



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114642686 B

(45) 授权公告日 2023.02.10

(21) 申请号 202210475556.0

(22) 申请日 2022.04.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114642686 A

(43) 申请公布日 2022.06.21

(83) 生物保藏信息
CGMCC NO.14493 2017.08.04
CCTCC NO:M2017813 2017.12.21
CGMCC No.23187 2021.08.24

(73) 专利权人 善恩康生物科技(苏州)有限公司
地址 215321 江苏省苏州市昆山市张浦镇
三家路388号

(72) 发明人 马新 喻扬 郁雪平

(74) 专利代理机构 北京盛询知识产权代理有限公司 11901

专利代理师 相凡

(51) Int.Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/742 (2015.01)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)

审查员 吴颖

权利要求书1页 说明书12页

(54) 发明名称

一种复合益生菌及其延缓衰老和抗氧化的作用

(57) 摘要

本发明公开了一种复合益生菌及其延缓衰老和抗氧化的作用,属于微生物发酵技术领域。本发明公开了一种具有延缓衰老和抗氧化功能的复合益生菌,所述复合益生菌包括发酵乳杆菌、凝结芽孢杆菌和格氏乳杆菌;所述发酵乳杆菌的保藏编号为CGMCC NO.14493;所述凝结芽孢杆菌保藏编号为CCTCC NO:M2017813;所述格氏乳杆菌保藏编号为CGMCC No.23187。本发明通过三种菌的复配可以实现清除自由基达到抗氧化和延缓衰老的目的,这对于制备抗氧化和延缓衰老的产品提供了新的菌株和科学指导。

1. 一种具有延缓衰老和抗氧化功能的复合益生菌,其特征在于,所述复合益生菌包括发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 和格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*);

所述发酵乳杆菌的保藏编号为CGMCC NO.14493;所述凝结芽孢杆菌保藏编号为CCTCC NO:M2017813;所述格氏乳杆菌保藏编号为CGMCC No.23187。

2. 一种微生物菌剂,其特征在于,包括权利要求1所述的复合益生菌。

3. 如权利要求2所述的微生物菌剂,其特征在于,所述发酵乳杆菌、凝结芽孢杆菌和格氏乳杆菌分别接种发酵培养基后,获取发酵液;然后将所得发酵液离心,收集菌体,冷冻、干燥,分别得到发酵乳杆菌菌粉、凝结芽孢杆菌菌粉和格氏乳杆菌菌粉。

4. 如权利要求3所述的微生物菌剂,其特征在于,所述微生物菌剂还包括水苏糖,将所述发酵乳杆菌菌粉、凝结芽孢杆菌菌粉、格氏乳杆菌菌粉和所述水苏糖按照质量比 (0.5-2) : (0.5-2) : (0.5-2) : (1-5) 混合制备得到所述微生物菌剂。

5. 如权利要求3所述的微生物菌剂,其特征在于,所述发酵乳杆菌的发酵培养基包括以下重量份的组分:蛋白胨10份、牛肉浸膏5份、酵母浸粉3份、葡萄糖20份、醋酸钠5份、柠檬酸二胺2份、磷酸氢二钾0.2份、硫酸镁0.35份、硫酸锰0.01份、碳酸钙5份和水1000份;

所述凝结芽孢杆菌的发酵培养基包括以下重量份组分:胰蛋白胨5份、酵母浸粉15份、葡萄糖5份、磷酸氢二钾3份、硫酸镁0.3份、硫酸锰0.01份和蒸馏水1000份;

所述格氏乳杆菌的发酵培养基包括以下重量份组分:蛋白胨10份、酵母浸粉8份、葡萄糖20份、磷酸氢二钾3份、硫酸镁0.2份、醋酸钠3份、硫酸锰0.01份和水1000份。

6. 一种如权利要求1所述的复合益生菌或权利要求2-5任一项所述的微生物菌剂在制备具有延缓衰老和抗氧化功能的产品中的应用。

7. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述产品包括药物、食品或保健食品。

一种复合益生菌及其延缓衰老和抗氧化的作用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物发酵技术领域,特别是涉及一种复合益生菌及其延缓衰老和抗氧化的作用。

背景技术

[0002] 人体健康是追求物质、精神和文化的基础,而肠道菌群影响着人体的生长发育、营养与健康,甚至与疾病密切相关,菌群失衡可能引发肥胖、自身免疫性疾病、过敏性疾病、心脏病等,可见,肠道菌群与人体健康乃至生命长短紧密相关。

[0003] 目前,用于调控肠道菌群的菌种具有多种,而乳酸菌是最常见的一种,乳酸菌可以通过平衡肠道内菌群,促使肠道健康,减少疾病的发生,而相反,肠道菌群紊乱不仅会增加疾病的发生,还能引起体内物质和能量代谢的失衡,从而使得机体代谢过程中,会因各种内因和外因而产生的各种活性氧和自由基,过多的自由基会损伤人的机体,不断的攻击细胞膜等细胞组织,造成脂质过氧化反应,而脂质过氧化产物又再分解成更多自由基,进而引起自由基的连锁反应。由于细胞膜遭到破坏,引起细胞结构、遗传物质等损伤,让细胞失去正常的生理功能,进而导致疾病的产生。另外,相关研究表明多种自由基和人体衰老直接相关,所以,保证肠道菌群免受破坏,保证体内自由基的正常运行状态,才能更好的防止疾病的发生,细胞的衰老以及避免过氧化。而目前,用于调节肠道菌群或者抗氧化的菌种多都是单一的乳酸菌菌种,但是由于单一菌种功能单一,对于肠道一个复杂的体内环境而言,并不能保证能够最高限度的发挥菌种优势,而目前没有多种菌种复配方式应用到延缓衰老和抗氧化中。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种复合益生菌及其延缓衰老和抗氧化的作用,以解决上述现有技术存在的问题,通过三种菌种的复配可以实现清除自由基达到抗氧化和延缓衰老的目的,这对于制备抗氧化和延缓衰老的产品提供了新的菌株和科学指导。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供了如下方案:

[0006] 本发明提供一种具有延缓衰老和抗氧化功能的复合益生菌,所述复合益生菌包括发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)和格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*);

[0007] 所述发酵乳杆菌的保藏编号为CGMCC NO.14493,保藏时间:2017年8月4日,保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号;所述凝结芽孢杆菌保藏编号为CCTCC NO:M2017813,保藏时间:2017年12月21日,保藏单位:中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国武汉大学;所述格氏乳杆菌保藏编号为CGMCC No.23187,保藏时间2021年08月24日,保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0008] 本发明还提供一种微生物菌剂,包括所述的复合益生菌。

[0009] 优选的是,所述发酵乳杆菌、凝结芽孢杆菌和格氏乳杆菌分别接种发酵培养基后,获取发酵液;然后将所得发酵液离心,收集菌体,冷冻、干燥,分别得到发酵乳杆菌菌粉、凝结芽孢杆菌菌粉和格氏乳杆菌菌粉。

[0010] 优选的是,所述微生物菌剂还包括水苏糖,将所述发酵乳杆菌菌粉、凝结芽孢杆菌菌粉、格氏乳杆菌菌粉和所述水苏糖按照质量比(0.5-2):(0.5-2):(0.5-2):(1-5)混合制备得到所述微生物菌剂。

[0011] 优选的是,所述发酵乳杆菌的发酵培养基包括以下重量份的组分:蛋白胨10份、牛肉浸膏5份、酵母浸粉3份、葡萄糖20份、醋酸钠5份、柠檬酸二胺2份、磷酸氢二钾0.2份、硫酸镁0.35份、硫酸锰0.01份、碳酸钙5份和水1000份;

[0012] 所述凝结芽孢杆菌的发酵培养基包括以下重量份组分:胰蛋白胨5份、酵母浸粉15份、葡萄糖5份、磷酸氢二钾3份、硫酸镁0.3份、硫酸锰0.01份和蒸馏水1000份;

[0013] 所述格氏乳杆菌的发酵培养基包括以下重量份组分:蛋白胨10份、酵母浸粉8份、葡萄糖20份、磷酸氢二钾3份、硫酸镁0.2份、醋酸钠3份、硫酸锰0.01份和水1000份。

[0014] 本发明还提供一种所述的复合益生菌或其代谢物,或所述的微生物菌剂在制备具有延缓衰老和抗氧化功能的产品中的应用。

[0015] 优选的是,所述产品包括药物、食品或保健食品。

[0016] 本发明公开了以下技术效果:

[0017] 本发明公开的复合益生菌中包含发酵乳杆菌、凝结芽孢杆菌和格氏乳杆菌组合而成,发明人在前期的研究中发现发酵乳杆菌具有抗氧化能力,但是单一菌株的抗氧化能力有限,然后将其与其他菌株进行复配,新发现的格氏乳杆菌自身的抗氧化能力几乎没有,但是经过不断的调整优化试验条件,发现在发酵乳杆菌中添加格氏乳杆菌进行复配后,能提高抗氧化能力,而凝结芽孢杆菌自身芽孢萌发速度快,在肠道内快速生长为营养体,定植性较强,有助于营造肠道内乳酸菌繁殖做需要的厌氧环境,并且抑制多种致病菌比如粪肠球菌、沙门氏菌、绿脓杆菌等效果显著,所以,考虑到复配之后要用于肠道菌群平衡中,于是经过筛选和优化将凝结芽孢杆菌和另外两种菌进行复配,并且进行不断的优化后,发现发酵乳杆菌菌粉、凝结芽孢杆菌菌粉和格氏乳杆菌菌粉的质量比为2:0.5:0.5,所制备的微生物菌剂含菌量最高,并且显著增强发酵乳杆菌的抗氧化能力,延缓衰老。可见,本发明将两种本身不具有抗氧化能力的菌株和发酵乳杆菌复配后,经过不断的条件优化,显著提高了发酵乳杆菌的抗氧化能力,这对于将该复合益生菌应用到延缓衰老和抗氧化的产品中具有重要意义,提供科学依据。

具体实施方式

[0018] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式,该详细说明不应认为是对本发明的限制,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0019] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0020] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入,用以公开和描述与本文所述文献相关的方法和/或材料。在与任何并入的文献冲突时,以本说明书的内容为准。

[0021] 在不背离本发明的范围或精神的情况下,可对本发明说明书的具体实施方式做多种改进和变化,这对本领域技术人员而言是显而易见的。由本发明的说明书得到的其他实施方式对技术人员而言是显而易见的。本申请说明书和实施例仅是示例性的。

[0022] 关于本文中所使用的“包含”、“包括”、“具有”、“含有”等等,均为开放性的用语,即意指包含但不限于。

[0023] 本发明以下实施例所用的发酵乳杆菌、凝结芽孢杆菌和格氏乳杆菌均保藏于善恩康生物科技(苏州)有限公司。

[0024] 实施例1格氏乳杆菌的分离与鉴定

[0025] 1、样品来源

[0026] 江苏省昆山市中医院母乳样本,无菌取样运送至善恩康生物科技有限公司实验室。

[0027] 2、母乳中乳酸菌的筛选

[0028] 2.1分离纯化

[0029] 富集培养:取3-5ml母乳样品于50ml已灭菌的MRS液体培养基(1LMRS液体培养基+0.5%L-半胱氨酸)/TPY液体培养基中,将其置于37℃无氧条件下培养24-48h,进行稀释后涂板。

[0030] 2.2培养方案

[0031] 2.2.1. 稀释液

[0032] 改良的生理盐水稀释液:1L 0.9%生理盐水+0.05%L-半胱氨酸。

[0033] 2.2.2. 稀释涂板法

[0034] 吸取上述繁殖好的细菌培养液1ml,至9ml稀释液中,得到 10^{-1} ,依次做五个梯度,而后依次接种到预先准备好的固体培养皿中,涂布均匀。对每个培养皿进行相对应的稀释度标记,每个稀释度做2个平行,并留空白培养皿作对照,后将其置于37℃厌氧条件下倒置培养72h。

[0035] 2.2.3培养基的配制

[0036] (1)改良的MRS液体(1L)配制,如表1:

[0037] 表1

蛋白胨	10g	葡萄糖	20g
酵母浸粉	5g	牛肉膏	10g
K ₂ HPO ₄	2g	柠檬酸二铵	2g
乙酸钠	5g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.58g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.25g	吐温 80	1mL
L-半胱氨酸	0.5g		
调 pH7.0±0.1, 121℃灭菌 15min。			

[0038]

[0039] (2)改良的MRS固体培养基(1L)配制,如表2:

[0040] 表2

[0041]	蛋白胨	10g	葡萄糖	20g
	酵母浸粉	5g	牛肉膏	10g
	K ₂ HPO ₄	2g	柠檬酸二铵	2g
	乙酸钠	5g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.58g
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.25g	吐温 80	1mL
	L-半胱氨酸	0.5g	琼脂	20g
调 pH7.0±0.1, 121℃灭菌 15min。				

[0042] 注:L-半胱氨酸溶液过滤除菌后,在培养基灭菌后,倒平板前加入。

[0043] (3)改良TPY琼脂(莫匹罗星里盐添加量为50mg/L)

[0044] 2.2.4纯化

[0045] 将37℃厌氧培养72h后的平板取出,观察固体培养基上的菌落形态,包括形状、颜色、大小、表面、边缘、隆起度、透明度等,挑选不同菌落形态的单菌进行分区划线,37℃培养48h。

[0046] 2.2.5镜检

[0047] 2.2.6液体培养

[0048] 用已灭好的牙签挑取已纯化好的菌落接于液体中,置于37℃条件下厌氧培养48h。

[0049] 2.2.6菌种保藏

[0050] 将培养48h后的液体试管接入到2mL甘油管中,于-80℃下进行保藏。

[0051] 2.3菌株DNA提取

[0052] 采用细菌DNA提试剂盒提取DNA,经16S rRNA扩增测序,鉴定为格氏乳杆菌。

[0053] 16S rRNA序列如下:

[0054] TATCATGCAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGAATTTGGTGCTTGCACCAAATGAACTAGATACAAGC
GAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATA
CCGATAACAACACTAGACGCATGTCTAGAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGGTGC
ATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGCCACATTG
GGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAAGT
GCCTTTATTTGACGGTAATTAAGTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAA
CCGAGAATTGCATCAGAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATG
CGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGG
GTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTTCCGCCTC
TCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACG
GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCAG
TGCAAACCTAAGAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGC
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAATG
AGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC

GTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTGAAAGCCGTTCTCAGTTCGGA
CTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTC
CCGGCCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTCTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGATAACCTTTATAGGA
GTCAGCCGTCTAAGGTAGGACAGATGATTAGGGTGAAG。

[0055] 实施例2一种微生物菌剂的制备

[0056] (1) 发酵乳杆菌的发酵

[0057] 先将保存的发酵乳杆菌进行活化,活化培养基包括以下重量份组分:蛋白胨15份、牛肉浸膏8份、酵母浸粉3份、葡萄糖25份、醋酸钠5份、柠檬酸二胺2份、磷酸氢二钾0.2份、硫酸镁0.35份、硫酸锰0.01份、碳酸钙5份和水1000份。活化条件37℃,厌氧活化18h,获得发酵乳杆菌活化菌液。

[0058] 将所得发酵乳杆菌活化菌液按照接种量4.5%接种于发酵培养基中,37℃,厌氧发酵24h,得到发酵乳杆菌发酵液。发酵培养基包括以下重量份组分:蛋白胨10份、牛肉浸膏5份、酵母浸粉3份、葡萄糖20份、醋酸钠5份、柠檬酸二胺2份、磷酸氢二钾0.2份、硫酸镁0.35份、硫酸锰0.01份、碳酸钙5份和水1000份。

[0059] (2) 先将保存的凝结芽孢杆菌活化,活化培养基为胰蛋白胨8份、酵母浸粉15份、葡萄糖10份、磷酸氢二钾3份、硫酸镁0.3份、硫酸锰0.01份和蒸馏水1L;活化条件为40℃,250rpm活化12h,获得凝结芽孢杆菌活化菌液。

[0060] 将所得的凝结芽孢杆菌活化菌液按照接种量3.5%接种于发酵培养基中,37℃,250rpm发酵24h,得到凝结芽孢杆菌发酵液。发酵培养基包括以下重量份组分:胰蛋白胨5份、酵母浸粉15份、葡萄糖5份、磷酸氢二钾3份、硫酸镁0.3份、硫酸锰0.01份和蒸馏水1000份。

[0061] (3) 将实施例1分离纯化后的格氏乳杆菌按照接种量4.5%接种于发酵培养基中,37℃,厌氧发酵24h,获得格氏乳杆菌发酵液。发酵培养基包括以下重量份组分:蛋白胨10份、酵母浸粉8份、葡萄糖20份、磷酸氢二钾3份、硫酸镁0.2份、醋酸钠3份、硫酸锰0.01份和水1000份。

[0062] (4) 将所得的发酵乳杆菌发酵液、凝结芽孢杆菌发酵液和格氏乳杆菌发酵液分别离心后,收集菌体,冷冻、干燥,得到发酵乳杆菌菌粉、凝结芽孢杆菌菌粉以及格氏乳杆菌菌粉。将三种菌粉按照不同配比组合,发现各种菌随着添加量的不同发生变化,但是在发酵乳杆菌菌粉、凝结芽孢杆菌菌粉、格氏乳杆菌菌粉的质量比为2:0.5:0.5时,制备的复合益生菌中,各菌种的含菌量最低,分别为发酵乳杆菌的活菌量 2.85×10^{10} cfu/g,凝结芽孢杆菌的活菌量 3.10×10^{10} cfu/g,格氏芽孢杆菌的活菌量 2.50×10^{10} cfu/g,见表2。将三种菌粉和水苏糖混合,为了保证最低含量量仍然存在技术效果的基础上,后续功能验证过程中按照如下用量称量:发酵乳杆菌菌粉200g、凝结芽孢杆菌菌粉50g、格氏乳杆菌菌粉50g和水苏糖350g,制备的微生物菌剂。

[0063] 表2

	发酵乳杆菌菌粉、凝结芽孢杆菌菌粉、格氏乳杆菌菌粉的质量比	各菌种含量
[0064]	0.5:0.5:0.5	发酵乳杆菌的活菌量 3.32×10^{10} cfu/g, 凝结芽孢杆菌的活菌量 3.72×10^{10} cfu/g, 格氏芽孢杆菌的活

[0065]

	菌量 3.10×10^{10} cfu/g
1: 1: 0.5	发酵乳杆菌的活菌量 3.98×10^{10} cfu/g, 凝结芽孢杆菌的活菌量 4.76×10^{10} cfu/g, 格氏芽孢杆菌的活菌量 4.01×10^{10} cfu/g
2: 1: 0.5	发酵乳杆菌的活菌量 3.84×10^{10} cfu/g, 凝结芽孢杆菌的活菌量 6.66×10^{10} cfu/g, 格氏芽孢杆菌的活菌量 5.56×10^{10} cfu/g
1: 2: 0.5	发酵乳杆菌的活菌量 3.56×10^{10} cfu/g, 凝结芽孢杆菌的活菌量 4.15×10^{10} cfu/g, 格氏芽孢杆菌的活菌量 3.34×10^{10} cfu/g
2:0.5:0.5	发酵乳杆菌的活菌量 2.85×10^{10} cfu/g, 凝结芽孢杆菌的活菌量 3.10×10^{10} cfu/g, 格氏芽孢杆菌的活菌量 2.50×10^{10} cfu/g

[0066]

2: 0.5: 1	发酵乳杆菌的活菌量 3.76×10^{10} cfu/g, 凝结芽孢杆菌的活菌量 4.36×10^{10} cfu/g, 格氏芽孢杆菌的活菌量 3.57×10^{10} cfu/g
2: 0.5: 2	发酵乳杆菌的活菌量 4.38×10^{10} cfu/g, 凝结芽孢杆菌的活菌量 5.92×10^{10} cfu/g, 格氏芽孢杆菌的活菌量 4.74×10^{10} cfu/g
1: 0.5: 2	发酵乳杆菌的活菌量 3.89×10^{10} cfu/g, 凝结芽孢杆菌的活菌量 5.01×10^{10} cfu/g, 格氏芽孢杆菌的活菌量 4.23×10^{10} cfu/g
0.5: 1: 1	发酵乳杆菌的活菌量 3.46×10^{10} cfu/g, 凝结芽孢杆菌的活菌量 4.82×10^{10} cfu/g, 格氏芽孢杆菌的活菌量 3.84×10^{10} cfu/g
0.5: 1: 2	发酵乳杆菌的活菌量 3.30×10^{10} cfu/g, 凝结芽孢杆菌的活菌量 4.67×10^{10} cfu/g, 格氏芽孢杆菌的活菌量 3.84×10^{10} cfu/g
0.5: 2: 1	发酵乳杆菌的活菌量 $3.46 \times$

[0067]	10 ¹⁰ cfu/g, 凝结芽孢杆菌的活菌量 4.82×10 ¹⁰ cfu/g, 格氏芽孢杆菌的活菌量 4.31×10 ¹⁰ cfu/g
--------	--

[0068] 实施例3具有延缓衰老和抗氧化功能的复合益生菌的应用

[0069] 本实施例主要是研究复合益生菌在抗氧化和延缓衰老方面的应用。

[0070] (1) 复合益生菌对氧胁迫的耐受性

[0071] 根据实施例2制备微生物菌剂的方法,先混合制备复合益生菌,然后在MRS培养基添加0.50mmol/L H₂O₂,37℃发酵4h,分别测定0h和4h的OD₆₀₀,检测复合益生菌对H₂O₂的耐受性。通过分别以发酵乳杆菌和凝结芽孢乳杆菌、发酵乳杆菌和格氏乳杆菌、格氏乳杆菌和凝结芽孢杆菌、以及单独的发酵乳杆菌、凝结芽孢乳杆菌和格氏乳杆菌作为对照。结果如表3所示。

[0072] 表3

[0073]	菌株	发酵乳杆菌	凝结芽孢杆菌	格氏乳杆菌	发酵乳杆菌和凝结芽孢乳杆菌	发酵乳杆菌和格氏乳杆菌	格氏乳杆菌和凝结芽孢杆菌	三种菌混合
	△OD ₆₀₀	0.65	0.71	0.66	0.69	0.78	0.73	0.93

[0074] 从表4可以看出,当三种菌株混合复配时表现出相比单一菌种或任意两种菌株复配时对氧的耐受性。

[0075] (2) 复合益生菌清除DPPH自由基的能力

[0076] 按照实施例2最优条件制备的微生物菌剂,取1.0mg加入1mL DPPH无水乙醇溶液(0.2mmol/L)混合均匀,室温避光反应20min,2000rpm离心15min,取上清液于517nm处测定吸光度值A_i,空白组以等体积无水乙醇替代DPPH无水乙醇溶液A₀,对照组以等体积空白溶剂代替样品溶液A_j,并以等体积蒸馏水和乙醇混合液空白调零。清除率(%) = 100 - (A_i - A₀) / A_j × 100%。

[0077] 同时,用发酵乳杆菌、凝结芽孢乳杆菌和格氏乳杆菌单独一种以及任意两种组合,替代上述三种菌株混合复配制备的微生物菌剂,作为对照试验。结果如表4所示。

[0078] 表4

[0079]	菌株	发酵乳杆菌	凝结芽孢杆菌	格氏乳杆菌	发酵乳杆菌和凝结芽孢乳杆菌	发酵乳杆菌和格氏乳杆菌	格氏乳杆菌和凝结芽孢杆菌	三种菌混合
	清除率(%)	60.0	10.2	5.3	63.5	65.9	18.9	86.3

[0080] 从表5中可以看出,单独的凝结芽孢杆菌和格氏乳杆菌几乎无清除DPPH的能力,发酵乳杆菌具有明显清除DPPH的能力;而任意两种菌种复配时,除了发酵乳杆菌与其他两种

菌分别复配时,仍具有清除DPPH的能力,但是效果不明显,惊奇的是,凝结芽孢杆菌和格氏乳杆菌单独使用虽然几乎无清除DPPH能力,但是两种复配不但没降低,反而稍有增强,但是增强并不是很明显。而将三种菌复配后发现,能够显著的提高对DPPH的清除率,具体原理尚不清楚。

[0081] (3) 复合益生菌清除羟基自由基的能力

[0082] 0.5mL的邻二氮菲(6mmol/L),0.5mL的 FeSO_4 溶液(6mmol/L)与1.0mL的PBS溶液(pH7.2)混匀。再向此体系中加入0.5mL样品和0.5mL 0.1%过氧化氢,用双蒸水将总体积定容至4.0mL。混匀后在37℃下孵育1h,于536nm下读取吸光度。羟基自由基的清除率按下式计算:清除率(%) = $[(A_s - A_0) / (A - A_0)] \times 100\%$

[0083] A_s :样品的吸光度值; A_0 :用 H_2O 替代样品; A :用 H_2O 替代 H_2O_2 和样品。

[0084] 用发酵乳杆菌、凝结芽孢乳杆菌和格氏乳杆菌单独一种以及任意两种组合,替代上述三种菌株混合复配制备的微生物菌剂,作为对照试验。结果如表5所示,复合益生菌清除羟基自由基能力最强。

[0085] 表5

菌株	发酵乳杆菌	凝结芽孢杆菌	格氏乳杆菌	发酵乳杆菌和凝结芽孢乳杆菌	发酵乳杆菌和格氏乳杆菌	格氏乳杆菌和凝结芽孢杆菌	三种菌混合
清除率(%)	68.9	25.6	30.8	71.9	76.0	33.5	98.3

[0087] (4) 复合益生菌清除超氧阴离子的能力

[0088] A_i 组:2mL Tris-HCl缓冲液(150mM pH8.0)中加入1mL邻苯三酚溶液,再加入0.5mL样品; A_j 组:用1mL蒸馏水取代邻苯三酚溶液; A_0 组:用0.5mL蒸馏水取代样品; A_1 组:用1.5mL蒸馏水取代1mL邻苯三酚和0.5mL样品;混匀,室温反应30min后于325nm处测定吸光值;记录数据并计算清除率:清除率(%) = $[1 - (A_i - A_j) / (A_0 - A_1)] \times 100\%$

[0089] 用发酵乳杆菌、凝结芽孢乳杆菌和格氏乳杆菌单独一种以及任意两种组合,替代上述三种菌株混合复配制备的微生物菌剂,作为对照试验。结果如表6所示,复合益生菌清除超氧阴离子的能力最强。

[0090] 表6

菌株	发酵乳杆菌	凝结芽孢杆菌	格氏乳杆菌	发酵乳杆菌和凝结芽孢乳杆菌	发酵乳杆菌和格氏乳杆菌	格氏乳杆菌和凝结芽孢杆菌	三种菌混合
清除率(%)	59.6	32.0	33.1	69.9	40.3	42.0	96.9

[0092] (5) 复合益生菌总还原力测定

[0093] 0.5mL 0.2M PBS溶液(pH6.6)中加入0.5mL 0.1%的铁氰化钾溶液和0.5mL样品;充分混匀,50℃保温20min;加入等体积的10%三氯乙酸,3000g离心10min;取1mL上清,加入0.175mL 0.1% FeCl_3 溶液,混合均匀,反应10min;700nm处测定吸光值。

[0094] 用发酵乳杆菌、凝结芽孢乳杆菌和格氏乳杆菌单独一种以及任意两种组合,替代上述三种菌株混合复配制备的微生物菌剂,作为对照试验。结果如表7所示,复合益生菌总还原力最强。

[0095] 表7

菌株	发酵乳杆菌	凝结芽孢杆菌	格氏乳杆菌	发酵乳杆菌和凝结芽孢乳杆菌	发酵乳杆菌和格氏乳杆菌	格氏乳杆菌和凝结芽孢杆菌	三种菌混合
OD _{700nm}	0.55	0.42	0.46	0.56	0.58	0.48	1.39

[0097] (6) 复合益生菌模拟体内抗氧化作用

[0098] 用D-半乳糖腹空注射小鼠 (SPF级昆明种雄性12月龄) 建造衰老模型,腹空注射造模同时灌胃治疗,连续六周。分组如下表8:

[0099] 表8

分组	造模	治疗
对照 1	无菌水(0.1 mL/10 g/d)	蒸馏水
对照 2	D-半乳糖(300 mg/kg/d)	蒸馏水
实验 1	D-半乳糖(300mg/kg/d)	复合益生菌(150 mg/kg/d)
实验 2	D-半乳糖(300mg/kg/d)	发酵乳杆菌(150 mg/kg/d)
[0100] 实验 3	D-半乳糖(300mg/kg/d)	凝结芽孢杆菌(150 mg/kg/d)
实验 4	D-半乳糖(300mg/kg/d)	格氏乳杆菌(150 mg/kg/d)
实验 5	D-半乳糖(300mg/kg/d)	发酵乳杆菌和凝结芽孢乳杆菌 (150 mg/kg/d)
实验 6	D-半乳糖(300mg/kg/d)	发酵乳杆菌和格氏乳杆菌(150 mg/kg/d)
实验 7	D-半乳糖(300mg/kg/d)	格氏乳杆菌和凝结芽孢杆菌(150 mg/kg/d)

[0101] 实验前小鼠尾尖上采血测定MAD含量;6周最后一天,小鼠尾尖上采血测定MDA的含量,并摘眼球采血,离心,取血清,测定血清超氧化物歧化酶 (SOD) 活力和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活力,结果检验方法采用组间t检验。

[0102] 结果如表9所示,与对照相比,本发明试验1组即本发明的复合益生菌相差较明显,而其他单一菌株或者两种菌株复配和对照相比无明显差异,说明本发明的复合益生菌治疗效果更明显,优于对照以及其他单一菌株或者两种菌株复配的治疗效果。

[0103] 表9

分组	重复次数	试验前 MAD 含量 (mmol/L)	试验后 MAD 含量 (mmol/L)
对照 1	5	13.05±2.89	12.99±2.50
对照 2	5	13.45±2.99	12.00±2.91
试验 1	5	13.23±2.64	10.81±1.97
试验 2	5	13.35±2.58	12.23±2.35
试验 3	5	13.20±2.88	12.60±2.89
试验 4	5	13.30±2.61	12.30±2.51
试验 5	5	13.40±2.81	12.08±2.30
试验 6	5	13.29±2.76	12.19±2.25
试验 7	5	13.35±2.88	12.13±2.31

[0104] 如表10所示,经过灌胃治疗不同菌株制备的样品后,试验1组即复合益生菌组中血清SOD活力明显高于对照组以及其他单一菌株或者两种菌株复配组,而单一菌株或者两种菌株复配组与对照组差异并不明显,说明本发明的复合益生菌的治疗效果更优。

[0106] 表10

分组	重复次数	SOD活力 (U/mL)
对照1	5	150.02±40.89
对照2	5	164.64±45.66
试验1	5	210.23±50.35
试验2	5	175.23±43.23
试验3	5	163.21±45.03
试验4	5	160.56±44.01
试验5	5	179.30±46.02
试验6	5	179.02±45.20
试验7	5	168.01±45.23

[0108] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。