



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113005066 B

(45) 授权公告日 2023.07.21

(21) 申请号 202110347193.8

A61P 37/08 (2006.01)

(22) 申请日 2021.03.31

A61P 37/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 3/10 (2006.01)

申请公布号 CN 113005066 A

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.06.22

A61P 1/00 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

C12R 1/01 (2006.01)

CGMCC No. 20866 2020.10.12

CGMCC No. 20867 2020.10.12

CGMCC No. 20868 2020.10.12

CGMCC No. 20869 2020.10.12

(73) 专利权人 江苏蓝泽生物科技有限公司

地址 224300 江苏省盐城市射阳县合德镇

北环西路长江铝业后面、春晖路南

(72) 发明人 陈大伟 童颖佳 童群义 陈金林

吉峰

(74) 专利代理机构 北京细软智谷知识产权代理

有限责任公司 11471

专利代理师 刘静培

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 33/135 (2016.01)

A61K 35/745 (2015.01)

(56) 对比文件

CN 102021162 A, 2011.04.20

CN 102021162 A, 2011.04.20

CN 103255093 A, 2013.08.21

CN 1192360 A, 1998.09.09

CN 109234190 A, 2019.01.18

JP H10309178 A, 1998.11.24

CN 102451195 A, 2012.05.16

CN 110452842 A, 2019.11.15

RU 2109054 C1, 1998.04.20

US 2021153535 A1, 2021.05.27

CN 109430666 A, 2019.03.08

CN 101486987 A, 2009.07.22

CN 111944727 A, 2020.11.17

CN 107224584 A, 2017.10.03

审查员 朱晓

权利要求书1页 说明书30页

(54) 发明名称

抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂及其制备方法与应用,采用两歧双歧杆菌Miuyo-01、婴儿双歧杆菌Miuyo-21、短双歧杆菌Miuyo-31和乳双歧杆菌Miuyo-11,经混合菌接种、厌氧液态培养、固液分离、固态培养等结合的新工艺制备而成,生产的复合双歧杆菌制剂菌体数量大且活性高,并含有复合双歧杆菌所产生α-葡萄糖苷酶抑制剂、细菌多糖、肽聚糖和脂磷壁酸等多种代谢产物;

具有更好的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥效果;在制备过程中采用液态厌氧培养,产生的培养液经离心分离后获得复合双歧杆菌的湿菌体;再将湿菌体与无菌固体培养基混合,在密封状态下进行第二次固态厌氧培养;固态培养完成后进行低温干燥而得到高活力复合双歧杆菌固体。

1. 一种制备抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂的方法,其特征在于,所述抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂由以下原料制得:

12-13份两歧双歧杆菌Miuyo-01(拉丁名称:Bifidobacterium bifidum)、3-5份乳双歧杆菌Miuyo-11(拉丁名称:Bifidobacterium lactis)、7-8份婴儿双歧杆菌Miuyo-21(拉丁名称:Bifidobacterium infantis)和4-6份短双歧杆菌Miuyo-31(拉丁名称:Bifidobacterium breve)和;两歧双歧杆菌Miuyo-01、短双歧杆菌Miuyo-31、婴儿双歧杆菌Miuyo-21和乳双歧杆菌Miuyo-11的保藏号分别为CGMCC 20866、CGMCC 20867、CGMCC 20868、CGMCC 20869;

所述方法包括以下步骤:

(1) 按配比将两歧双歧杆菌Miuyo-01、婴儿双歧杆菌Miuyo-21、短双歧杆菌Miuyo-31和乳双歧杆菌Miuyo-11混合均匀,形成复合双歧杆菌,放入液体培养基中进行第一次厌氧培养,产生的培养液经离心分离后获得复合双歧杆菌湿菌体,备用;

采用碟式离心机或管式离心机在无菌条件下进行离心分离后获得复合双歧杆菌湿菌体;所述液体培养基包括低聚糖、蛋白胨、酵母浸膏和番茄酱;所述第一次厌氧培养的温度为36-38℃,时间为48-72小时;

(2) 向步骤(1)得到的所述复合双歧杆菌湿菌体与固体培养基混合,在密封状态下进行第二次厌氧培养,培养完成后进行低温干燥或冷冻干燥或真空干燥,形成复合双歧杆菌固体;

所述固体培养基包括低聚糖、大豆肽、酵母提取物、食品级碳酸钙,所述固体培养基在使用前经过高温干热灭菌,并无菌冷却到38℃以下备用;所述第二次厌氧培养前将所述复合双歧杆菌湿菌体与固体培养基混合物的水分含量调节到45%-55%;

所述第二次厌氧培养的温度为36-38℃,时间为72-120小时;所述低温干燥的温度为30-40℃;所述复合双歧杆菌固体的含水率为4-6%;

(3) 将步骤(2)得到的复合双歧杆菌固体粉碎、厌氧造粒、厌氧包衣,即得所述抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂。

2. 根据权利要求1所述的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂的制备方法,其特征在于,所述抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂由以下原料制得:

12.5份两歧双歧杆菌Miuyo-01、7.5份婴儿双歧杆菌Miuyo-21、5份短双歧杆菌Miuyo-31和4份乳双歧杆菌Miuyo-11;所述复合双歧杆菌制剂的活菌数为 $(4-5) \times 10^{11}$ CFU/g。

3. 根据权利要求1或2所述的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂的制备方法,其特征在于,所述两歧双歧杆菌Miuyo-01、婴儿双歧杆菌Miuyo-21、短双歧杆菌Miuyo-31和乳双歧杆菌Miuyo-11均来自婴儿粪便,从婴儿粪便中分离培养得到。

4. 根据权利要求1所述的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂的制备方法,其特征在于,所述两歧双歧杆菌Miuyo-01、婴儿双歧杆菌Miuyo-21、短双歧杆菌Miuyo-31和乳双歧杆菌Miuyo-11的分离培养条件均为:MRS培养基;pH为6.0-7.5,温度34-40℃。

## 抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于益生菌制剂技术领域,具体涉及一种抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 过敏是有机体对某些外界刺激(抗原)的感受性不正常增高的现象,即异常的、过高的免疫应答,简单地说就是对某种物质(抗原)过度敏感。过敏性疾病的发生、发展与机体免疫系统有关,其中2型免疫应答机制在过敏性疾病中起着重要作用,能针对过敏原产生特异性IgE抗体,使机体处于致敏状态。当致敏机体再次接触相同过敏原时,吸附在肥大细胞与嗜酸性粒细胞表面的IgE抗体与相应的抗原结合,引起肥大细胞脱颗粒,释放出组织胺等过敏介质,从而引起过敏反应,使机体发生组织损伤或功能紊乱,常见的症状有腹痛、腹泻、呕吐,或是皮肤奇痒难熬,更严重者会发生休克。对于过敏体质人群,曾采用避免接触过敏原的方法来减少过敏的发生,但是效果甚微,避开过敏原只能暂时减轻过敏症状,却不能根治过敏症。于是便出现了诱导免疫耐受的方法,尽管这种方法有一定的可行性,但是,在现在的卫生条件下也很难完全脱敏。

[0003] 人体中常见的免疫器官是淋巴器官,淋巴中表达CD4的T细胞称为辅助T细胞(Th)。根据辅助T细胞的功能,或者说根据其对不同细胞因子的应答以及分泌细胞因子的能力可再分成两个主要部分,即T辅助细胞可分化为两型(Th1及Th2)。一般地说,Th1有利于增强细胞免疫,而Th2有利于增强体液免疫,正常情况下Th1及Th2间存在动态平衡。而且二者还会互相制衡:Th1的免疫反应旺盛,则Th2的活性及功能会受抑制而大幅降低,反之亦然。而Th1的主要作用是抵抗外界各种微生物的刺激,外来感染愈多,Th1受到的微生物刺激愈多,其被活化的数目也愈多,其结果便是Th2的免疫反应受到抑制。或者说:刺激Th1型免疫应答,会降低可导致过敏的Th2型免疫应答。研究表明过敏性疾病与T辅助细胞失衡有关,Th2过强容易引起过敏。因此,刺激Th1型免疫应答从而降低Th2型免疫应答,就会减少过敏反应的发生。20世纪80年代以来,过敏性疾病有明显上升的趋势,尤其是在西方国家或大多现代化国家。有学者发现在非常干净卫生的环境中长大的城市小孩比在肮脏环境中长大的农村小孩,罹患过敏行疾病的比例要高得多,因此发现了人的生活环境和过敏性疾病之间的关系,从而提出了“卫生假说”。“卫生假设”认为:幼年时期过少暴露于细菌和病毒等病原体导致对Th1细胞的刺激不充分,从而不能与Th2细胞相平衡,最终导致一种过敏易患体质。依据“卫生假说”的观点,认为适度的微生物刺激是形成机体正常免疫功能和口服耐受所必需,有利于诱导Th0细胞向Th1细胞分化,同时抑制Th2细胞反应,从而起到免疫平衡作用。儿童早期接触的微生物越多,则日后发展出过敏性疾病的机会愈低。但是,环境中存在的致病微生物会让人产生严重的疫病,因此,直接让儿童接触环境微生物实际上也存在很大的风险。

[0004] 益生菌为非致病性微生物,但能刺激肠道的免疫系统,改变Th1/Th2平衡,使免疫反应向Th1细胞方向进行,抑制Th2细胞反应而发挥其免疫调节作用,从而减少过敏性疾病

的发生。此外,益生菌及其代谢产物还有增强肠道屏障功能的作用,减少食物抗原透过肠道粘膜,避免其暴露于免疫系统。益生菌大部分是非病原性革兰氏阳性菌,其细胞壁主要组分为肽聚糖(PG)、细菌多糖(PS)和脂磷壁酸(LTA),它们都有免疫刺激特性。

[0005] 糖尿病是由遗传因素、免疫功能紊乱、微生物感染及其毒素、自由基毒素、精神因素等等各种致病因子作用于机体导致胰岛功能减退、胰岛素抵抗等而引发的糖、蛋白质、脂肪、水和电解质等一系列代谢紊乱综合征。糖尿病是全球最严重的慢性病之一,长期的高血糖会导致人体发生慢性并发症,由此引起血管、神经的慢性损伤,最终可能影响到心脏、肾脏、眼睛和神经,并造成严重的并发症。人体必须通过肠内的关键消化酶( $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶)将食物中的多糖类物质水解成葡萄糖才能被人体吸收,因此,抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶就能减少身体摄入葡萄糖。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶是一种存在于小肠黏膜刷状缘的低聚糖水解酶,能将低聚糖、麦芽糖等水解成葡萄糖,从而促进葡萄糖的吸收,增加血糖含量。因此,通过抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性降低餐后血糖已成为糖尿病临床干预的有效靶点。目前临床上使用的药物主要包括阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇。有资料报道:乳酸菌在培养过程中也能产生一些 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂,因此,服用益生菌既可以通过益生菌在肠道内的生长繁殖消耗葡萄糖,又可以通过其培养过程中所产生的代谢产物( $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂)来降低肠道内的葡萄糖吸收率,从而降低人体血糖。

[0006] 肥胖是指身体的明显超重与脂肪层过厚,是体内脂肪组织积蓄过剩的状态。造成肥胖的原因主要有:过量摄入高热量的食物、运动过少等。当身体的能量摄入超过能量消耗时,造成身体能量过剩而促进了脂肪的累积,就形成了肥胖;此外,疾病、环境、心理、身体毒素偏多等因素造成身体营养失衡、能量代谢失调等,也会形成肥胖。肥胖不仅影响形体美,而且会引发多种疾病,如:高血压、冠心病、心绞痛、脑血管疾病、糖尿病、高脂血症、高尿酸血症、女性月经不调等,还能增加人们患恶性肿瘤的机率,影响消化系统的功能和内分泌系统的功能。

[0007] 人体脂肪的来源主要有两个:一个是直接摄入食物中的脂肪;另一个是利用过量的糖分在体内转化为脂肪。食物中的脂肪在小肠中经各种酶及胆汁酸盐的作用,被分解成脂肪酸、胆固醇和其它脂肪消化产物后,通过小肠壁被吸收进血流,从而使脂肪被人体消化吸收,在人体内有可能被重新合成脂肪;另一方面,当人体摄入的糖分过量时,糖分(如葡萄糖等)也能通过三羧酸循环系统转化为脂肪。因此,抑制三羧酸循环系统的关键酶--柠檬酸裂解酶能减少人体细胞脂肪的合成,从而降低人体的脂肪含量。益生菌在肠道定殖后,在其生长繁殖的过程中,会利用肠道中的脂类(如甘油三酯、胆固醇等)、小分子糖类(如葡萄糖)、氨基酸类或小肽等物质来合成菌体成分,参与营养物质的消化、吸收、代谢功能,充分发挥降低体内脂肪、降低胆固醇的功效,从而降低身体脂肪率,降低体重,降低食物利用率,促进新陈代谢,改善肥胖体质等。多项研究显示:益生菌能通过减少脂肪的合成以及分解多余的油脂,使人体的脂肪不会过度蓄积。

[0008] 申请号为201780023391.0的发明专利“用于降低食物、能量和/或脂肪摄入的双歧杆菌”公布了一种具有降脂减肥功能的动物双歧杆菌;申请号为201680007471.2的发明专利“包含双歧杆菌的免疫调节组合物”公布了一种调节免疫力的组合物;申请号为202010455121.0的发明专利“具有提高免疫力和调节肠道功能的动物双歧杆菌BZ11复合菌剂”公布了一种能提高免疫力的动物双歧杆菌;申请号为201510962576.0的发明专利“一种

增强免疫力的双歧杆菌组合物”公布了一种能增强免疫力的双歧杆菌组合物；申请号为201610280825.2的发明专利“婴儿型双歧杆菌在防治食物过敏食品或者药物中的应用”公布了一种能防治过敏的婴儿双歧杆菌，并将其应用于食品或者药品中；申请号为202010699202.5的发明专利“一株动物双歧杆菌NX-6及其在制备降脂减肥药物中的应用”公布了一种具有减肥功能的动物双歧杆菌；申请号为201811068444.3的发明专利“一种益生菌粉及其制备方法”公布了一种益生菌粉剂的制备方法，这种益生菌制剂包括嗜酸乳杆菌、乳双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌和副干酪乳杆菌等复合益生菌粉及一些辅料，具有提升人体免疫力的作用。这些专利为复合益生菌制剂在降脂减肥、调节免疫力和抗过敏等方面的应用提供了一条新思路。

[0009] 目前，益生菌生产行业在生产各种益生菌菌粉的过程中，几乎全部采用液态发酵，在液态发酵完成后经离心分离或其它的固液分离方法去除水分而得到湿菌体，然后添加干燥保护剂或载体混匀、冷冻干燥、粉碎、造粒、包衣、包装等。由于在固液分离过程中，去除了益生菌在液态发酵过程中所产生的细菌素、有机酸等具有抑菌作用的物质，在产品中无法体现复合菌代谢产物的抑菌效果，因此，这种方法所生产的益生菌产品仅仅利用了益生菌本身的抗过敏、降脂减肥效果，而未能利用其中抑菌物质的抗过敏、降脂减肥效果；此外，由于从液态发酵液中分离得到的湿菌体水分含量高，干燥时菌体应激死亡率高，并且由于在湿菌体中添加适量的干燥保护剂或载体，使得液态发酵的产品在干燥后实际所得到的菌体数量也有所减少。

[0010] 申请号为201310187056.8的发明专利“一种嗜酸乳杆菌的制备方法”公布了一种采用液态发酵和固态发酵结合生产嗜酸乳杆菌的工艺，即首先进行液态发酵，然后利用液态发酵的产物作为菌种与固态培养基混合，再进行固态发酵，产品中含有嗜酸乳杆菌活菌及其代谢产物，例如：双歧菌素、正丁酸、乙酸、甲酸等；申请号为201510559188.8的发明专利“高密度固态发酵培养乳杆菌的培养基及方法”公布了一种固态发酵培养乳杆菌的方法：将乳杆菌菌种按3-5%v/v的接种量接种到培养基中混匀，于30-37℃的条件下密闭发酵。这两个专利采用的菌种都是用三角瓶或小型发酵罐制备的液态菌种，也可以算是“液态培养-固态培养”结合的工艺，即在固态培养基中添加液态培养所获得的液态菌种，混合均匀后进行固态发酵，从而获得固态发酵产品。但由于液态发酵液中的固含量很低(2-5%)，所以即使添加的液态培养液用量达到50%，在固态培养基中也只能加入少量的液态菌种(1-2.5%)作为固态发酵的菌种，从而造成固态发酵培养基中的初始菌体浓度不高，导致固态发酵时间长，产品中活菌浓度小。

[0011] 综上所述，无论是传统的益生菌实际生产工艺“液态培养+离心分离”，还是上述发明的“液态培养+固态培养”工艺，都存在菌种含量低、发酵效果差、干燥时菌体死亡率高因而成品中菌种活力低等缺陷。

[0012] 鉴于此，申请此专利。

## 发明内容

[0013] 为了解决现有技术存在的问题，本发明提供了一种抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂及其制备方法，新制备工艺使产品菌体数量大且活性高，并含有固态培养时菌种所产生的有机酸、细菌素柠檬酸裂解酶抑制剂、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂

等具有抑菌降血糖、减脂降糖能力的代谢产物,还能产生降血糖、;含有细菌多糖等具有增加人体免疫力的代谢产物;以及肽聚糖(PG)、细菌多糖(PS)和脂磷壁酸(LTA)等具有抗过敏效果的代谢产物,能增强复合双歧杆菌制剂在使用时的抗幽门螺杆菌增加免疫力、抗过敏、降血糖、调理肠胃和增加免疫力等多方面的功效。

[0014] 本发明的目的是提供一种抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂。

[0015] 本发明的再一目的是提供上述抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂的制备方法。

[0016] 根据本发明的具体实施方式的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂,所述抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂包括以下组分:

[0017] 两歧双歧杆菌Miuyo-01、婴儿双歧杆菌Miuyo-21、短双歧杆菌Miuyo-31和乳双歧杆菌Miuyo-11。

[0018] 根据本发明的具体实施方式的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂,进一步的,所述抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂按重量份包括以下组分:

[0019] 10-15份两歧双歧杆菌Miuyo-01、5-10份婴儿双歧杆菌Miuyo-21、3-7份短双歧杆菌Miuyo-31和2-6份乳双歧杆菌Miuyo-11。

[0020] 根据本发明的具体实施方式的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂,进一步的,所述抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂按重量份包括以下组分:

[0021] 12-13份两歧双歧杆菌Miuyo-01、7-8份婴儿双歧杆菌Miuyo-21、4-6份短双歧杆菌Miuyo-31和3-5份乳双歧杆菌Miuyo-11。

[0022] 根据本发明的具体实施方式的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂,进一步的,所述抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂按重量份包括以下组分:

[0023] 12.5份两歧双歧杆菌Miuyo-01、7.5份婴儿双歧杆菌Miuyo-21、5份短双歧杆菌Miuyo-31和4份乳双歧杆菌Miuyo-11;优选的,所述复合双歧杆菌制剂的活菌数为 $(4-5) \times 10^{11}$ CFU/g。

[0024] 根据本发明的具体实施方式的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂,进一步的,所述两歧双歧杆菌Miuyo-01、婴儿双歧杆菌Miuyo-21、短双歧杆菌Miuyo-31和乳双歧杆菌Miuyo-11均来自婴儿粪便,从婴儿粪便中分离培养得到。

[0025] 根据本发明的具体实施方式的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂,更进一步的,所述两歧双歧杆菌Miuyo-01、婴儿双歧杆菌Miuyo-21、短双歧杆菌Miuyo-31和乳双歧杆菌Miuyo-11的分离培养条件均为:MRS培养基;pH为6.0-7.5,温度34-40℃。

[0026] 根据本发明的具体实施方式的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂的制备方法,所述方法包括以下步骤:

[0027] (1)按配比将两歧双歧杆菌Miuyo-01、婴儿双歧杆菌Miuyo-21、短双歧杆菌Miuyo-31和乳双歧杆菌Miuyo-11混合均匀,形成复合双歧杆菌,放入液体培养基中进行第一次厌

氧培养,产生的培养液经离心分离后获得复合双歧杆菌湿菌体,备用;

[0028] (2)向步骤(1)得到的所述复合双歧杆菌湿菌体与固体培养基混合,在密封状态下进行第二次厌氧培养,培养完成后进行低温干燥或冷冻干燥或真空干燥,形成复合双歧杆菌固体;

[0029] (3)将步骤(2)得到的复合双歧杆菌固体粉碎、厌氧造粒、厌氧包衣,即得所述抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂。

[0030] 根据本发明的具体实施方式的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂的制备方法,进一步的,步骤(1)中,采用碟式离心机或管式离心机在无菌条件下进行离心分离后获得复合双歧杆菌湿菌体。

[0031] 进一步的,所述液体培养基包括低聚糖、蛋白胨、酵母浸膏和番茄酱。

[0032] 进一步的,所述第一次厌氧培养的温度为36-38℃,时间为48-72小时。

[0033] 根据本发明的具体实施方式的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂的制备方法,进一步的,步骤(2)中,所述固体培养基包括低聚糖、大豆肽、酵母提取物、食品级碳酸钙,所述固体培养基在使用前经过高温干热灭菌,并无菌冷却到38℃以下备用;所述第二次厌氧培养前将所述复合双歧杆菌湿菌体与固体培养基混合物的水分含量调节到45%-55%。

[0034] 根据本发明的具体实施方式的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂的制备方法,进一步的,步骤(2)中,所述第二次厌氧培养的温度为36-38℃,时间为72-120小时;所述低温干燥的温度为30-40℃。

[0035] 进一步的,所述复合双歧杆菌固体的含水率为4-6%。

[0036] 本发明在固态培养完成后不进行菌种或代谢产物的分离操作,而是将培养后的菌种和代谢产物等一起直接进行低温干燥(冷冻干燥或真空干燥)而得到高活力的复合双歧杆菌固体。因此,这种产品中还含有固态培养时菌种所产生的有机酸、细菌素等具有抑菌能力的代谢产物,还能产生降血糖、增加免疫力的代谢产物,能增强复合双歧杆菌制剂在使用时的抗过敏、降血糖、降脂减肥和增加免疫力等多方面的功能效果。

[0037] 本发明使用的复合双歧杆菌制剂包括几种培养条件类似的双歧杆菌,这些双歧杆菌在肠道内的生长过程中都具有抗过敏的功能。通过多菌种的协同作用,可以增加各菌种之间的协同抗过敏效果。

[0038] 本发明所使用的双歧杆菌菌种的特征如下:

[0039] 双歧杆菌属是一种革兰氏阳性、不运动、细胞呈杆状、一端有时呈分叉状、严格厌氧的细菌属,广泛存在于人和动物的消化道、阴道和口腔等生境中。双歧杆菌属的细菌是人和动物肠道菌群的重要组成成员之一。一些双歧杆菌的菌株可以作为益生菌而用在食品、医药和饲料方面。双歧杆菌是一种重要的肠道有益微生物。双歧杆菌作为一种生理性有益菌,对人体健康具有生物屏障、营养作用、抗肿瘤作用、降脂减肥作用、免疫增强作用、改善胃肠道功能、抗过敏、抗衰老等多种重要的生理功能。本发明使用的复合双歧杆菌包括几种培养条件类似的双歧杆菌,例如:两歧双歧杆菌、乳双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、短双歧杆菌等。通过这些双歧杆菌的混合菌接种及混菌培养,可以同时培养获得这4种双歧杆菌的混合物,并通过这些双歧杆菌的协同作用,使得到的复合双歧杆菌制剂产品具有减脂降糖、增加免疫力和抗过敏等多种效果。



[0040] 免疫力是人体自身的防御机制,是人体识别和消灭外来侵入的任何异物(病毒、细菌等)、处理衰老、损伤、死亡、变性的自身细胞以及识别和处理体内突变细胞和病毒感染细胞的能力。当人体免疫功能失调,或者免疫系统不健全时,就容易引起人体疾病,特别是引起感冒、扁桃体炎、哮喘、支气管炎、肺炎、腹泻等疾病的反复发作。医学研究表明:肠道是人体微生物聚集最密集的部位,也是人体最大的免疫器官。人体60%的机体免疫细胞位于肠道粘膜,肠道菌群能促进肠道淋巴组织的成熟和免疫稳态的建立,在免疫调节中起重要作用,也就是说:维持微生态平衡和肠道菌群健康是增加免疫能力的重要因素。益生菌是能在胃肠道正常生长繁殖的有益微生物,补充益生菌有助于恢复肠道微生态平衡,修复肠道菌膜屏障,调节全身免疫功能等,是增强抵抗力、抗击病毒的有效措施。

[0041] 免疫力的测定方法较多,例如:NK细胞活性测定、细胞免疫功能测定、体液免疫功能测定、单核-巨噬细胞功能测定等多种免疫功能检测方法。本发明选用“NK细胞活性测定”或“细胞免疫功能测定”这两种方法进行免疫功能的测定。结果表明,本发明的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂具有较好的降血糖、增加免疫力的效果。

[0042] 本发明中的两歧双歧杆菌Miuyo-01(拉丁名称:Bifidobacterium bifidum)、乳双歧杆菌Miuyo-11(拉丁名称:Bifidobacterium lactis)、婴儿双歧杆菌Miuyo-21(拉丁名称:Bifidobacterium infantis)和短双歧杆菌Miuyo-31(拉丁名称:Bifidobacterium breve),均于2020年10月12日保存于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中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号分别为CGMCC 20866、CGMCC 20867、CGMCC 20868、CGMCC 20869。

[0043] 本发明采用“混合菌接种”、“厌氧液态培养+固液分离+固态培养”的新工艺进行复合双歧杆菌菌体培养,能增强其抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的效果:获得具有更高活力的复合双歧杆菌菌体,同时还能保留固态培养过程中所产生的细菌素和有机酸等抗菌物质,能抑制或杀死幽门螺杆菌和引起肠道感染的细菌,具有抗过敏和降脂减肥的功能;同时,还能产生多种具有降血糖、增加免疫力的代谢产物。此外,固态培养物水分含量较低,容易干燥,能减少复合双歧杆菌在干燥期间的应激死亡,结合适当的厌氧造粒、厌氧包衣工序,能大幅提高产品中复合双歧杆菌的活力。综合采用这些措施生产的复合双歧杆菌制剂可增加产品的抗过敏、降血糖、降脂减肥和增加免疫力等多方面的功能效果。

[0044] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0045] (1) 本发明得到的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂菌体数量大且活性高,并含有复合双歧杆菌所产生的代谢产物;生产的复合双歧杆菌制剂在人体胃肠道中具有更好的抗过敏和降脂减肥的效果;

[0046] (2) 本发明在制备过程中采用液态厌氧培养,产生的培养液经离心分离后获得复合双歧杆菌的湿菌体;再将湿菌体与无菌固体培养基混合,在密封状态下进行第二次固态厌氧培养;固态培养完成后进行低温干燥而得到高活力复合双歧杆菌固体。

[0047] (3) 本发明得到的复合双歧杆菌制剂菌具体的具有以下优点:

[0048] ①活菌数高

[0049] 采用多种双歧杆菌接种,混合厌氧培养,且由于液态厌氧培养后离心分离出来的湿菌体在固态培养基中再进行一段时间的厌氧固态培养,菌体数量会大幅增加,活力也明显增加;



[0050] ②干燥应激小,菌种干燥损失小

[0051] 固态培养物含水量仅为45-55%,远低于液态培养物得到的湿菌体,因此,干燥固态培养物对所造成的损伤和死亡率要远低于液态培养物,使发明所得到的产品活菌数能达到 $10^{11}$ cfu/g以上;

[0052] ③产品中含有菌种固态培养过程中所产生的多种代谢产物

[0053] 在菌种固态培养的过程中会产生 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂、细菌多糖、肽聚糖和脂磷壁酸等多种代谢产物。与传统方法制备的复合双歧杆菌制剂相比,含有代谢产物的复合双歧杆菌制剂在人体胃肠道中具有更好的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥效果。

### 具体实施方式

[0054] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明的技术方案进行详细的描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所得到的所有其它实施方式,都属于本发明所保护的范围。

[0055] 在一些较为具体的实施例中,所述抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂按重量份包括以下组分:10-15份两歧双歧杆菌Miuyo-01、5-10份婴儿双歧杆菌Miuyo-21、3-7份短双歧杆菌Miuyo-31和2-6份乳双歧杆菌Miuyo-11。

[0056] 在另一些具体的实施例中,所述抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂按重量份包括以下组分:

[0057] 12-13份两歧双歧杆菌Miuyo-01、7-8份婴儿双歧杆菌Miuyo-21、4-6份短双歧杆菌Miuyo-31和3-5份乳双歧杆菌Miuyo-11;

[0058] 制备方法包括以下步骤:

[0059] (1)按配比将两歧双歧杆菌Miuyo-01、婴儿双歧杆菌Miuyo-21、短双歧杆菌Miuyo-31和乳双歧杆菌Miuyo-11混合均匀,形成复合双歧杆菌,放入液体培养基中进行第一次厌氧培养,产生的培养液经离心分离后获得复合双歧杆菌湿菌体,备用;

[0060] (2)向步骤(1)得到的所述复合双歧杆菌湿菌体与固体培养基混合,在密封状态下进行第二次厌氧培养,培养完成后进行低温干燥,形成复合双歧杆菌固体;

[0061] (3)将步骤(2)得到的复合双歧杆菌固体粉碎、厌氧造粒、厌氧包衣,即得所述抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥的复合双歧杆菌制剂。

[0062] 步骤(1)中,采用碟式离心机或管式离心机在无菌条件下进行离心分离后获得复合双歧杆菌湿菌体;所述液体培养基包括低聚糖、蛋白胨、酵母浸膏和番茄酱;所述第一次厌氧培养的温度为36-38℃,时间为48-72小时。

[0063] 步骤(2)中,所述固体培养基包括低聚糖、大豆肽、酵母提取物、食品级碳酸钙,所述固体培养基在使用前经过高温干热灭菌,并无菌冷却到38℃以下备用;所述第二次厌氧培养前将所述复合双歧杆菌湿菌体与固体培养基混合物的水分含量调节到45%-55%;步骤(2)中,所述第二次厌氧培养的温度为36-38℃,时间为72-120小时;所述低温干燥的温度为30-40℃;所述复合双歧杆菌固体的含水率为4-6%。

[0064] 以下为更为具体的实施例:

[0065] 实施例1菌株的分离、菌种特性与鉴定

[0066] 1.1样品采集:

[0067] 选择出生后3个月-1年、近期末使用过抗菌药物的健康婴儿,从其粪便中采集样品进行分离,即所分离的菌株来自于健康婴儿的肠道。

[0068] 1.2菌株的分离

[0069] 取婴儿粪便样品5-10g,置于无菌的50ml离心管中,加入20ml无菌生理盐水,振荡混匀后置于37℃厌氧培养箱中,静置培养过夜,吸取1ml样液,以无菌生理盐水依次进行10倍梯度稀释至 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ ,每个梯度分别取100 $\mu$ l菌悬液涂布于改良MRS平板上,放置于37℃厌氧培养箱中倒置培养,24h后,从不同梯度的涂布的培养平板中挑选菌落转接培养,在此基础上,挑取符合双歧杆菌典型特征的菌落在改良MRS平板上进行反复划线培养分离,挑取符合双歧杆菌菌落生长形态的单菌落接入改良MRS液态培养基中,于37℃厌氧培养箱中培养。最后获得4株具有良好生长性能的菌株。

[0070] 1.3菌株的鉴定

[0071] 1.3.1菌落形态与生理生化实验分析

[0072] 菌落形态和细胞形态观测实验、微生物生化分析实验等参考文献(1)和(2)的方法进行:

[0073] (1)秦玲玲等.双歧杆菌的分离与培养.齐齐哈尔大学学报.2008(3);

[0074] (2)赵笑笑等.婴幼儿粪便中双歧杆菌的分离及其菌株特性研究.工业微生物.2019(2)。

[0075] 实验结果见表1、表2和表3:

[0076] 表1菌落和细胞的形态特征

菌株名称	菌落形态	细胞形态	运动性
[0077] 两歧双歧杆菌 Miuyo-01	菌落光滑,凸圆,边缘完整,呈乳脂状白色,闪光,质地柔软。	细胞呈现Y字型、V字型、弯曲状、刮勺状等,末端常出现分叉,无芽孢、无夹膜。	不运动
乳双歧杆菌 Miuyo-11	菌落光滑,凸圆,边缘完整,呈乳脂状白	细胞呈现Y字型、V字型、弯曲状、刮勺状等,末端	不运
	色,闪光,质地柔软。	常出现分叉,无芽孢、无夹膜。	动
[0078] 婴儿双歧杆菌 Miuyo-21	菌落光滑,凸圆,边缘完整,呈乳脂状白色,闪光,质地柔软。	细胞呈现Y字型、V字型、弯曲状、刮勺状等,末端常出现分叉,无芽孢、无夹膜。	不运动
短双歧杆菌 Miuyo-31	菌落光滑,凸圆,边缘完整,呈乳脂状白色,闪光,质地柔软。	细胞呈现Y字型、V字型、弯曲状、刮勺状等,末端常出现分叉,无芽孢、无夹膜。	不运动

[0079] 双歧杆菌专性厌氧,最适生长温度是37℃~41℃,在25℃~28℃或43℃~45℃也

能生长。最适生长pH值为6.7~7.0,在pH5.0或高于8.0不生长。药敏实验对多种抗生素敏感,如氯霉素、四环素、红霉素等,但对氨苄青霉素、庆大霉素、痢特灵、丁胺卡那霉素、新霉素、环丙沙星等抗生素耐受。

[0080] 表2菌株的生化分析结果

菌株名称	明胶液化试验	H2O2 酶活性试验	硝酸盐还原实验	吲哚反应	革兰氏染色
[0081] 两歧双歧杆菌 Miuyo-01	—	—	—	—	+
乳双歧杆菌 Miuyo-11	—	—	—	—	+
婴儿双歧杆菌 Miuyo-21	—	—	—	—	+
短双歧杆菌 Miuyo-31	—	—	—	—	+

[0082] 注:“+”为阳性;“—”为阴性。

[0083] 表3糖类发酵试验

菌株名称	葡萄糖	蔗糖	果糖	麦芽糖	乳糖	棉籽糖	木糖	海藻糖	纤维二糖	山梨醇	甘露醇
[0084] 两歧双歧杆菌 Miuyo-01	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
乳双歧杆菌 Miuyo-11	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
婴儿双歧杆菌 Miuyo-21	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
短双歧杆菌 Miuyo-31	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—

[0085] 注:“+”为阳性;“—”为阴性。

[0086] 大部分都能发酵葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖、乳糖等;不能发酵棉籽糖、木糖、海藻糖、纤维二糖、山梨醇、甘露醇等。发酵葡萄糖时产酸、不产气。

[0087] 1.3.2 16S rRNA部分序列分析

[0088] 将筛选菌株的基因组DNA进行PCR扩增,用1%琼脂糖进行凝胶电泳检测。使用细菌通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'),1492R(5'-GGTTACCTGTTCGACTT-3')进行PCR扩增,纯化后测序,得到的PCR产物序列,并进行菌种鉴定。

[0089] 综合菌落形态分析、生理生化实验分析和16S rRNA部分序列分析的结果,将本发明分离纯化所得到的4个菌株分别鉴定为:两歧双歧杆菌、乳双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、短双歧杆菌,并分别命名为:“两歧双歧杆菌Miuyo-01”、“乳双歧杆菌Miuyo-11”、“婴儿双歧杆菌Miuyo-21”、“短双歧杆菌Miuyo-31”。

[0090] 实施例2菌株的特性

[0091] 2.1产品中活菌数的测定方法

[0092] 用灭菌生理盐水梯度稀释至一定倍数后,采用改良MRS琼脂培养基平板倾注法,37℃培养48h后计菌落总数。

[0093] 2.2在不同pH下的生长情况

[0094] 将经过活化的上述5株菌种接种于改良MRS液体培养基中,培养后得到菌种种子液,取1mL种子液接种于19mL pH分别为6.0、6.5、7.0和7.5的改良MRS液体培养基中,在37℃下厌氧培养24h,测定初始和结束后的OD600值(即在600nm波长处的吸光度值,通常可以用

来比较培养液中的菌体细胞密度或菌体生长情况),以pH7.0的OD600值作对照(即以pH7.0培养的菌数为100%计),按照下列公式计算不同pH培养基中的菌体生长情况:

[0095] 菌体生长情况(%) = (其它pH培养的OD)/pH7.0培养的OD × 100%。

[0096] 结果见表4:

[0097] 表4各菌种在不同pH培养基中的生长情况

[0098]	菌种	菌体生长情况(%)						
		pH						
		空白对照 (不培养)	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
[0099]	两歧双歧杆菌 Miuyo-01	0.1	33.6	45.8	76.3	88.5	100	92.1
	乳双歧杆菌 Miuyo-11	0.1	36.6	48.2	78.5	92.1	100	93.2
	婴儿双歧杆菌 Miuyo-21	0.1	35.1	45.9	76.2	89.3	100	91.8
	短双歧杆菌 Miuyo-31	0.1	33.2	43.6	72.6	88.3	100	92.2

[0100] 结果如表4所示,在初始pH6.0、6.5和7.5的培养基中培养得到的菌液,与pH7.0的培养基培养的菌液OD值相比,有一定程度的降低,但与不进行培养的空白对照组比较,仍然具有较高的生长速率。因此,各菌种在pH6.0、7.5的pH环境下仍然具有一定的生长能力。

[0101] 将上述在pH7.0条件培养的各菌种,经过离心分离、磷酸缓冲液(PBS)洗涤2次后用PBS重悬。取1mL重悬液分别与9mL pH2.0、2.5、3.0人工胃液混合,在37℃处理3h,然后分别测定处理前后的复合双歧杆菌总数。

[0102] 以未经人工胃液处理的菌数作对照,按照下列公式计算人工胃液处理前后的存活率:

[0103] 存活率(%) = (处理前的菌数-处理后的菌数)/处理前的菌数 × 100%。

[0104] 结果见表5:

[0105] 表5各菌种在不同pH人工胃液处理后的存活率

[0106]	菌种	存活率(%)		
		pH		
		2.0	2.5	3.0
	两歧双歧杆菌 Miuyo-01	35.2	36.6	38.2
	乳双歧杆菌 Miuyo-11	35.3	37.2	38.6
	婴儿双歧杆菌 Miuyo-21	31.5	37.6	38.3
	短双歧杆菌 Miuyo-31	33.8	36.5	39.7

[0107] 结果如表5所示,在pH7.0培养得到的菌体,经过不同pH的人工胃液处理后,存活率为30-40%之间,存活率较低。因此,通常需要采取包衣的形式才能在正常的食用条件下以

活菌形式进入肠道。

[0108] 各菌种在pH6.0-7.5之间的环境下培养生长良好,最适pH为7.0。在pH7.0培养得到的菌体,置于pH2.0的人工胃液中3h的存活率低于40%。

[0109] 2.3在不同温度下的生长情况

[0110] 将经过活化的各菌种接种于改良MRS液体培养基中,培养后得到菌种种子液,取1mL各菌种种子液接种于19mL pH分别为7.0的改良MRS液体培养基中,分别在31℃、34℃、37℃、40℃的温度下厌氧培养24h,测定初始和结束后的OD600值。

[0111] 以最适生长温度时的OD600值作对照(即以生长速度最大时培养的菌数为100%计),按照下列公式计算不同温度的菌体生长情况:

[0112] 菌体生长情况(%) = 其它温度时培养的菌数/最适生长温度时培养的菌数 × 100%。

[0113] 根据实验,各种双歧杆菌的最适生长温度均为37℃,其不同温度下的生长情况见表6:

[0114] 表6各菌种在不同温度下的生长情况

菌种	菌体生长情况(%)				
	温度(℃)				
	对照(不培养)	31	34	37	40
[0115] 两歧双歧杆菌 Miuyo-01	0	86.3	96.5	100	82.2
乳双歧杆菌 Miuyo-11	0	78.7	91.8	100	86.2
婴儿双歧杆菌 Miuyo-21	0	75.3	90.9	100	83.4
短双歧杆菌 Miuyo-31	0	76.1	89.2	100	86.5

[0116] 根据表6的实验结果,可以得出如下的结论:

[0117] 各种双歧杆菌的最适生长温度均为37℃,具有与人体体温类似的最适生长温度。其在31~40℃温度环境下也生长良好,具有在良好的耐温性;

[0118] 综上所述:本发明所分离纯化的上述5种菌株在pH7.0时生长良好,在pH6.0-7.5之间仍然有一定的生长速度;最适生长温度均为37℃,在31-40℃之间仍然有一定的生长速度。

[0119] 2.4复合菌株的功能效果

[0120] 本发明的复合菌株是由两歧双歧杆菌Miuyo-01、乳双歧杆菌Miuyo-11、婴儿双歧杆菌Miuyo-21和短双歧杆菌Miuyo-31等4株双歧杆菌组成,因而,复合菌株也具有各种双歧杆菌所具有的功能效果。本发明通过各种功能实验,确认了复合菌株的功能效果。

[0121] 2.4.1复合双歧杆菌的抗过敏效果

[0122] 参考文献的方法(刘志刚等.Balb/c小鼠花生过敏模型的建立及发病机理.深圳大学学报理工版.2012(2)),采用小鼠试验测定复合双歧杆菌的抗过敏效果。

[0123] 2.4.2复合双歧杆菌的增加免疫力效果

[0124] 参考文献的方法(范治云等.全蝎保健酒的增强免疫力功能研究.食品研究与开发.2017(19)),采用人体试验的方法,确认了复合双歧杆菌增加免疫力的功能效果。

[0125] 2.4.3复合双歧杆菌的降血糖效果

[0126] 参考朱运平的方法(朱运平等.产 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂菌株筛选及固态发酵条件优化.食品工业科技.2014(3)),测定其 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率,并采用人体试验确认了其降血糖的效果。

[0127] 2.4.4复合双歧杆菌的降脂减肥效果

[0128] 参考文献的方法(李建新等.苹果多酚的减肥降脂作用研究.食品科学.2008(8)),采用小鼠试验测定其降脂减肥效果。

[0129] 实验结果见表7:

[0130] 表7各菌株的功效实验方法及结果(具体数据见实施例7、8、9、10)

	试验方法	试验结果
[0131]	采用小鼠试验测定血清中总 IgE 抗体含量。	与对照组相比有显著差异,具有良好的抗过敏效果。
	小鼠 NK 细胞活性和对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化反应	与对照组相比有显著差异,具有增加人体免疫力功能的效果。
	$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制测定;降低人体空腹血糖和餐后血糖实验	体外实验具有良好的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制效果;人体实验具有良好的降低人体空腹血糖和餐后血糖的效果。
[0132]	小鼠体重测定、李氏指数测定、血脂测定等。	与对照组相比有显著差异,具有降低体重、降低血脂效果。

[0133] 实施例3液态法制备的复合双歧杆菌原粉及其制剂

[0134] 3.1培养基

[0135] (1)改良MRS固体培养基(用于斜面培养和平板培养,在分离和保存菌种时使用):

[0136] 葡萄糖20g/L,蛋白胨10g/L,牛肉浸膏10g/L,酵母浸膏5g/L,琼脂15g/L,K2HP04 2g/L,柠檬酸氢二铵2g/L,乙酸钠5g/L,Tween-80 1g/L,MgS04.7H200.5g/L,MnS04.4H20 0.05g/L,L-半胱氨酸盐酸盐0.5g/L。

[0137] 用1mol/L NaOH调节pH为7.0,121℃高温杀菌20min,冷却到40℃左右倒斜面或平板。

[0138] (2)改良MRS液体培养基(用于三角瓶培养和发酵罐培养):

[0139] 葡萄糖粉20g/L,蛋白胨粉10g/L,牛肉浸膏10g/L,酵母浸膏5g/L,乳清粉10g/L,番茄酱10g/L,K2HP04 2g/L,柠檬酸氢二铵2g/L,乙酸钠5g/L,Tween-80 1g/L,MgS04.7H20 0.5g/L,MnS04.4H20 0.05g/L,L-半胱氨酸盐酸盐0.5g/L。

[0140] 用1mol/L NaOH调节pH为7.0,121℃高温杀菌20min。

[0141] 3.2液态法复合双歧杆菌制备方法

[0142] 本制法属于传统的益生菌制备方法,在此用作本专利的对照,是采用液态培养、离心分离后直接干燥得到的产品,没有经过固态培养,其制法包括以下步骤:

[0143] (1)菌种培养

[0144] 使用上述改良MRS固体培养基进行复合双歧杆菌菌种的斜面培养或平板培养,所使用的菌种包括:

[0145] 两歧双歧杆菌Miuyo-01、乳双歧杆菌Miuyo-11、婴儿双歧杆菌Miuyo-21、短双歧杆菌Miuyo-31等4种。

[0146] (2)三角瓶培养或菌种罐培养:

[0147] 将斜面或平板培养得到的各菌种分别接种于三角瓶改良MRS液体培养基中,于厌氧培养箱中在37℃下培养24h得到三角瓶液体菌种。

[0148] (3)液态培养:

[0149] 按照“某种菌种液:液体培养基=1:100”的比例接种上述5种菌种,全部接种于发酵罐,这样总接种量为5:100,在发酵罐中37℃下厌氧液态培养24h,获得菌体培养液。

[0150] (4)离心分离:

[0151] 将上述液态培养液用管式离心机或碟式离心机进行分离,离心机转速为10000r/min,离心时间为20min,得到湿菌体,水分含量为80%。

[0152] (5)干燥

[0153] 将湿菌体置于冷冻干燥机中在-40℃冷冻干燥20h即得到液态法复合双歧杆菌原粉;经测定:本发明制备所得的复合双歧杆菌原粉产品,其总菌数为 $2.89 \times 10^{11}$ CFU/g。

[0154] (6)造粒、包衣和包装。

[0155] 在复合双歧杆菌原粉中加入适量的辅料(如:海藻糖、脱脂奶粉等),即得到液态法制备的复合双歧杆菌制剂产品;

[0156] 经测定:本实例所制备的复合双歧杆菌产品,其总菌数为 $2.18 \times 10^{11}$ CFU/g。

[0157] 实施例4固态法制备的复合双歧杆菌原粉及其制剂(固态法1)

[0158] 4.1培养基

[0159] (1)改良MRS固体培养基(用于斜面培养和平板培养):

[0160] 葡萄糖20g/L、蛋白胨10g/L、牛肉浸膏10g/L、酵母浸膏5g/L、琼脂15g/L、K2HP04 2g/L、柠檬酸氢二铵2g/L、乙酸钠5g/L、Tween-80 1g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/L、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.05g/L,L-半胱氨酸盐酸盐0.5g/L。用1mol/L NaOH调节pH为7.0,121℃高温杀菌20min。

[0161] (2)改良MRS液体培养基(用于三角瓶培养和发酵罐培养):

[0162] 葡萄糖20g/L、蛋白胨10g/L、牛肉浸膏10g/L、酵母浸膏5g/L、乳清粉10g/L、番茄酱10g/L、K2HP04 2g/L、柠檬酸氢二铵2g/L、乙酸钠5g/L、Tween-80 1g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/L、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.05g/L,L-半胱氨酸盐酸盐0.5g/L。用1mol/L NaOH调节pH为7.0,121℃高温杀菌20min。

[0163] (3)固体培养的培养基(用于固态培养):

[0164] 按照下列配方的比例准备固态培养的原料:

[0165] 湿菌体100g、葡萄糖20g、蛋白胨粉10g、酵母浸出物粉10g、乳清粉10g、番茄粉10g、K2HP04 2g、L-半胱氨酸盐酸盐0.5g/L,食品级碳酸钙2g。

[0166] 除了湿菌体外,其余各种原料分别杀菌(分别用高温瞬时杀菌设备在150℃杀菌10s),冷却后无菌混合均匀,作为固态培养基的原料备用。

[0167] 4.2菌剂的制备方法

[0168] 本发明的复合双歧杆菌菌剂的制备方法,包括以下步骤:



- [0169] (1) 菌种培养:
- [0170] 使用上述改良MRS固体培养基进行菌种的斜面培养或平板培养。
- [0171] (2) 三角瓶培养或菌种罐培养:
- [0172] 将斜面或平板培养得到的菌种接种于三角瓶改良MRS液体培养基中,于厌氧培养箱中在37℃下培养24h得到三角瓶液体菌种,
- [0173] (3) 液态培养:
- [0174] 采用上述三角瓶液体菌种或种子罐液体菌种接种于发酵罐,在发酵罐中37℃下厌氧液态培养24h,获得菌体培养液;
- [0175] (4) 离心分离:
- [0176] 将上述液态培养液用管式离心机或碟式离心机进行分离,离心机转速为10000r/min,离心时间为20min,得到湿菌体,水分含量为80%;立即将湿菌体转入固体培养基培养;
- [0177] (5) 固态培养:
- [0178] 在无菌室按照配方将上述湿菌体与无菌的固体培养基混合,其配方为:
- [0179] 湿菌体100g、葡萄糖20g、蛋白胨粉10g、酵母浸出物粉10g、乳清粉10g、番茄粉10g、K2HP04 2g、L-半胱氨酸盐酸盐0.5g/L,食品级碳酸钙2g,控制固体培养基的水分含量为50%-55%。然后置于厌氧固态发酵罐中,在37℃下密封厌氧固态培养72h。
- [0180] (6) 干燥:
- [0181] 在-40℃下冷冻干燥20h,即得到复合双歧杆菌原粉。
- [0182] 经测定:本发明制备所得的复合双歧杆菌原粉产品,其总菌数为 $4.13 \times 10^{11}$ CFU/g。
- [0183] (7) 造粒、包衣和包装。
- [0184] 将复合双歧杆菌原粉造粒、包衣,即得到复合双歧杆菌制剂产品。
- [0185] 经测定:本实例所制备的复合双歧杆菌制剂产品,其总菌数为 $3.25 \times 10^{11}$ CFU/g。
- [0186] 实施例5固态法制备的复合双歧杆菌制剂(固态法2)
- [0187] 实施例5的工艺操作与实施例4基本相同,仅更改部分操作参数,用于说明在不同的操作条件下生产的固态培养复合双歧杆菌产品的效果。
- [0188] 5.1 培养基
- [0189] 实施例4的固体培养基未加乳清粉,其他同实施例4。
- [0190] 5.2 菌剂的制备方法
- [0191] 实施例5控制固体培养基的水分含量为52%,在37℃下密封厌氧固态培养96h。采用冷冻干燥方法对固体培养物进行干燥,其他步骤同实施例4,分别制成原粉产品和制剂产品。
- [0192] 经测定:本实施例所制备的复合双歧杆菌原粉产品总菌数为 $4.92 \times 10^{11}$ CFU/g;将其制成制剂所得到的制剂产品的总菌数为 $4.38 \times 10^{11}$ CFU/g。
- [0193] 实施例6固态法制备的复合双歧杆菌制剂(固态法3)
- [0194] 6.1 培养基
- [0195] 实施例6培养基同实施例4。
- [0196] 6.2 菌剂的制备方法
- [0197] 三角瓶培养、液体培养和固体培养的温度为37℃,控制固体培养基的水分含量为55%,在37℃下密封厌氧固态培养120h,其他参数同实施例4,分别制成原粉产品和制剂产

品。

[0198] 经测定:本实施例所制备的复合双歧杆菌原粉产品总菌数为 $4.67 \times 10^{11}$ CFU/g;将其制成制剂所得到的制剂产品的总菌数为 $4.05 \times 10^{11}$ CFU/g。

[0199] 本发明的制备方法中,若发酵罐培养基较大,可将三角瓶液体菌种再接种于1-3级菌种罐中扩大培养,从而获得用于发酵罐的液体菌种,小规模培养则直接只用三角瓶培养的菌种进行接种。

[0200] 实施例7复合双歧杆菌的抗敏效果

[0201] 参考文献的方法(刘志刚等.Balb/c小鼠花生过敏模型的建立及发病机理.深圳大学学报理工版.2012(2)),采用小鼠试验测定复合双歧杆菌的抗过敏效果,方法如下:

[0202] 7.1实验方法

[0203] 一、实验材料:

[0204] 试验动物:选用SPF级Balb/c雌性小鼠,5-6周龄(体重18-20g),共120只,随机分为8组,每组15只。

[0205] 花生粗蛋白(crude peanut extract protein,CPE),按文献的方法自制。

[0206] 磷酸缓冲盐溶液(PBS),pH 7.2~7.4。

[0207] 二、试验方法:

[0208] 1、剂量与分组:

[0209] 每组小鼠分别用空白对照组(不致敏和也不用复合双歧杆菌治疗)、模型组或阳性对照组(用花生粗蛋白致敏、不用复合双歧杆菌制剂治疗)、其余各组均用花生组蛋白致敏,且均使用本发明制备得到的复合双歧杆菌制剂进行灌胃治疗,其复合双歧杆菌用量分别为:液态法对照组(实施例3)、本发明的固态法实验组实施例4、实施例5、实施例6,剂量均为0.1g/ml,详见表8。每日2次,所有小鼠连续服用10天。

[0210] 2、小鼠的致敏和激发:

[0211] 先分出10只小鼠作为空白对照组,空白对照组采用PBS缓冲溶液注射,不致敏;其余所有小鼠均采用花生粗蛋白溶液注射致敏,然后选出过敏的小鼠,将其随机分组,每组10只,多余的小鼠废弃不用。每日按表6的样品和剂量用复合双歧杆菌溶液对过敏小鼠进行灌胃治疗,连续灌胃10天,阴性对照组和阳性对照组用无菌纯净水灌服。

[0212] Balb/c小鼠分为空白对照组和花生致敏模型组(简称模型组,为阳性对照组),每组10只,致敏方式:模型组皮下注射致敏两次,间隔3周,每次注射100 $\mu$ g花生粗蛋白和1mg氢氧化铝佐剂;第2次免疫1周后,皮下注射200 $\mu$ g CPE进行激发,PBS对照组用相同体积溶液的PBS溶液代替花生粗蛋白,其它与模型组相同。

[0213] 3、血清中总IgE抗体的检测:

[0214] 复合双歧杆菌制剂喂养实验结束后,将各剂量组小鼠取血,室温静置2h后,于4000r/min离心10min,小心取出上层血清。血清中总IgE抗体的含量采用ELISA试剂进行检测,参照产品说明书进行。

[0215] 7.2相同重量浓度下产品的抗过敏效果对比

[0216] 分别称取上述各组样品各1g,加入10mL无菌水,配成0.1g/mL的复合双歧杆菌溶液,备用。

[0217] 测量血清中总IgE抗体的含量,测定结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。本实验采用

SPSS 24.0软件对实验数据进行单因素方差分析(ANOVA),用LSD法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异显著性判断标准,结果见表8:

[0218] 表8相同重量浓度下不同工艺生产的复合双歧杆菌产品的抗过敏效果

产品	双歧杆菌剂量	IgE (ng/ml)	P 值
模型组(阳性对照)	0	916±13	—
空白对照组(阴性对照)	0	786±6	0.000**
实施例3原粉	0.1g/ml	878±12	0.012*
[0219] 实施例4原粉	0.1g/ml	885±18	0.035*
实施例3制剂	0.1g/ml	892±21	0.094
实施例4制剂	0.1g/ml	865±26	0.002**
实施例5制剂	0.1g/ml	821±13	0.000**
实施例6制剂	0.1g/ml	833±15	0.000**

[0220] IgE介导的过敏反应是引起过敏的主要原因,血清中IgE抗体是过敏反应发生的关键作用因子。从空白对照组和模型组小鼠血清中总IgE抗体含量可以看出小鼠IgE变化与过敏症状是对应的,即空白小鼠的血清IgE抗体含量较低,而模型组小鼠的血清IgE抗体含量很高。而经过复合双歧杆菌灌胃治疗后,各个复合双歧杆菌治疗组均表现出良好的治疗过敏的效果。

[0221] 当制剂中含有相同重量浓度的复合双歧杆菌时,复合双歧杆菌实施例3、4、5、6制备所得的菌剂的IgE较空白对照组的IgE值更大,具有显著差异;而固态法制备所得菌剂(实施例4、5、6)的抗过敏效果比液态法(实施例3)更好,都具有非常显著的差异。因此,由固态法制备的实例4、实例5、实例6所生产的复合双歧杆菌制剂对减少小鼠的过敏症状具有特别显著的效果。

[0222] 复合双歧杆菌制剂产品与复合双歧杆菌原粉产品相比,其抗过敏效果略差,其原因可能是复合双歧杆菌在制剂过程中会略有损失造成的,但制剂产品更方便人们服用。

[0223] 7.3相同菌数时产品的抗过敏效果对比

[0224] 分别称取复合双歧杆菌成品1g,加入适量无菌水,经菌数测定后,加入无菌水调整复合双歧杆菌总数浓度为 $1 \times 10^{10}$ CFU/ml,每次服用10ml,故每次服用的复合双歧杆菌总数为 $10 \times 10^{10}$ CFU,即 $1 \times 10^{11}$ CFU。

[0225] 抗过敏的实验方法见7.1。

[0226] 测量血清中总IgE抗体的含量,测定结果以“平均值±标准差”表示。本实验采用SPSS 24.0软件对实验数据进行单因素方差分析(ANOVA),用LSD法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异显著性判断标准,结果见表9:

[0227] 表9相同菌数时复合双歧杆菌产品的抗过敏效果

产品	双歧杆菌剂量	IgE (ng/ml)	P 值
模型组(阳性对照)	0	916±13	—
空白对照组(阴性对照)	0	786±6	0.000**
[0228] 实施例 3 原粉	1x10 <sup>11</sup> CFU	885±11	0.012*
实施例 4 原粉	1x10 <sup>11</sup> CFU	893±13	0.035*
实施例 3 制剂	1x10 <sup>11</sup> CFU	898±9	0.094
实施例 4 制剂	1x10 <sup>11</sup> CFU	878±15	0.002**
实施例 5 制剂	1x10 <sup>11</sup> CFU	835±11	0.000**
实施例 6 制剂	1x10 <sup>11</sup> CFU	848±12	0.000**

[0229] 如表9所示,当制剂中含有相同菌数时,复合双歧杆菌实施例3、4、5、6制备所得的菌剂的IgE较空白对照组的IgE值更大,具有显著差异;而固态法制备所得菌剂(实施例4、5、6)的抗过敏效果比液态法(实施例3)更好,都具有非常显著的差异。因此,由固态法制备的实例4、实例5、实例6所生产的复合双歧杆菌制剂对减少小鼠的过敏症状具有特别显著的效果。复合双歧杆菌制剂产品与复合双歧杆菌原粉产品相比,其抗过敏效果略差。

[0230] 复合双歧杆菌的抗过敏作用,如果仅仅是活菌的效果,那么当采用相同的菌数时应该具有大致相同的抗过敏效果,但表9的结果表明:与液态法所制备的复合双歧杆菌菌剂相比,本发明的实施例4、5、6采用固态法制备的复合双歧杆菌菌剂所产生的IgE值更大,说明其抗过敏的效果更明显。液态法在制备过程中由于离心分离去除了液态培养过程所产生的代谢产物,所以其抗过敏效果主要来自于菌种本身;而本发明制备所得菌剂中除了含有复合双歧杆菌具体外,还含有固态培养过程中所产生的细菌素、有机酸等代谢产物,复合双歧杆菌与代谢产物协同增效,提高了菌剂整体的抗过敏效果。

[0231] 实例8:复合双歧杆菌的增加免疫力效果对比

[0232] 8.1复合双歧杆菌制剂对NK细胞活性的影响

[0233] 8.1.1实验方法

[0234] 一、实验材料:

[0235] 试验动物:选用SPF级昆明种雌性小鼠,6-8周龄(体重18-22g),共120只,随机分为8组,每组15只。

[0236] 其它材料:小鼠淋巴瘤细胞(YAC-1)、Hank's液、RPMI1640完全培养液、LDH基质液等。

[0237] 二、试验方法:

[0238] 1、剂量与分组:

[0239] 每组小鼠分别用阴性对照组(纯水)、液态法对照组(实施例3)、本发明的固态法实验组实施例4、实施例5、实施例6,剂量均为0.1g/ml。每日2次,所有小鼠连续服用30天。

[0240] 2、灌喂方法:

[0241] 实验时分别取样品用纯净水配制成20ml的样液,分别供动物灌胃使用。动物在实验室条件下适应3天后,随机分组,每日按表4的样品和剂量进行灌胃,连续灌胃30天,对照组灌服无菌纯净水。

[0242] 3、效应细胞(小鼠脾细胞)的制备:

[0243] 复合双歧杆菌制剂喂养实验结束后,将各剂量组小鼠无菌取脾,置于盛有适量无菌Hank's液的小平皿中,用镊子轻轻将脾磨碎,制成单细胞悬液。经200目筛网过滤,或用4层纱布将脾磨碎,或用Hank's液洗2次,每次离心10min(1000r/min)。弃上清将细胞浆弹起,加入0.5mL灭菌水20秒,裂解红细胞后再加入0.5mL 2倍Hank's液及8mL Hank's液,1000rpm,10min离心,用1mL含10%小牛血清的RPMI1640完全培养液重悬,用1%冰醋酸稀释后计数(活细胞数应在95%以上),用台酚兰染色计数活细胞数(应在95%以上),最后用RPMI1640完全培养液调整细胞浓度为 $2 \times 10^7$ 个/mL。

[0244] 4、靶细胞(YAC-1细胞)的传代

[0245] 实验前24h将靶细胞进行传代培养。应用前以Hank's液洗3次,用RPMI1640完全培养液调整细胞浓度为 $4 \times 10^5$ 个/mL。

[0246] 5、NK细胞活性测定(LDH法)

[0247] 取浓度为 $4 \times 10^5$ 个/mL的靶细胞(YAC-1)和效应细胞(小鼠脾细胞)各100 $\mu$ l(效靶比50:1),加入U型96孔培养板,靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各100 $\mu$ l,靶细胞最大释放孔加靶细胞和1% NP40各100 $\mu$ l;上述各项均设3个复孔,于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养4小时,然后将96孔培养板以1500r/min离心5分钟,每孔吸取上清100 $\mu$ l置平底96孔培养板中,同时加入LDH基质液100 $\mu$ l,反应3分钟,每孔加入1mol/L HCl 30 $\mu$ l,在酶联仪492nm处测定光密度值。

[0248] 按下式计算NK细胞活性:

[0249] 
$$\text{NK细胞活性}(\%) = (\text{反应孔OD} - \text{自然释放孔OD}) / (\text{最大释放孔OD} - \text{自然释放孔OD}) \times 100\%$$

[0250] 受试样品组的NK细胞活性显著高于阴性对照组的NK细胞活性,即可判定该项实验结果阳性。

[0251] 8.1.2相同重量浓度下产品的增加免疫力效果对比(对小鼠NK细胞活性的影响)

[0252] 分别称取上述各组样品各1g,加入10mL无菌水,配成0.1g/mL的复合双歧杆菌溶液,备用;阴性对照组只用无菌水,不用复合双歧杆菌。

[0253] 测量复合双歧杆菌对小鼠NK细胞活性的影响,测定结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。本实验采用SPSS 24.0软件对实验数据进行单因素方差分析(ANOVA),用LSD法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异显著性判断标准,结果见表10:

[0254] 表10相同重量浓度下不同工艺生产的复合双歧杆菌产品对小鼠NK细胞活性的影响

产品	双歧杆菌 剂量	动物数 (只)	NK 细胞活性 (A, %)	NK 细胞活性 转换值	P 值
阴性对照组	0	15	36.3±2.3	41.2±1.5	—
[0255] 实施例 3 原粉	0.1g/ml	15	42.3±3.9	45.1±2.5	0.037*
实施例 4 原粉	0.1g/ml	15	43.8±3.0	46.0±3.2	0.013*
实施例 3 制剂	0.1g/ml	15	41.5±2.5	44.6±1.6	0.065
实施例 4 制剂	0.1g/ml	15	42.2±3.2	45.0±2.1	0.042*
实施例 5 制剂	0.1g/ml	15	48.1±2.4	48.8±1.5	0.001**
实施例 6 制剂	0.1g/ml	15	46.0±2.5	47.5±1.5	0.002**

[0256] 注: NK细胞活性转换值 =  $\sin^{-1}(A^{1/2})$

[0257] 如表10所示:

[0258] 对于复合双歧杆菌原粉产品, 本发明实施例4饲喂固态法所制备的复合双歧杆菌原粉时的小鼠血清中NK细胞活性, 较实施例3饲喂液态法所制备的复合双歧杆菌原粉更大。

[0259] 对于复合双歧杆菌制剂产品, 本发明实施例4、5、6饲喂固态法所制备的复合双歧杆菌制剂时的小鼠血清中NK细胞活性, 比饲喂液态法(实施例3)所制备的复合双歧杆菌制剂更大; 本发明饲喂固态法制备菌剂的增加免疫力效果, 较液态法有显著性差异, 说明通过本发明的制备方法得到的复合双歧杆菌菌剂增加免疫力的效果更明显。

[0260] 8.1.3相同菌数时产品的增加免疫力效果对比(对小鼠NK细胞活性的影响)

[0261] 分别称取复合双歧杆菌成品1g, 加入适量无菌水, 经菌数测定后, 加入无菌水调整复合双歧杆菌总数浓度为 $1 \times 10^{10}$ CFU/ml, 每次服用10ml, 故每次服用的复合双歧杆菌总数为 $10 \times 10^{10}$ CFU, 即 $1 \times 10^{11}$ CFU。

[0262] 增加免疫力的实验方法见7.1.1。

[0263] 测量小鼠血清中复合双歧杆菌制剂对小鼠NK细胞活性的影响, 测定结果以“平均值±标准差”表示。本实验采用SPSS 24.0软件对实验数据进行单因素方差分析(ANOVA), 用LSD法进行多重比较, 以 $P < 0.05$ 为差异显著性判断标准, 结果见表11:

[0264] 表11相同菌数时复合双歧杆菌产品(对小鼠NK细胞活性的影响)

产品	双歧杆菌 剂量	动物数 (只)	NK 细胞活性 (A, %)	NK 细胞活性 转换值	P 值
阴性对照组	0	15	36.3±2.3	41.2±1.5	—
[0265] 实施例 3 原粉	$1 \times 10^{11}$ CFU	15	40.6±1.6	44.0±1.0	0.060
实施例 4 原粉	$1 \times 10^{11}$ CFU	15	42.1±1.0	45.0±0.6	0.015*
实施例 3 制剂	$1 \times 10^{11}$ CFU	15	40.4±2.4	43.9±1.5	0.068
实施例 4 制剂	$1 \times 10^{11}$ CFU	15	41.2±3.6	44.4±2.3	0.035*
实施例 5 制剂	$1 \times 10^{11}$ CFU	15	45.1±2.4	46.9±1.5	0.001**
实施例 6 制剂	$1 \times 10^{11}$ CFU	15	44.0±2.0	46.2±2.5	0.003**

[0266] 注:NK细胞活性转换值 $=\sin^{-1}(A^{1/2})$

[0267] 如表11所示,当制剂中含有相同菌数时,4、5、6制备所得的菌剂对小鼠NK细胞活性的影响更大;本发明采用固态法制备所得菌剂的增强免疫力效果,较液态法有显著性差异。

[0268] 复合双歧杆菌的增强免疫力作用,如果仅仅是活菌的效果,那么当采用相同的菌数时应该具有大致相同的增加免疫力效果,但表10的结果表明:与液态法所制备的复合双歧杆菌菌剂相比,本发明的实施例4、5、6采用固态法制备的复合双歧杆菌菌剂对小鼠NK细胞活性的影响更大,说明其增加免疫力的效果更明显。液态法在制备过程中由于离心分离去除了液态培养过程所产生的代谢产物,所以其增加免疫力效果主要来自于菌种本身;而本发明制备所得菌剂中除了含有复合双歧杆菌具体外,还含有固态培养过程中所产生的代谢产物,复合双歧杆菌与代谢产物协同增效,提高了菌剂整体的增加免疫力效果。8.2复合双歧杆菌制剂对ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化反应的影响

[0269] 8.2.1实验方法

[0270] 一、实验材料:

[0271] 试验动物:选用SPF级昆明种雌性小鼠,6-8周龄(体重18-22g),共105只,随机分为7组,每组15只。

[0272] 其它材料:Hank's液、RPMI1640完全培养液等。

[0273] 二、试验方法:

[0274] 1、剂量与分组:

[0275] 每组小鼠分别用阴性对照组(纯水)、液态法对照组(实施例3)、本发明的固态法实验组实施例4、实施例5、实施例6,剂量均为0.1g/ml。每日2次,所有小鼠连续服用30天。

[0276] 2、灌喂方法:

[0277] 实验时分别取样品用纯净水配制成20ml的样液,分别供动物灌胃使用。动物在实验室条件下适应3天后,随机分组,每日按表12的样品和剂量进行灌胃,连续灌胃30天,对照组灌服无菌纯净水。

[0278] 三、ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验(MTT法):

[0279] 1、淋巴细胞增殖反应:

[0280] 复合双歧杆菌制剂喂养实验结束后,将各剂量组小鼠无菌取脾,置无菌Hank's液中磨碎,经1000r/min离心洗涤后,将细胞悬于1ml的完全培养液中,活细胞计数并调整浓度 $3 \times 10^6$ 个/ml,将细胞悬液分两孔加入24孔培养板中,每孔1ml,1孔75 $\mu$ l ConA液(相当于7.5 $\mu$ l/ml),另一孔作对照。置于5%CO<sub>2</sub>,37℃培养72h。培养结束前4小时,每孔吸去上清液0.7ml,每孔加入0.7ml无血清RPMI 1640培养液,同时加入MTT(5mg/ml)50 $\mu$ l/ml/孔,继续培养4h。培养结束后,每孔加入1ml异丙醇,吹打均匀,使紫色结晶溶解,分别加入96孔培养板中,作3个孔的平行样,以570nm波长测定光密度值,按下式计算淋巴细胞的增殖转化能力。

[0281] 淋巴细胞的增殖能力 $=OD(\text{ConA孔}) - OD(\text{对照孔})$

[0282] 2、实验结果:

[0283] 对ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化反应,其高剂量组光密度差值高于对照组,差异具有显著意义(见表12)。结果表明实例1的样品脾淋巴细胞转化试验结果为阳性,受试样品增强细胞免疫作用。

[0284] 复合双歧杆菌制剂对ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化反应的影响见表12:表12不



同工艺生产的复合双歧杆菌对ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化反应的影响

组别	双歧杆菌剂量	动物数(只)	光密度差值	P值 (与对照组比)	
[0285] 阴性对照组	0	15	0.25±0.01	—	
[0286]	实施例3原粉	0.1g/ml	15	0.32±0.01	0.047*
	实施例4原粉	0.1g/ml	15	0.33±0.06	0.026*
	实施例3制剂	0.1g/ml	15	0.31±0.04	0.082
	实施例4制剂	0.1g/ml	15	0.35±0.03	0.008**
	实施例5制剂	0.1g/ml	15	0.38±0.03	0.001**
	实施例6制剂	0.1g/ml	15	0.36±0.06	0.004**

[0287] 由表12的结果可以看出:与阴性对照和液态法相比,由实施例4、实施例5和实例6采用固态法生产的复合双歧杆菌制剂对ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化反应具有特别显著的效果。

[0288] 根据实施例8的实验结果,复合双歧杆菌制剂能够提高小鼠的NK细胞活性,增加ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化反应,说明其有增强免疫力的效果,其中以采用固态法的实施例4、实施例5和实施例6效果更为明显。

[0289] 实施例9复合双歧杆菌的降血糖效果对比试验( $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂含量测定)

[0290] 9.1复合双歧杆菌的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂含量测定

[0291] 9.1.1试验方法

[0292] 选取上述各实施例所得到的产品,参考朱运平的方法,测定其 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂含量。试验方法如下:

[0293] 材料与试剂:

[0294] 4-硝基苯基-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶;无菌0.1mol/L磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH6.8);其余试剂均为分析纯。

[0295] 样品提取液的制备:

[0296] 用无菌0.1mol/L磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH6.8)将菌体制成悬液,并将细菌浓度调至 $1 \times 10^9$ CFU/mL,37℃孵育12h,4℃、8000r/min离心15min,将上清液通过0.22 $\mu$ m水系微滤膜过滤以获得样品提取液,-80℃保存。

[0297]  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率的测定:

[0298] 采用PNPG法测定 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性。

[0299] PNPG法的原理:

[0300] 由于 $\alpha$ -葡萄糖苷酶催化水解PNPG释放出的PNP在405nm处有一定的吸光度,因此,可通过检测PNP的量来测定 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的变化,从而测定样品对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率。

[0301] 在96孔酶标板上,经过稀释的样品中加入50 $\mu$ L $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液(25mg/mL),50 $\mu$ L 4-PNPG(0.9133mg/mL)及120 $\mu$ L 0.5mol/L的磷酸缓冲液(pH6.8)。混匀后在37℃的培养箱中

反应45min。加入50 $\mu$ L碳酸钠溶液(0.67mol/L)终止反应,在405nm下用酶标仪测定吸光度值。以相同体积的缓冲液代替样品所得的吸光度值作为对照。用下面的公式计算得出 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率。

$$[0302] \quad \alpha\text{-葡萄糖苷酶的抑制率}\% = (\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{样品}}) / \text{OD}_{\text{对照}} \times 100$$

[0303] 式中:

[0304]  $\text{OD}_{\text{对照}}$ 是未加入样品孔的吸光度值,即空白对照。

[0305]  $\text{OD}_{\text{样品}}$ 是加入样品提取液(即含有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂)孔的吸光度值。

[0306] 9.1.2相同重量浓度下时产品的降血糖效果对比( $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率测定)

[0307] 分别称取上述各组样品各1g,加入10mL无菌水,配成0.1g/mL的复合双歧杆菌溶液,备用。PNPG法测定各组样品对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果,从而判断复合双歧杆菌的降血糖效果,结果以“平均值 $\pm$ 标准差”来表示,详见表13:

[0308] 实验结果:

[0309] 表13相同重量时不同工艺生产的复合双歧杆菌的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率(%)

[0310]

样品	剂量	$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率(%)
阴性对照组	0.1g/ml	0
实施例3原粉	0.1g/ml	60.2
实施例4原粉	0.1g/ml	78.8
实施例3制剂	0.1g/ml	55.5
实施例4制剂	0.1g/ml	71.3
实施例5制剂	0.1g/ml	85.6
实施例6制剂	0.1g/ml	76.2

[0311] 9.1.3相同菌数时产品的降血糖效果对比( $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率测定)

[0312] 分别称取复合双歧杆菌成品1g,加入适量无菌水,经菌数测定后,加入无菌水调整复合双歧杆菌总数浓度为 $1 \times 10^{10}$ CFU/ml,备用。

[0313] 按照实施例9.1.1类似的试验方法,测定相同菌数的实施例样品对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果,结果以“平均值 $\pm$ 标准差”来表示,详见表14:

[0314] 表14相同菌数时不同工艺生产的复合双歧杆菌的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率(%)

[0315]

样品	剂量	$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率(%)
阴性对照组	$1 \times 10^{10}$ CFU/ml	0
实施例3原粉	$1 \times 10^{10}$ CFU/ml	55.2
实施例4原粉	$1 \times 10^{10}$ CFU/ml	72.3
实施例3制剂	$1 \times 10^{10}$ CFU/ml	49.5
实施例4制剂	$1 \times 10^{10}$ CFU/ml	56.3
实施例5制剂	$1 \times 10^{10}$ CFU/ml	76.6
实施例6制剂	$1 \times 10^{10}$ CFU/ml	71.2

[0316] 上述实验结果,实际上是测定样品的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶标准品的活性之间的差异,即规定不含样品的缓冲液的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率为0,而将样品的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率规定为样品与对照之间的吸光度的差值百分比。需要说明的是:为简化测定程序,本发明未设置阳性对照,即未使用阳性的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂阿卡波糖或DNJ作为对

照,也未扣除样品背景,所以所测定的抑制率可能与实际略有差异,但由于差异不大,所以表13和表14的结果对于了解复合双歧杆菌样品的对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果仍然具有良好的参考价值。

[0317] 根据表13和表14的实验结果,本发明的复合双歧杆菌产品比传统的液态法复合双歧杆菌产品具有更好的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率,加上本发明的复合双歧杆菌产品具有更高的复合双歧杆菌数量。因此,可以预期本发明的产品总体上会具有比液态法生产的复合双歧杆菌制剂具有更好的降血糖效果。

[0318] 9.2复合双歧杆菌的降血糖效果对比试验(高血糖的治疗效果)

[0319] 根据上述各实施例所得到的产品,进行了产品的降血糖实验,实验方案及实验结果如下:

[0320] 实验材料与方法:

[0321] 受试对象:选择空腹血糖 $\geq 7.8\text{mmol/L}$ 的二型糖尿病患者作为实验对象,将210名被诊断患有成人二型糖尿病的患者随机分成7组,每组30名。

[0322] 空白对照组或安慰剂组:采用未加药的空白淀粉制剂进行治疗,每天3次,每次1袋,每袋2克,持续4周。

[0323] 阳性实验组:采用阿卡波糖治疗,75mg/d,分三次服用,每次25mg,治疗4周。

[0324] 液态法对照组(实施例3):采用传统的液态培养法培养复合双歧杆菌,经离心分离后干燥制备的复合双歧杆菌菌体制剂进行治疗,每天3次,每次1袋,每袋2克,持续4周。

[0325] 实施例组:共分3组(实施例4-6),按表15分别口服复合双歧杆菌进行治疗,每天3次,每次1袋,每袋2克,持续4周。

[0326] 用药期间通过问诊来确定是否有不良反应。

[0327] 实验结果:

[0328] 表15不同工艺生产的复合双歧杆菌的降血糖效果(空腹血糖值,mmol/L)

实施例	实验前 (0天)	第7天	第14天	第21天	第28天
空白对照组	8.0 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.3	8.0 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.2	8.2 $\pm$ 0.2
阳性对照	8.0 $\pm$ 0.2	7.6 $\pm$ 0.5	7.1 $\pm$ 0.4	6.3 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 0.3
实施例3原粉	7.9 $\pm$ 0.4	7.7 $\pm$ 0.1	7.3 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 0.3	7.0 $\pm$ 0.3
实施例4原粉	8.1 $\pm$ 0.3	7.5 $\pm$ 0.5	7.2 $\pm$ 0.5	7.1 $\pm$ 0.6	6.9 $\pm$ 0.6
[0329] 实施例3制剂	8.0 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.4	7.5 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.5
实施例4制剂	8.1 $\pm$ 0.2	7.6 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.5	7.2 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 0.2
实施例5制剂	7.9 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 0.2	6.8 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.6
实施例6制剂	7.9 $\pm$ 0.2	7.3 $\pm$ 0.2	6.9 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 0.1	6.0 $\pm$ 0.5

[0330] 表16不同工艺生产的复合双歧杆菌的降血糖效果(餐后2h血糖值),

实施例	实验前 (0天)	第7天	第14天	第21天	第28天
阴性对照组	13.0±0.3	13.8±0.5	13.2±0.5	13.5±0.3	13.9±0.5
阳性对照	12.9±0.5	11.8±0.5	8.2±0.3	7.5±0.4	7.0±0.3
实施例3原粉	12.9±0.5	11.8±0.5	9.8±0.3	8.5±0.4	8.0±0.3
实施例4原粉	13.1±0.5	10.8±0.5	9.1±0.3	8.1±0.2	7.9±0.4
[0331] 实施例3制剂	13.0±0.4	12.0±0.5	9.9±0.4	8.8±0.4	8.3±0.4
实施例4制剂	12.9±0.3	11.0±0.3	8.8±0.4	7.8±0.3	7.6±0.2
实施例5制剂	13.0±0.3	10.9±0.5	8.5±0.3	8.3±0.4	7.8±0.3
实施例6制剂	12.9±0.2	11.6±0.5	9.2±0.5	7.9±0.3	7.8±0.5

[0332] mmol/L)

[0333] 综上所述,采用本发明所制备的复合双歧杆菌制剂,具有良好的降血糖作用,其效果优于液态法复合双歧杆菌制剂,虽然略低于常用的降血糖药物--阿卡波糖,但由于其副作用小,且复合双歧杆菌制剂还具有调节肠道、增加免疫力等其它效果,且不受药品剂量限制。因此,可将复合双歧杆菌作为糖尿病人的辅助调理用品,协助其它降血糖药物发挥降血糖的作用。

[0334] 实例10:复合双歧杆菌的降脂减肥效果对比试验

[0335] 复合双歧杆菌对小鼠的降脂减肥效果可以通过测定饲喂复合双歧杆菌的小鼠体重、Lee's指数和血脂等指标来进行表征。

[0336] 10.1相同重量浓度下菌剂对小鼠降脂减肥效果的影响

[0337] 选取上述实施例3-6所得到的产品,按表3的剂量每次饲喂同样重量的复合双歧杆菌,实验期结束后测定复合双歧杆菌对小鼠的降脂减肥效果,实验方案及实验结果如下:

[0338] 10.1.1材料与试剂:

[0339] 昆明种小鼠,雌雄各半,4周龄,体重18-22g。

[0340] 10.1.2试验方法:

[0341] 动物分组:买来的小鼠用基础饲料经过1周的适应性饲养后测定体重作为初始体重,剔除体重过大过小的鼠,挑选80只小鼠随机分成8组,每组10只,雌雄各半。

[0342] 空白对照组(蒸馏水)、模型对照组(高脂饲料3g)、阳性对照组(奥利司他400μg)、实施例3(液体法对照组)原粉、实施例3(液体法对照组)制剂、实施例4原粉、实施例4制剂、实施例5制剂、实施例6制剂。

[0343] 小鼠每日3餐正常饲喂基础饲料。在每餐饲喂基础饲料之后30分钟左右,再用表3各组相应的剂量配成10ml溶液灌胃,然后每周测量1次体重,共进行4周饲养实验,实验结束

时测定最终体重并采血测定血脂含量。

[0344] 10.1.3观察指标及方法:

[0345] ①一般情况观察:

[0346] 活动程度,体毛色泽、体形、饮食、饮水及粪便状况。

[0347] ②生长指标检测:

[0348] 生长指标主要检测体重(g)和肥胖指数(Lee's指数),其中Lee's指数的计算方法为:

[0349]  $\text{Lee's指数} = [\text{体重(g)}]^{1/3} / \text{体长(cm)} \times 1000$

[0350] ③血脂检测:

[0351] 血脂测定(总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白),采用全自动生化分析仪测定。

[0352] 10.1.4实验结果:

[0353] ①一般情况:

[0354] 六组小鼠的体毛色泽均无变化。

[0355] 模型对照组食欲增强,体形变圆,活动较正常对照组迟钝,大便略有增加;

[0356] 阳性对照组小鼠大便偏稀,复合双歧杆菌组小鼠无腹泻现象。

[0357] 复合双歧杆菌组小鼠与模型对照组比较,进食量较少,活动较灵活,大便量明显增多。

[0358] ②体重变化:

[0359] 实验各组经过1周的适应性饲养后随机分组,各组间小鼠的初始体重差异无统计学意义( $P > 0.05$ );4周的喂养实验结束时,模型对照组与空白对照组比较,体重显著升高;阳性对照组与空白对照组比较,体重显著降低;不同实施例的复合双歧杆菌组与空白对照组相比,体重显著降低;与模型对照组比较,体重显著降低,结果见表17:

[0360] 表17复合双歧杆菌对小鼠体重的影响

样品		复合双歧杆菌剂量	动物数 (只)	初始体重 (g)	最终体重 (g)	Lee's 指数
对照	空白对照	纯水	10	21.32± 0.21	31.42± 0.33	309.36± 1.08
	模型对照	3g 脂肪	10	21.18± 0.29	33.93± 0.68	317.39± 2.11
	阳性对照	400 μg 奥利司他	10	21.16± 0.18	28.86± 0.43	300.72± 1.50
原粉	实施例 3	0.1g 复合双歧杆菌	10	21.23± 0.14	30.16± 0.13	305.17± 0.44
	实施例 4	0.1g 复合双歧杆菌	10	21.25± 0.31	30.56± 0.32	306.51± 1.07
制剂	实施例 3	0.1g 复合双歧杆菌	10	21.26± 0.26	29.13± 0.33	301.66± 1.13
	实施例 4	0.1g 复合双歧杆菌	10	20.93± 0.10	29.01± 0.31	301.24± 1.07
	实施例 5	0.1g 复合双歧杆菌	10	21.03± 0.06	28.49± 0.31	299.43± 1.08
	实施例 6	0.1g 复合双歧杆菌	10	21.06± 0.08	29.02± 0.25	301.28± 0.86

[0362] 4周的饲养实验结束后,采血测定血脂含量,结果见表18:

[0363] 表18复合双歧杆菌对小鼠血脂的影响

样品		剂量	甘油三酯 (mmol/L) TG	总胆固醇 (mmol/L) CHO	高密度脂 蛋白-胆 固醇 (mmol/L) HDL-C	低密度脂 蛋白-胆 固醇 (mmol/L) LDL-C
对照	空白	纯水	1.23 ± 0.12	2.41 ± 0.06	1.42 ± 0.03	0.98 ± 0.02
	模型	3g 脂肪	1.51 ± 0.13	3.13 ± 0.18	1.12 ± 0.08	1.31 ± 0.09
	阳性 对照	400 μg 奥 利司他	0.91 ± 0.11	2.01 ± 0.13	1.65 ± 0.12	0.65 ± 0.06
[0364] 原粉	实施 例 3	0.1g 复合 双歧杆菌	1.12 ± 0.06	2.22 ± 0.08	1.55 ± 0.08	0.82 ± 0.08
	实施 例 4	0.1g 复合 双歧杆菌	0.92 ± 0.03	2.03 ± 0.06	1.55 ± 0.06	0.71 ± 0.08
制剂	实施 例 3	0.1g 复合 双歧杆菌	0.90 ± 0.12	2.06 ± 0.07	1.66 ± 0.06	0.61 ± 0.05
	实施 例 4	0.1g 复合 双歧杆菌	0.93 ± 0.15	1.98 ± 0.12	1.69 ± 0.06	0.58 ± 0.08
	实施 例 5	0.1g 复合 双歧杆菌	0.89 ± 0.12	1.92 ± 0.11	1.68 ± 0.06	0.55 ± 0.08
	实施 例 6	0.1g 复合 双歧杆菌	0.90 ± 0.11	2.95 ± 0.12	1.65 ± 0.08	0.61 ± 0.08

[0365] 由表17、表18的结果可以看出：

[0366] 与空白对照相比，由实施例3和实施例4生产的复合双歧杆菌原粉对小鼠降脂减肥具有特别显著的效果。

[0367] 与空白对照相比，由实施例3、实施例4、实施例5和实施例6等生产的复合双歧杆菌制剂对小鼠降脂减肥效果具有特别显著的效果。

[0368] 与液态培养法(实施例3)制备的复合双歧杆菌制剂相比，固态培养法(实施例4-6)制备的复合双歧杆菌制剂对小鼠降脂减肥效果有特别显著的效果。

[0369] 上述实验结果表明：复合双歧杆菌对小鼠体重具有一定的降低作用，复合双歧杆菌在肠道内利用葡萄糖、脂肪酸等小分子营养物质合成肠道菌体成分，增加大便的排出，有助于驱除脂肪；此外，复合双歧杆菌所产生的代谢产物也有利于降低体内脂肪的合成。因此，复合双歧杆菌具有抑制小鼠体重增加的作用。复合双歧杆菌对小鼠血脂影响的实验结果表明：复合双歧杆菌能降低TG、CHO、LDL-C，增加HDL-C，因此，复合双歧杆菌有助于改善体内脂肪代谢，具有良好的降脂功能。根据表17和表18的实验结果还发现：本发明的固态法复



合双歧杆菌产品比传统的液态法复合双歧杆菌产品具有更好的降脂减肥作用。

[0370] 综上所述,采用本发明所制备的固态法复合双歧杆菌制剂,具有良好的降脂减肥作用,其效果优于液态法复合双歧杆菌制剂,虽然略低于常用的降脂减肥药物--奥利司他,但由于其副作用小,且复合双歧杆菌制剂还具有调节肠道、增加免疫力等其它效果,且不受药品剂量限制。因此,可将复合双歧杆菌作为肥胖病人的辅助调理用品,协助其它降脂减肥药物发挥降脂减肥的作用。

[0371] 10.2相同菌数时产品对小鼠降脂减肥效果的影响

[0372] 试验方法同实施例10.1。

[0373] 分别称取复合双歧杆菌成品1g,加入适量无菌水,经菌数测定后,加入无菌水调整复合双歧杆菌总数浓度为 $1 \times 10^{10}$ CFU/ml,每次灌服10ml,故每次服用的复合双歧杆菌总数为 $10 \times 10^{10}$ CFU,即 $1 \times 10^{11}$ CFU。

[0374] 按照实施例10.1类似的试验方法,测定相同菌数的实施例样品对小鼠降脂减肥效果的影响,结果以“平均值±标准差”来表示,详见表19:

[0375]

样品		双歧杆菌 剂量	动物 数 (只)	初始体重 (g)	最终体重 (g)	Lee's 指数
对照	空白 对照	纯水	10	21.32±0.21	31.42±0.33	309.36±1.08
	模型 对照	3g 脂肪	10	21.18±0.29	33.93±0.68	317.39±2.11
	阳性 对照	400 μg 奥 利司他	10	21.16±0.18	29.22±0.43	301.97±1.47
原 粉	实施 例 3	$1 \times 10^{11}$ CFU 复合双歧 杆菌	10	21.22±0.12	29.98±0.15	304.56±0.51
	实施 例 4	$1 \times 10^{11}$ CFU 复合双歧 杆菌	10	21.23±0.18	29.83±0.33	304.05±1.12
制 剂	实施 例 3	$1 \times 10^{11}$ CFU 复合双歧 杆菌	10	21.25±0.22	30.02±0.30	304.70±1.01
	实施 例 4	$1 \times 10^{11}$ CFU 复合双歧 杆菌	10	21.25±0.11	29.95±0.21	304.46±0.71
	实施 例 5	$1 \times 10^{11}$ CFU 复合双歧 杆菌	10	21.18±0.18	29.08±0.23	301.48±0.80
	实施 例 6	$1 \times 10^{11}$ CFU 复合双歧 杆菌	10	21.36±0.11	29.25±0.24	302.07±0.82

[0376] 表19相同菌数时产品对小鼠降脂减肥效果的影响4周的饲养实验结束后,采血测定血脂含量,结果见表20:

[0377] 表20相同菌数时产品对小鼠血脂的影响

样品		剂量 (样品 /10ml)	甘油三酯 (mmol/L) TG	总胆固醇 (mmol/L) CHO	高密度脂蛋白-胆固醇 (mmol/L) HDL-C	低密度脂蛋白-胆固醇 (mmol/L) LDL-C
对照	空白	纯水	1.23±0.12	2.41±0.06	1.42±0.03	0.98±0.02
	模型	3g 脂肪	1.51±0.13	3.13±0.18	1.12±0.08	1.31±0.09
	阳性对照	400 μg 奥利司他	0.91±0.11	2.01±0.13	1.65±0.12	0.65±0.06
原粉	实施例3	1x10 <sup>11</sup> CFU 复合双歧杆菌	1.19±0.06	2.22±0.06	1.52±0.08	0.83±0.08
	实施例4	1x10 <sup>11</sup> CFU 复合双歧杆菌	0.92±0.06	2.13±0.06	1.55±0.08	0.73±0.06
制剂	实施例3	1x10 <sup>11</sup> CFU 复合双歧杆菌	1.23±0.13	2.26±0.06	1.59±0.07	0.85±0.06
	实施例4	1x10 <sup>11</sup> CFU 复合双歧杆菌	0.96±0.11	2.01±0.12	1.68±0.06	0.62±0.09
	实施例5	1x10 <sup>11</sup> CFU 复合双歧杆菌	0.85±0.15	1.96±0.08	1.72±0.11	0.63±0.12
	实施例6	1x10 <sup>11</sup> CFU 复合双歧杆菌	0.92±0.13	2.01±0.13	1.75±0.12	0.61±0.08

[0379] 如表19、表20所示,实施例3为液态法制备的产品对小鼠降脂减肥效果的影响,而实施例4、5、6则分别为3种固态法制备的产品对小鼠降脂减肥效果的影响。

[0380] 表19、表20的实验结果表明:相同菌数的产品也具有大致相同降脂减肥效果。综合上述表17、表18、表19和表20的实验结果还发现:本发明的固态培养法制备的复合双歧杆菌产品比传统的液态法制备的复合双歧杆菌产品具有更好的降脂减肥作用。

[0381] 复合双歧杆菌对小鼠降脂减肥效果的影响,如果仅仅是活菌的效果,那么当采用相同的菌数时应该具有大致相同的效果,但上述结果表明:与液态法(实施例3)所制备的复合双歧杆菌产品相比,本发明的实施例4、5、6采用固态法制备的复合双歧杆菌产品具有更好的降脂减肥效果。液态法制剂在制备过程中由于离心分离去除了液态培养过程所产生的代谢产物,所以其降脂减肥的效果主要来自于菌种本身;而本发明制备所得固态法制剂中除了含有复合双歧杆菌菌体外,还含有固态培养过程中所产生的柠檬酸裂解酶抑制剂、α-葡萄糖苷酶抑制剂、短链脂肪酸等具有降脂减肥能力的代谢产物,复合双歧杆菌与代谢产物协同增效,提高了菌剂整体对小鼠降脂减肥效果的影响。

[0382] 上述实验结果表明:复合双歧杆菌对小鼠体重具有一定的降低作用,复合双歧杆菌在肠道内利用葡萄糖、脂肪酸等小分子营养物质合成肠道菌体成分,增加大便的排出,有

助于驱除脂肪；此外，复合双歧杆菌所产生的代谢产物也有利于降低体内脂肪的合成。因此，复合双歧杆菌具有抑制小鼠体重增加的作用。复合双歧杆菌对小鼠血脂影响的实验结果表明：复合双歧杆菌能降低TG、CHO、LDL-C，增加HDL-C，因此，复合双歧杆菌有助于改善体内脂肪代谢，具有良好的降脂功能。根据表7和表8的实验结果还发现：本发明的复合双歧杆菌产品比传统的液态法复合双歧杆菌产品具有更好的降脂减肥作用。采用本发明所制备的复合双歧杆菌制剂，具有良好的降脂减肥作用，其效果优于液态法复合双歧杆菌制剂，虽然略低于常用的降脂减肥药物--奥利司他，但由于其副作用小，且复合双歧杆菌制剂还具有调节肠道、增加免疫力等其它效果，且不受药品剂量限制。因此，可将复合双歧杆菌作为肥胖病人的辅助调理用品，协助其它降脂减肥药物发挥降脂减肥的作用。

[0383] 综合上述各实例的实验结果，发现采用混菌接种复合双歧杆菌、液态培养、离心分离、固态培养等工艺制成的复合双歧杆菌制剂，具有菌种含量高、富含双歧杆菌代谢产物、具有良好的抗过敏、增加免疫力、降血糖、降脂减肥等多方面的功能效果。

[0384] 本发明针对传统工艺的缺陷，采用混合菌接种、液态培养、固液分离、固态培养等结合的新工艺，在传统的液态培养、固液分离的基础上，再增加一个固态培养的工序；或者说：本发明是在传统的液态培养与固态培养结合工艺的基础上，在中间再增加一个固液分离的工序。经过这样改进的发酵工艺，充分利用了液态发酵速度快，固液分离后的湿菌种菌体数量高，以及固态发酵可使复合双歧杆菌的菌种活力有较大的恢复和增长，并且在固态发酵过程中还能产生细菌素、有机酸等抗过敏物质的优点，还能产生降血糖、增加免疫力的代谢产物，能增强复合双歧杆菌制剂在使用时的抗过敏、降血糖、调理肠胃和增加免疫力、降脂减肥等多方面的功能效果。此外，固态发酵添加的固态培养基及其培养产物还具有干燥保护剂的作用，且固态发酵产生的菌体在干燥时应激小，菌体干燥时死亡率低，使最终获得的产品菌种活力高、并含有适量的细菌素、有机酸以及一些具有降血糖、增加免疫力的代谢产物，在实际的使用过程中具有更好的抗过敏和降血糖、调理肠胃、增加免疫力和降脂减肥的效果。本发明所使用的复合菌均为双歧杆菌，其生长环境类似、产生的代谢产物类似，但它们对于生长环境的要求还是略有一些区别，因此，当它们混合培养时，能充分发挥它们各自对生长环境的适应能力，所以在培养结束时的总菌数比单一菌株培养时要高，而且其功能效果也更全面。

[0385] 以上所述，仅为本发明的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，可轻易想到变化或替换，都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此，本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。