含豆芽汁、酪氨酸、谷氨酸和麦芽糖对 BN-NKPQQ-RWX-101 合成 NK 和 PQQ 进行代谢调控, 豆芽汁有利于纳豆芽孢杆菌增殖, 麦芽糖有利于 NK 合成, 而 PQQ 由酪氨酸和谷氨酸通过肽键连接环化而成。发酵结束后, 发酵羊乳中 NK 活力 1725U/mL, PQQ 含量 100ng/mL。所获得的发酵羊乳除富含纳豆激酶和吡咯喹啉酮之外, 呈均一乳白色, 组织细腻均匀, 并具有酸乳固有的滋味及羊乳特有的风味。

[0120] 实施例 2

[0121] 本发明通过纳豆芽孢杆菌与干酪乳杆菌选育及其共发酵制备富含 NK 和 PQQ 的发酵羊乳, 包括以下步骤:

[0122] (1) 高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101 的选育

[0123] 采用底物诱导适应性策略, 通过基因组重排及高通量筛选技术获得高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌 BN-NKPQQ-RWX-101, 具体方法为: 首先构建纳豆芽孢杆菌突变库, 将已获得的产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌 10261 和 10263 分别进行亚硝基胍诱变; 然后混合二者诱变后代, 进行细胞质融合 (促融剂为聚乙二醇 4000), 传代培养, 实现基因组改组, 使纳豆芽孢杆菌 10261 和 10263 所有诱变后代的优势突变得到优化整合, 选育出 NK 兼 PQQ 产率高且生长旺盛、遗传稳定、适合作为生产菌株的高产 NK 兼 PQQ 的纳豆芽孢杆菌。

[0124] 突变库高通量筛选: ①制备 2 个豆芽汁鲜羊乳固体培养基平板 (鲜羊乳占平板总量的 10–15%, 使得选育培养基与发酵培养基之间发生关联, 此即为本发明的底物诱导适应性策略), 其中一个将小鼠抗 PQQ IgG 单抗 PQQ-mAb 配入, 形成平板 A, 另一个将琼脂糖 - 纤维蛋白配入, 形成平板 B; ②将纳豆芽孢杆菌 10261 和纳豆芽孢杆菌 10263 的诱变融合后代涂布其中一个平板后, 再用纤维素膜影印至另一个平板, 使平板 A 和平板 B 互为影印平板;

③平板A中,高产PQQ诱变融合后代菌落周围形成肉眼可见沉淀线,根据沉淀圈直径大小可肉眼判断产PQQ量大小;④平板B中,高产NK诱变融合后代菌落周围形成透明圈,根据透明圈直径大小可肉眼判断产NK活力高低;⑤平板A与平板B中,高产PQQ菌落与高产NK菌落处于同一位置者,即为高产NK兼PQQ的纳豆芽孢杆菌。所获得的高产NK兼PQQ的纳豆芽孢杆菌命名为BN-NKPQQ-RWX-101,保藏于豆芽汁鲜羊乳固体培养基(斜面)中。

[0125] (2) 甲硫氨酸营养缺陷( $\text{Met}^-$ )的干酪乳杆菌( $\text{LcS-Met}^-$ )的选育

[0126] 将干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei* Shirota)进行亚硝基胍诱变,从中筛选出甲硫氨酸营养缺陷型( $\text{LcS-Met}^-$ )。

[0127]  $\text{LcS-Met}^-$ 筛选:①制备2个MRS固体培养基平板,其中一个将甲硫氨酸( $\text{Met}$ )配入(平板C,  $\text{Met}$ 添加量为10-15mg/L),另一个为单纯MRS固体培养基平板(平板D);②将干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei* Shirota)的诱变后代涂布其中一个平板后,再用纤维素膜影印至另一个平板,使平板C和平板D互为影印平板;③在平板C与平板D的同一位置,平板C出现菌落而平板D未出现菌落,或平板C上的菌落显著大于平板D上的菌落,则该菌落甲硫氨酸营养缺陷型干酪乳杆菌,命名为 $\text{LcS-Met}^-$ ,保藏于MRS固体培养基(斜面)中。

[0128] (3)BN-NKPQQ-RWX-101的活化培养

[0129] 将保存于豆芽汁鲜羊乳固体培养基(斜面)中的BN-NKPQQ-RWX-101取一环,接种至豆芽汁鲜羊乳液体培养基活化,培养温度35℃,培养结束菌种密度达到 $10^9\text{cfu/mL}$ 左右。

[0130] (4)  $\text{LcS-Met}^-$ 的活化培养

[0131] 将保存于MRS固体培养基(斜面)中的 $\text{LcS-Met}^-$ 取一环,接种至MRS液体培养基37℃活化培养,培养结束菌种密度达到 $10^9\text{cfu/mL}$ 左右。

[0132] (5) 富含NK和PQQ的羊乳的发酵制备

[0133] 将活化的BN-NKPQQ-RWX-101与 $\text{LcS-Met}^-$ 混合,使混合菌液中二者密度比为1:5( $1\times 10^8\text{CFU/mL}$ : $5\times 10^8\text{CFU/mL}$ ),混合菌液以5%接种量接种含鲜羊乳的发酵培养基,37℃六层纱布封口培养36h,得到富含NK和PQQ的发酵羊乳。发酵羊乳培养基中所含豆芽汁、酪氨酸、谷氨酸和麦芽糖对BN-NKPQQ-RWX-101合成NK和PQQ进行代谢调控,豆芽汁有利于纳豆芽孢杆菌增殖,麦芽糖有利于NK合成,而PQQ由酪氨酸和谷氨酸通过肽键连接环化而成。发酵结束后,发酵羊乳中NK活力1900U/mL,PQQ含量134ng/mL。所获得的发酵羊乳除富含纳豆激酶和吡咯喹啉醌之外,呈均一乳白色,组织细腻均匀,并具有酸乳固有的滋味及羊乳特有的风味。

[0134] 本发明中采用色谱法测定PQQ,具体步骤参照“*Noji N, Nakamura T, Kitahata N, et al. Simple and sensitive method for pyrroloquinoline quinone (PQQ) analysis in various foods using liquid chromatography/electrospray-ionization tandem mass spectrometry. J Agri Food Chem, 2007, 55(18):7258-7263.*”。

[0135] 本发明中采用琼脂糖-纤维蛋白原平板法测定NK活力。测定步骤:将发酵液过滤后点种在琼脂糖-纤维蛋白平板上,37℃孵育18h,以尿激酶作为标准品,通过测量透明圈直径计算纳豆激酶相当于尿激酶的活力单位(U/mL)。