



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109988725 A

(43)申请公布日 2019.07.09

(21)申请号 201810665158.9

A61P 9/00(2006.01)

(22)申请日 2018.06.26

A23L 33/135(2016.01)

(71)申请人 银川尧玥生物科技有限公司

C12R 1/23(2006.01)

地址 750200 宁夏回族自治区银川市贺兰
县富兴北街创业东路5号科创中心D栋
317室

C12R 1/25(2006.01)

C12R 1/245(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

C12R 1/46(2006.01)

申请人 南京尧玥生物科技有限公司

(72)发明人 尹星 胡建中

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A61K 35/747(2015.01)

A61K 35/741(2015.01)

A61K 35/745(2015.01)

A61K 35/744(2015.01)

A61P 3/06(2006.01)

A61P 3/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

减肥降血脂微生物菌剂及其衍生物的制备
技术与应用

(57)摘要

本发明公开了一种活性复合微生物菌剂及其衍生物微生态产品的制备方法,并通过具有降血脂和辅助减肥功能的保健食品、保健品或药品,应用在降血脂、预防和治疗肥胖和心脑血管等相关疾病中。所述活性复合微生物菌种均来自于健康人群的天然多种菌种。根据生物信息分析和管理平台,优化完善活性复合微生物菌种配方,得到优质的活性复合微生物菌剂及其衍生物;免去添加任何化学试剂等危害;保留肠道多样性的共生菌群功能,调节菌群平衡、脂肪代谢等功效;解决了传统单一的生产工艺,为微生态产品的高值化生产提供了新途径,填补产业空白,具有良好的应用前景;同时,应用和完善了“胃肠道微生态失调与肥胖和心脑血管等疾病密切相关的科学论断。

1. 减肥降血脂天然活性复合微生物菌剂及其衍生物的微生态产品制备方法,包括以下步骤:

(1) 人体粪便样本处理:抽提并纯化样本中的微生物DNA,采用515F/806R PCR引物对微生物DNA的16S rRNA基因的V4高变区进行扩增;

(2) 测定人体肠道菌群含量:提取人体粪便中微生物的总DNA,然后以16S rRNA作为目标序列,使用515F/806R PCR引物进行绝对定量,以大肠杆菌作为标准品;

(3) 鉴定人体粪便中不同微生物菌群比例:通过高通量基因测序技术对扩增的产物进行测序,对测序结果进行分析评估,将测序结果与16S rRNA的微生物基因序列数据库进行对比,确定人体粪便样本中不同活性微生物菌群的相对含量和比例;

(4) 确定菌剂配方:将测定的微生物菌群含量与该种族人体粪便微生物数据库中该微生物菌群的含量分布进行比较,若相对含量 $\leq 25\%$,则提供的菌剂配方中该微生物菌群的活性含量不低于 5×10^9 cfu/g (mL);若相对含量 $> 25\%$,则提供的菌剂配方中该微生物菌群的活性含量不低于 1×10^9 cfu/g (mL);

(5) 减肥降血脂微生物菌种发酵:将步骤(4)中确定的菌剂配方与发酵基质进行混合发酵,当发酵基质的pH值到达或接近5.0时,则发酵成熟。

2. 根据权利要求1所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:所述的步骤(1)中采用微珠打碎和/或超声的方法来提取样本中的微生物DNA。

3. 根据权利要求1或2所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:所述的步骤(1)中采用的515F/806R PCR引物为515F-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA,806R-GGACTACHVGGGTWTCTAAT。

4. 根据权利要求1所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的微生物菌种,包括嗜酸乳杆菌,植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),干酪乳杆菌,史氏甲烷短杆菌,双歧杆菌,嗜热链球菌,拟杆菌属(*Bacteroides*)和普雷沃菌属(*Prevotella*),活泼瘤胃球菌(*Ruminococcus gnavus*),和柯林斯菌(*Coriobacteriaceae*)等。

5. 根据权利要求4所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:16S rRNA的微生物基因序列数据库的构建方法为通过公共数据库选择人体粪便样本中常见几百种菌株的名称和其约1.8kb大小的16SrRNA基因的DNA序列,数据库中包括菌株的详细系统分类名称和DNA序列信息,公共数据库包括RDP、SILVA、GreenGene、UNITE。

6. 根据权利要求4所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:人体粪便微生物数据库的建立方法为:通过高通量测序获得某一种族的大量人体粪便样本中微生物组成分布比例信息。

7. 根据权利要求1或4所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:所述的发酵基质,包括蔬菜、水果、根茎、菌类植物、子实体及本草类。

8. 根据权利要求7所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:发酵基质中包括70%的水和5~8%的蔗糖,质量分数。

9. 根据权利要求8所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:所述的蔗糖是一种没有经过高度精炼的、带蜜成型的、颜色比较深的甘蔗成品糖,主要是指黑糖和红糖。

10. 根据权利要求7或8所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:步骤(5)中发酵过程为:在25~30℃的温度下发酵7d后,没有大量气体产生时,密封发酵罐至少保持15-20d;当温度稳定后,且pH到达或接近5.0时显示发酵成熟,并冷却;发酵结束,将发酵液混匀,浓缩,离心,过滤,巴氏灭菌并冷却,检测,调配后得到液态的减肥降血脂微生态产品;贮藏在无阳光直射、阴凉通风处。

减肥降血脂微生物菌剂及其衍生物的制备技术与应用

技术领域

[0001] 本发明属于天然微生态保健食品、保健品或药品个性化定制的技术领域,更具体地说,涉及医药健康领域的减肥降血脂微生态个性化配方的制定方法和精准应用。

背景技术

[0002] 人类进入21世纪,生活水平有了显著的提高,与生活方式相关的疾病如肥胖、心脑血管疾病等严重地威胁人类的健康。大量的流行病学调查和研究表明,高脂血症是这些疾病的重要危险因素。

[0003] 但是目前市场上销售的降血脂的药物多为化学合成药,疗效一般,副作用大。也有一些采用单一菌种或盲目的(针对不同个体,菌群比例一成不变)复合菌种进行发酵,成分相对固定,不能满足不同种族、不同个体的微生态产品。例如,中国专利申请号为CN 03128995,申请公布日为2004年2月8日的专利申请文件公开了一种应用固定不变的菌种组成的技术方案。中国专利申请号为200610126889.3,申请公布日为2010年5月12日的专利申请文件也是公开了类似的微生态产品。再例如某一发明专利(CN 103598594 B)申请公布日为2013年10月28日的专利申请文件,应用植物乳杆菌单独发酵制成乳制品和功能饮料等;

本发明采用天然活性复合微生物菌种的动态配方及其衍生物的微生态产品制备过程中,显著提高了微生态产品的品质和效果,免去化学物质及添加剂等对人体造成的危害和提高精准应用的价值。发酵制备过程中能够促进物质的代谢反应,大量产生和积累初级及次级代谢(衍生)产物等多种有益成分;同时,保留自身多样性的共生菌群的功能。这些有益成分可以促进有益菌群的增殖,抑制有害菌群的繁殖及腐败物质形成,起到调节菌群平衡和脂肪的代谢、减少了对脂肪的过度吸收和累积,预防和治疗肥胖和心脑血管等相关疾病;增强免疫、延缓衰竭等作用。该方法结合了当前最前沿的生物信息技术,解决了传统单一的生产工艺;并作为精细微生态产品包括医药、保健食品和/或添加剂、材料中间体,为微生态产品的高值化生产提供了新途径。使资源进一步得到优化和良性循环,在肥胖和心脑血管疾病的预防和治疗应用中得到充分地精准应用,填补产业空白,具有良好的应用前景。

发明内容

[0004] 要解决的问题

针对现有市场上销售的减肥降血脂的产品多为化学合成药,疗效一般,副作用大。虽有一些采用盲目的单一菌种或菌群比例一成不变的微生态产品,但不能满足不同种族、不同个体,最终导致疗效不佳。本发明提供一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法和精准应用,根据不同种族、不同个体肠道菌群微生物分布的情况确定独特的微生物菌剂配方,对天然植物进行发酵,得到个性化的微生态产品,具有显著的疗效性、针对性和独特性。

[0005] 2. 技术方案

本发明对天然植物(水果、根茎、食用菌、子实体及本草类等)的混合物中接入接种,优

化和个性化组成活性复合微生物菌剂,进行无害化处理和连续发酵。利用天然混合的活性物质,以及通过活性复合微生物菌剂发酵产生的代谢物质,制得一种活性复合微生物菌剂及其衍生物的微生态产品。该产品具有更多的营养成分及微生物的衍生物,并能充分地保护有益天然多种菌种的原有功能,集疗效与天然原生态活性于一身。

[0006] 具体地说,本发明提供一种天然、优化和个性化的微生态产品,该产品可通过包括以下步骤的方法制备而成:

(1) 人体粪便样本处理:抽提并纯化样本中的微生物DNA,采用515F/ 806R PCR (515F-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA, 806R-GGACTACHVGGGTWTCTAAT) 引物对微生物DNA的16S rRNA基因的V4高变区进行扩增;16S rRNA基因是细菌上编码rRNA相对应的DNA序列,存在于所有细菌的基因组中,16S rRNA具有高度的保守性和特异性以及该基因序列具有较完备的参考文库用以细菌分型分析。

[0007] (2) 测定人体肠道菌群含量:提取人体粪便中微生物的总DNA,然后以16S rRNA作为目标序列,使用515F/ 806R PCR引物通过定量即时PCR对总的微生物菌群进行绝对定量,以大肠杆菌作为标准品;

(3) 鉴定人体粪便中不同微生物菌群比例:通过高通量基因测序技术对扩增的产物进行测序(测序长度可以到达双端500~600碱基,可以完全包括16S基因片段;可以同时超过10000个样本的PCR扩增产物进行测定,极大地降低单个样本的测序价格,清除价格瓶颈),对测序结果进行分析评估,将测序结果与16S rRNA的微生物基因序列数据库进行对比,确定人体粪便样本中不同活性微生物菌群的相对含量和比例。

[0008] (4) 确定菌剂配方:将测定的微生物菌群含量与该种族人体粪便微生物数据库中该微生物菌群的含量分布进行比较,若相对含量 $\leq 25\%$,则提供的菌剂配方中该微生物菌群的活性含量不低于 5×10^9 cfu/g (mL);若相对含量 $> 25\%$,则提供的菌剂配方中该微生物菌群的活性含量不低于 1×10^9 cfu/g (mL);

(5) 减肥降血脂微生物菌种发酵:将步骤(4)中确定的菌剂配方与发酵基质进行混合发酵,当发酵基质的pH值到达或接近5.0时,则发酵成熟。将发酵液进行冷却,经过混匀,过滤分离,巴氏灭菌并冷却,检测,调配,贮藏在无阳光直射、阴凉通风处。

[0009] 更进一步地,所述的步骤(1)中采用微珠打碎和/或超声(130 W \times 20 KHz)的方法来提取样本中的微生物DNA,使用荧光法测定DNA浓度。

[0010] 更进一步地,所述的步骤(1)中采用的515F/ 806R PCR 引物为515F : GTGCCAGCMGCCGCGGTAA806R;806R:GGACTACHVGGGTWTCTAAT。细菌16S rRNA基因包含从V1,V2到V9共九个高变区。本发明中通过使用双端编码的515F/ 806R PCR引物,扩增16S rRNA基因的V4高变区。扩增的产物通过Illumina或其他的测序平台进行高通量测序。

[0011] 更进一步地,根据权利要求1所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:人体粪便中的微生物菌群包括嗜酸乳杆菌,植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),干酪乳杆菌,史氏甲烷短杆菌,双歧杆菌,嗜热链球菌,拟杆菌属(*Bacteroides*)和普雷沃菌属(*Prevotella*),活泼瘤胃球菌(*Ruminococcus gnavus*)和柯林斯菌(*Coriobacteriaceae*)等。

[0012] 更进一步地,根据权利要求1所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:16S rRNA的微生物基因序列数据库的构建方法为通过公共数据库选

择人体粪便样本中常见几百种菌株的名称和其约1.8kb大小的16SrRNA基因的DNA序列,数据库中包括菌株的详细系统分类名称和DNA序列信息,公共数据库包括RDP、SILVA、GreenGene、UNITE。

[0013] 更进一步地,根据权利要求4所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:人体粪便微生物数据库的建立方法为通过高通量16S rRNA基因测序获得某一种族的大量粪便样本中微生物组成分布比例信息,如图2所示。

[0014] 更进一步地,根据权利要求1或4所述的一种减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的制定方法,其特征在于:所述的发酵基质,包括食用蔬菜、水果、根茎、菌类植物、子实体及本草类。发酵基质要经过洗净、切块/粉碎(长度 $< 1.5\text{cm}$)并去除杂质(铁丝、石块、塑料、泥块、肉类、油类等)。

[0015] 更进一步地,发酵基质中包括70%的水和5~8%的蔗糖,质量分数。

[0016] 更进一步地,所述的蔗糖是一种没有经过高度精炼的、带蜜成型的、颜色比较深的甘蔗成品糖,主要是指黑糖和红糖。

[0017] 更进一步地,步骤(5)中发酵过程为:在25~30°C的温度下发酵,活性复合微生物进行营养和繁殖,发酵7d后,没有大量气体产生时,密封发酵罐,以便杀灭病原菌、虫卵等,为了提高无害化处理程度,这个阶段至少保持15~20d。发酵过程继续,并逐渐转化为比较稳定的微生态产品。当温度稳定后,且pH到达或接近5.0时显示发酵成熟,并冷却;发酵结束,将发酵液混匀,浓缩,离心,过滤,巴氏灭菌并冷却,检测,调配后得到液态的减肥降血脂微生态产品;贮藏在无阳光直射、阴凉通风处。经检测,上述液态型微生态产品呈棕黄色;pH 5.0~7.5,12个月内各种配方菌总含量 $\geq 10^9\text{cfu/g (mL)}$,符合标准。

[0018] 有益效果

相比于现有技术,本发明的有益效果为:

(1)我们的动物实验显示,活性复合微生物菌剂及其衍生物不仅能够高效的降低血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇的水平,而且能减少高脂饮食所引起的大鼠体重的增加和脂肪的堆积,起到控制和减轻体重的目的,具有减肥的功效。因此,本发明的目的是为了提供一种有效降低血清总胆固醇、甘油三酯水平和减肥微生态生物制剂及保健食品,特别是原创性活性复合微生物菌剂及其衍生物的精准个性化应用。本发明涉及活性复合微生物菌剂及其衍生物在制备降血脂和辅助减肥产品方面的应用。该复合菌剂及其衍生物可以制备功能饮料、保健食品或药品等。

[0019] (2)上述本发明通过对粪便样本的微生物菌群进行生物信息分析,优化和制定具有针对性的、动态的活性复合微生物菌剂配方,利用该菌剂配方对天然无毒植物类进行发酵,在个性化构建的活性复合微生物菌剂的作用下,使植物成分充分分解后腐熟,得到优质的个性化活性复合微生物菌剂及其衍生物;本发明的特点在于通过复合微生物发酵,能够提高产品的稳定性,免去添加任何化学试剂等危害;发酵制备过程中能够促进物质的代谢反应,大量产生和积累初级及次级代谢(衍生)产物,生成低聚糖、糖醇、酶类、低聚肽等多种有益成分;同时,保留自身多样性的共生菌群的功能;这些有益成分可以促进有益菌群的增殖,抑制有害菌群的繁殖及腐败物质形成,起到调节菌群平衡等作用,对个体有多种有益功效。

[0020] (3)本发明采用来自于大自然环境的天然多种活性复合微生物菌种及多样化组成

(根据生物信息分析结果),对多种天然植物进行长期稳定的发酵,能够使发酵过程更为充分,使天然植物中包含的丰富营养成分的代谢更为完全,产生更多的营养成分及微生物的衍生物,并能充分地保护有益的天然多种菌种的原有功能。

[0021] (4)本发明通过结合当前最前沿的生物信息技术,解决了传统单一的生产工艺,过滤分离后得到液态的减肥降血脂微生态产品,使资源进一步得到优化和良性循环,在现代农业领域中得到充分地精准应用,填补产业空白,极大地符合我国国情,应用前景广阔。

[0022] (5)本发明在发酵制备过程中能够促进物质的代谢反应,大量产生和积累初级及次级代谢(衍生)产物,生成低聚糖、糖醇、酶类、低聚肽等多种有益成分;同时,保留自身多样性的共生菌群的功能;这些有益成分可以促进有益菌群的增殖,抑制有害菌群的繁殖及腐败物质形成,起到调节人体肠道菌群平衡、增强个体免疫、延缓衰竭等作用,对个体有多种有益功效。

附图说明

[0023] 图1为本发明中减肥降血脂微生物菌剂制备方法概要图;

图2为本发明中构建肠道微生物数据库的流程示意图;

图3为本发明中制定减肥降血脂微生态个性化菌剂配方的流程示意图。

[0024] 图4为本发明中个性化活性复合微生物菌剂及其衍生物的生产简单工艺流程

具体实施方式

[0025] 为了对本发明作进一步的阐述,列举下面的个别实施案例。同时郑重声明:这些所述案例不以任何方式限制本发明的范围,本发明不仅仅局限于所述这些实例,在权利要求的范围内所做出的某些改变和调整也应属于本发明的范围。

[0026] 实施案例(动物实验)

国际上,大量的实验已验证,用大鼠进行血脂调节的保健食品和/或药品功能评价实验的方法很成熟和可靠。我国部颁标准方法《保健食品功能评价程序及检验方法》已明确规定可用大鼠作为实验材料来进行降血脂保健食品和/或药品功效筛选、精准检测和评价实验。因此,本发明设计的降血脂和体重减轻。为了定制符合其个体需求的菌剂,首先,构建正常大鼠微生物数据库,通过高通量16S rRNA基因测序,获得该30只Wistar雄性大鼠粪便样本中微生物组成分布比例信息(流程如图1和2所示),然后按照下述方法确定动态菌剂配方(如图3所示。大鼠动物试验如下:

(1)粪便样本处理:采用微珠打碎法抽提并纯化样本中的微生物DNA,采用515F/ 806R PCR 引物对微生物DNA的16S rRNA基因的V4高变区进行扩增;515F/ 806R PCR 引物为515F:GTGCCAGCMGCCGCGGTAA,806R :GGACTACHVGGGTWTCTAAT。

[0027] (2)测定粪便中微生物总量:提取粪便中微生物的总DNA,然后以16S rRNA作为目标序列,使用515F/ 806R PCR引物进行绝对定量,以大肠杆菌作为标准品,梯度为 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} , 5×10^{11} , 10^{12} 拷贝数/g;该粪便样本中总微生物含量为 2×10^{11} 拷贝数/g。

[0028] (3)鉴定粪便中不同微生物菌群比例:通过高通量基因测序技术对扩增的产物进行测序,对测序结果进行分析评估,将测序结果与16S rRNA的微生物基因序列数据库进行

对比(16S rRNA的微生物基因序列数据库的构建方法为:通过对公共数据库(RDP、SILVA、GreenGene、UNITE等)中细菌遗传信息筛选选择粪便样本中常见几百种菌株的约1.8kb大小的16S rRNA基因的DNA序列,数据库中包括菌株的详细系统分类名称和DNA序列信息),确定样本中不同活性微生物菌群的相对含量和比例;经测序,确定该样本中含植物乳杆菌: 5.0×10^8 拷贝数/ml(g);干酪乳杆菌: 2.0×10^8 拷贝数/ml(g);双歧杆菌: 3.0×10^9 拷贝数/ml(g);嗜热链球菌: 1.0×10^8 拷贝数/ml(g);和多形拟杆菌: 1.0×10^{10} 拷贝数/ml(g)等。

[0029] (4)确定菌剂配方:将测定的微生物菌群含量与数据库中该微生物菌群的含量分布进行比较(粪便微生物数据库的建立方法为通过高通量16S rRNA基因测序获得该种族的大鼠粪便样本中微生物组成分布比例信息,如图2所示),相对含量 $\leq 25\%$,则提供的菌剂配方中该微生物菌群的活性含量不低于 5×10^{10} cfu/g (mL);若相对含量 $> 25\%$,则提供的菌剂配方中该微生物菌群的活性含量不低于 1×10^{10} cfu/g (mL);

该种族不同粪便样本中植物乳杆菌含量 $\leq 25\%$ 为 2.2×10^8 拷贝数/g(25%的临界值,下同),干酪乳杆菌含量 $\leq 25\%$ 为 1.6×10^8 拷贝数/g,双歧杆菌含量 $\leq 25\%$ 为 8×10^9 拷贝数/g,嗜热链球菌 $\leq 25\%$ 为 5×10^8 拷贝数/g;多形拟杆菌含量 $\leq 25\%$ 为 5.6×10^9 拷贝数/g。

[0030] 案例一

(5)实验动物分组:高血脂症大鼠动物模型-本发明选用健康清洁8周龄,200-225g Wistar雄性大鼠30只,适应性饲养3天后,随机分为2组(正常组:10只,高脂模型组:20只),具体分组如表1所示。

[0031] 表1实验动物分组情况

组别	喂养	持续时间至
正常对照组(10只)	基础饲料+水	第30天
高脂模型组(20只)	高脂饲料+水	第30天

采用高脂饲料喂养法来建造高脂血症大鼠动物模型。高脂饲料的配方为:78.8%基础饲料(粗蛋白 $\geq 18.0\%$,粗脂肪 $\geq 4.0\%$,粗纤维 $\leq 5.0\%$,赖氨酸 $\geq 0.82\%$,粗灰分 $\leq 8.0\%$,水分 $\leq 10.0\%$,钙1.0-1.8%,磷0.6-1.2%,食盐0.3-0.8%)、1%胆固醇、10%蛋黄粉、10%猪油、0.2%胆酸盐。正常对照组进食正常基础饲料,高脂模型组和高脂模型治疗组进食高脂饲料,三组动物均饮用自来水(经紫外线消毒)。

[0032] (6)第30天,分别从正常大鼠和高脂模型组大鼠眼眶取血,检测大鼠血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量。大鼠血清的测定:按照表1的方式饲喂大鼠,30天试验结束后禁食12h,采取眼眶取血的方法收集各组大鼠的血液并加少量肝素以防血液凝固,静置10min后,3000g离心15min,收集血清。选用血脂检测试剂盒测量大鼠血清的TC、TG和LDL-C的含量,结果如表2所示。

[0033] 表2大鼠血脂的分析:30天高脂饮食对大鼠血脂的影响

组别	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)
正常对照组	1.41 ± 0.29	0.76 ± 0.10	1.74 ± 0.09
高脂模型组	$2.37 \pm 0.27^*$	0.81 ± 0.11	1.7 ± 0.11

由表2可知,高脂模型组的TC与正常对照组相比,差异显著,说明高脂血症大鼠模型建立成功。

[0034] (7)大鼠体重的测定:开始实验前每只大鼠测体重,然后实验每30天测一次体重,测体重前禁食 12h,结果如表3所示。

[0035] 表3大鼠体重的变化:30天高脂饮食对大鼠体重的影响

组别	0天(体重平均值g)	第30天(体重平均值g)
正常对照组(10 只)	214.53±3.87	243.61±3.96
高脂模型组(20 只)	213.71±4.04	282.16±5.28*

由表3可知,高脂模型组的大鼠体重与正常对照组相比,差异显著,进一步证明肥胖、高血脂症大鼠模型建立成功。

[0036] (8)30天后,由于大鼠模型建立成功,再随机将高脂模型组分为2组(高脂模型组和高脂模型治疗组),每组10 只,具体分组如表4所示。检测高脂模型治疗组大鼠粪便中不同微生物菌群比例,并将测定的微生物菌群含量与数据库中该正常大鼠微生物菌群的含量分布进行比较,以分别制定高脂模型治疗组大鼠个性化的菌群配方。此时,继续正常对照组进食正常基础饲料,高脂模型组和高脂模型治疗组进食高脂饲料,三组大鼠均饮用自来水(经紫外线消毒),具体如表4所示。

[0037] 表4实验动物分组情况

组别	喂养	灌胃:2次/天,300 μ l/次/只	持续时间至
正常对照组(10 只)	基础饲料+水	生理盐水	第90天
高脂模型组(10 只)	高脂饲料+水	生理盐水	第90天
高脂模型治疗组(10 只)	高脂饲料+水	个性化活性复合微生物菌剂及其衍生物	第90天

高脂模型治疗组:优选并将个性化复合微生物菌剂及其衍生物(按如下比例调配设计),对大鼠进行灌胃,每天二次(上下午各一次),300 μ l/次/只;个性化配方的复合微生物菌剂配方为:植物乳杆菌: 5.0×10^{10} (cfu)/ml(g);干酪乳杆菌: 2.0×10^{10} (cfu)/ ml(g);双歧杆菌: 3.0×10^{10} (cfu)/ ml(g);嗜热链球菌: 1.0×10^{10} (cfu)/ ml(g);和多型拟杆菌: 1.0×10^{10} (cfu)/ ml(g)。

[0038] (9)第90天,分别从正常大鼠、高脂模型和高脂模型治疗组大鼠眼眶取血,检测大鼠血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量。

[0039] 大鼠血清的测定

按照表4的方式饲喂大鼠,第90天试验结束后禁食12h,采取眼眶取血的方法收集各组大鼠的血液并加少量肝素以防血液凝固,静置10min后,3000g离心15min,收集血清。选用血脂检测试剂盒测量大鼠血清的TC、TG和 LDL-C的含量,结果如表5所示。

[0040] 表5大鼠血脂的分析:90天后,个性化活性复合微生物菌剂对大鼠血脂的影响

组别	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)
正常对照组(10 只)	1.64±0.59	0.82±0.14	1.81±0.07
高脂模型组(10 只)	3.01±0.57*	1.51±0.31*	3.49±0.28*
高脂模型治疗组(10 只)	2.04±0.51**	0.91±0.19**	2.01±0.32**

由表5可知,高脂模型组的TC、TG、LDL-C与正常对照组相比,差异极显著,说明高血脂症大鼠模型建立成功。

[0041] 又由表5知,与高脂模型组相比,个性化活性复合微生物菌剂及其衍生物治疗的高脂模型治疗组的大鼠TC、TG和LDL-C显著性降低;显示活性复合微生物菌剂对高脂喂养的大

鼠具有显著的降血脂作用。由此可见,活性复合微生物菌剂具有调节血脂代谢,甚至预防和与治疗与血脂代谢异常相关的心脑血管疾病等。

[0042] (10)大鼠体重的测定:开始实验前每只大鼠测体重,实验每30天测一次体重,测体重前禁食 12h,结果如表6所示。

[0043] 表6大鼠体重的变化:90天后,个性化复合微生物菌剂和高脂饮食对大鼠体重的影响

组别	第30天(g)	第60天(g)	第90天(g)
正常对照组(10 只)	243.61±3.96	265.42±3.07	283.46±2.34
高脂模型组(10 只)	280.33±4.21*	337.81±4.23*	379.63±3.79*
高脂模型治疗组(10 只)	283.99±3.25*	309.17±6.54#	331.72±5.27#

由表6可知,高脂模型组的大鼠体重与正常对照组相比,差异显著,说明肥胖、高脂血症大鼠模型建立成功。

[0044] 根据表6不同组间大鼠体重的变化趋势可以明显的看出,从60天后,个性化活性复合微生物菌剂及其衍生物治疗的高脂模型治疗组大鼠体重明显比高脂模型组低;特别是,在第90天基本接近正常对照组大鼠的体重,显示效果显著。以上结果表明个性化活性复合微生物菌剂及其衍生物在控制和减轻大鼠体重方面具有明显的作用,适合原创性开发与辅助减肥作用相关的微生态产品。

[0045] 案例二

(11)实验动物分组:高血脂症大鼠动物模型-本发明选用健康清洁16周龄,230-250g Wistar雄性大鼠30只,适应性饲养3天后,随机分为2组(正常组:10 只,高脂模型组:20 只),具体分组如表1所示。采用同样的高脂饲料喂养法来建造高脂血症大鼠动物模型。

[0046] (12)第30天,分别从正常大鼠和高脂模型组大鼠眼眶取血,检测大鼠血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量。大鼠血清的测定:采用相同的方法收集血清。选用血脂检测试剂盒测量大鼠血清的TC、TG和 LDL-C的含量,结果如表7所示。

[0047] 表7大鼠血脂的分析:30天高脂饮食对大鼠血脂的影响

组别	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)
正常对照组	1.61±0.32	0.91±0.21	1.93±0.11
高脂模型组	2.71±0.29*	0.95±0.08	2.01±0.13

由表7可知,高脂模型组的TC与正常对照组相比,差异显著,说明高脂血症大鼠模型建立成功。

[0048] (13)大鼠体重的测定:开始实验前每只大鼠测体重,然后实验每30天测一次体重,测体重前禁食 12h,结果如表8所示。

[0049] 表8大鼠体重的变化:30天高脂饮食对大鼠体重的影响

组别	0天(体重平均值g)	第30天(体重平均值g)
正常对照组(10 只)	234.27±2.26	253.41±2.45
高脂模型组(20 只)	231.31±2.07	307.43±4.17*

由表8可知,高脂模型组的大鼠体重与正常对照组相比,差异显著,进一步证明肥胖、高脂血症大鼠模型建立成功。

[0050] (14) 30天后,由于大鼠模型建立成功,再随机将高脂模型组分为2组(高脂模型组和高脂模型治疗组),每组10只,具体分组如表9所示。检测高脂模型治疗组大鼠粪便中不同微生物菌群比例,并将测定的微生物菌群含量与数据库中该正常大鼠微生物菌群的含量分布进行比较,以分别制定高脂模型治疗组大鼠个性化的菌群配方。此时,继续正常对照组进食正常基础饲料,高脂模型组和高脂模型治疗组进食高脂饲料,三组大鼠均饮用自来水(经紫外线消毒),具体如表9所示。

[0051] 表9实验动物分组情况

组别	喂养	灌胃:2次/天,300 μ l/次/只	持续时间至
正常对照组(10只)	基础饲料+水	生理盐水	第90天
高脂模型组(10只)	高脂饲料+水	生理盐水	第90天
高脂模型治疗组(10只)	高脂饲料+水	个性化活性复合微生物菌剂及其衍生物	第90天

高脂模型治疗组:优选并将个性化复合微生物菌剂及其衍生物(按如下比例调配设计),对大鼠进行灌胃,每天二次(上下午各一次),300 μ l/次/只;个性化配方的复合微生物菌剂配方为:植物乳杆菌: 4.0×10^{10} (cfu)/ml(g);干酪乳杆菌: 3.0×10^{10} (cfu)/ml(g);双歧杆菌: 6.0×10^{10} (cfu)/ml(g);嗜热链球菌: 2.0×10^{10} (cfu)/ml(g);和多型拟杆菌: 1.0×10^{10} (cfu)/ml(g)。

[0052] (15) 第90天,分别从正常大鼠、高脂模型和高脂模型治疗组大鼠眼眶取血,检测大鼠血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量。

[0053] 大鼠血清的测定

按照表9的方式饲喂大鼠,第90天试验结束后禁食12h,采取眼眶取血的方法收集各组大鼠的血液并收集血清。选用血脂检测试剂盒测量大鼠血清的TC、TG和LDL-C的含量,结果如表10所示。

[0054] 表10大鼠血脂的分析:90天后,个性化活性复合微生物菌剂对大鼠血脂的影响

组别	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)
正常对照组(10只)	1.71 ± 0.73	0.94 ± 0.2	1.89 ± 0.12
高脂模型组(10只)	$3.34 \pm 0.68^*$	$1.83 \pm 0.52^*$	$3.78 \pm 0.29^*$
高脂模型治疗组(10只)	$1.99 \pm 0.63^{**}$	$1.01 \pm 0.36^{**}$	$2.03 \pm 0.28^{**}$

由表10可知,高脂模型组的TC、TG、LDL-C与正常对照组相比,差异显著,说明高脂血症大鼠模型建立成功。

[0055] 又由表10知,与高脂模型组相比,个性化活性复合微生物菌剂及其衍生物治疗的高脂模型治疗组的大鼠TC、TG和LDL-C显著性降低;显示活性复合微生物菌剂对高脂喂养的大鼠具有显著的降血脂作用。由此可见,个性化活性复合微生物菌剂具有调节血脂代谢,甚至预防和治疗与血脂代谢异常相关的心脑血管疾病等。

[0056] (16) 大鼠体重的测定:开始实验前每只大鼠测体重,实验每30天测一次体重,测体重前禁食12h,结果如表11所示。

[0057] 表11大鼠体重的变化:90天后,个性化复合微生物菌剂和高脂饮食对大鼠体重的影响

组别	第30天(g)	第60天(g)	第90天(g)
正常对照组(10只)	253.41 ± 2.45	297.23 ± 4.19	311.23 ± 3.25

高脂模型组(10 只)	305.56±5.24*	371.37±4.51*	419.61±4.41*
高脂模型治疗组(10 只)	309.61±4.17*	321.39±5.18#	337.19±4.09#

由表11可知,高脂模型组的大鼠体重与正常对照组相比,差异显著,说明肥胖、高血脂症大鼠模型建立成功。

[0058] 根据表11不同组间大鼠体重的变化趋势可以明显的看出,从60天后,个性化活性复合微生物菌剂及其衍生物治疗的高脂模型治疗组大鼠体重明显比高脂模型组低;特别是,在第90天基本接近正常对照组大鼠的体重,显示效果显著。以上结果表明个性化活性复合微生物菌剂及其衍生物在控制和减轻大鼠体重方面具有明显的作用,适合原创性开发与辅助减肥作用相关的微生态产品。

[0059] (17) 个性化活性复合微生物菌剂及其衍生物的生产简单工艺流程(图4)。

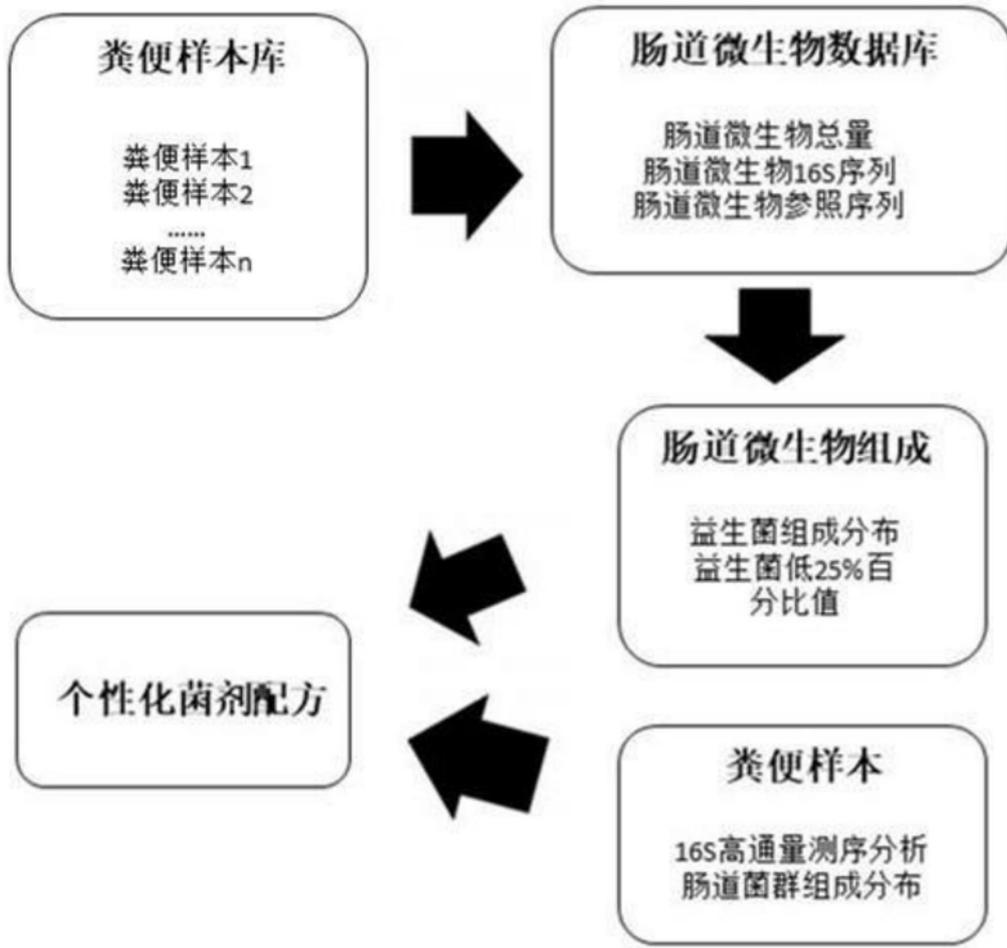


图1

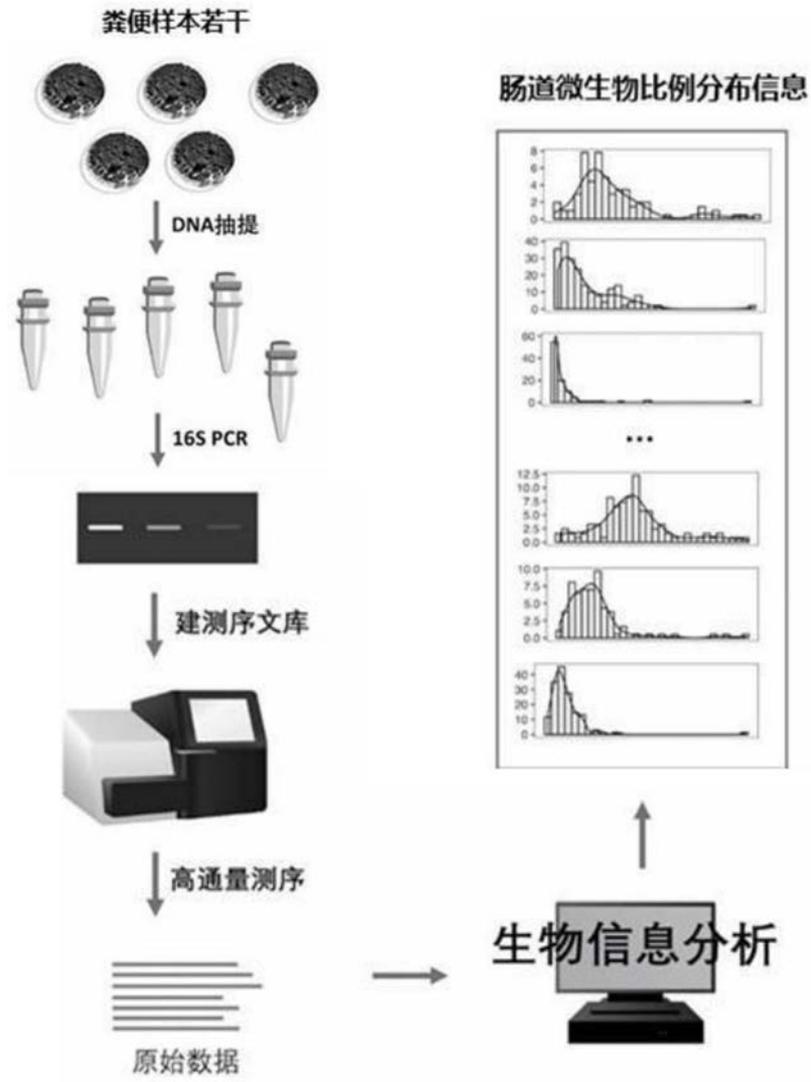


图2

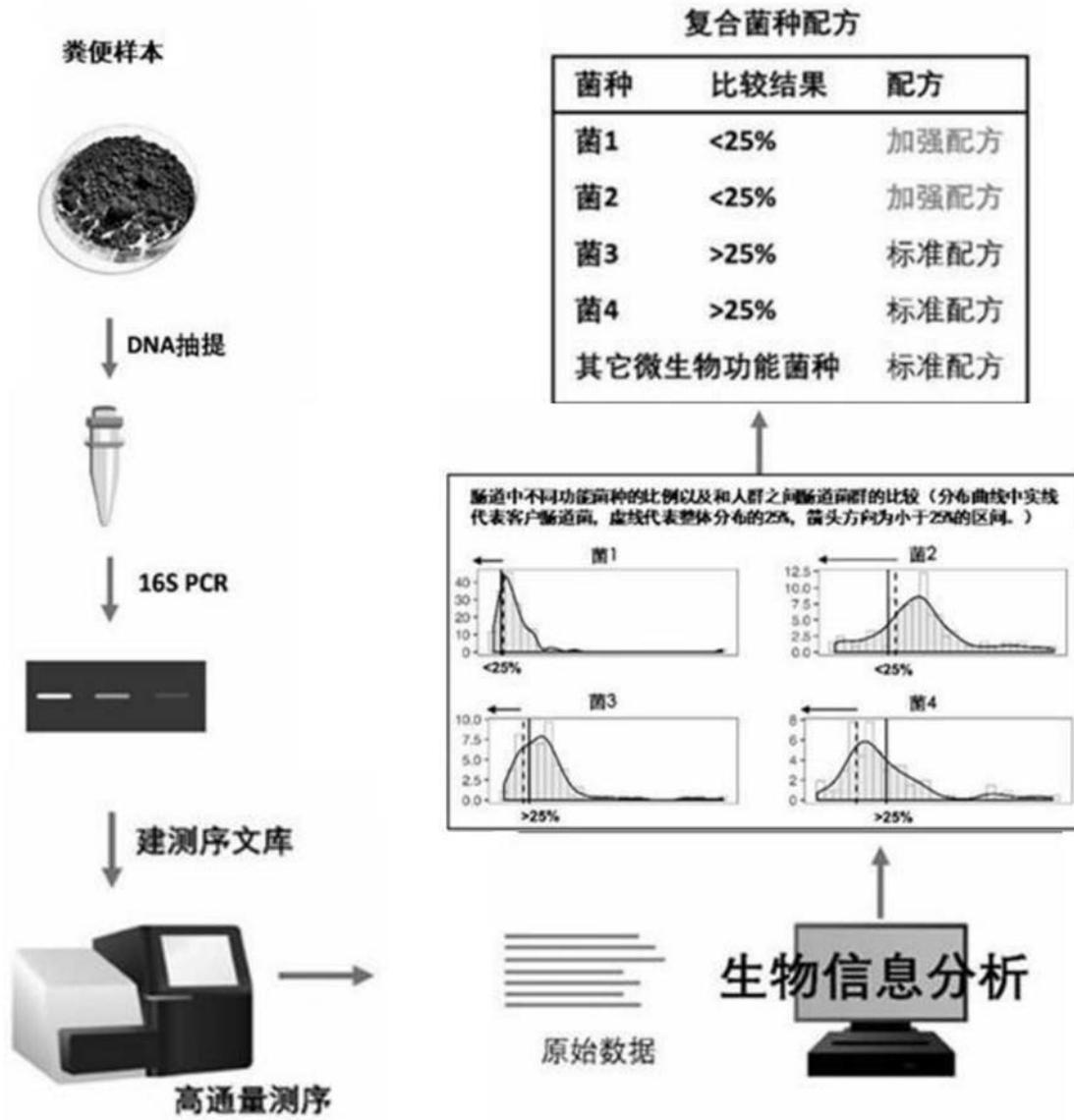


图3

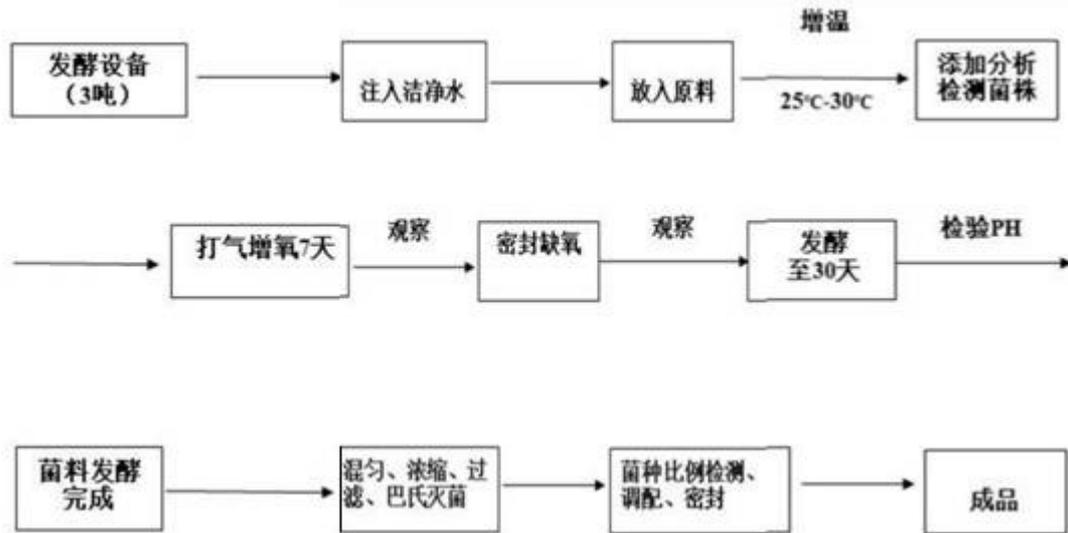


图4