



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104531549 B

(45)授权公告日 2018.08.10

(21)申请号 201410578613.3

(22)申请日 2014.10.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104531549 A

(43)申请公布日 2015.04.22

(66)本国优先权数据
201410227762.5 2014.05.28 CN

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:M2013513 2013.10.25

(73)专利权人 西南大学
地址 400716 重庆市北碚区天生路2号

(72)发明人 索化夷 李键 蹇宇 赵欣
陈炼红 兰道亮 谢婕

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A23C 9/123(2006.01)

C12R 1/225(2006.01)

(56)对比文件

CN 101144065 A,2008.03.19,

CN 1701116 A,2005.11.23,

CN 1701116 A,2005.11.23,

EP 2520644 A1,2012.11.07,

Viola Stropfová等.Synbiotic

administration of canine-derived strain

Lactobacillus fermentum CCM 7421 and

inulin to healthy dogs.《Can. J.

Microbiol》.2013,347-352.

审查员 徐俊

权利要求书1页 说明书11页 附图3页

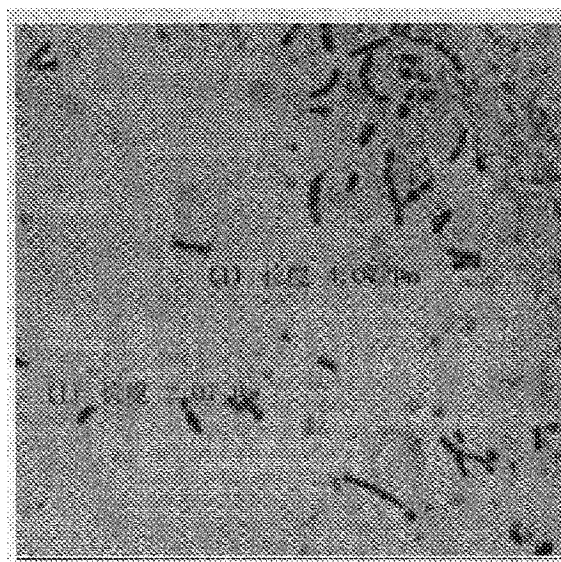
(54)发明名称

一种可调节肠道运动、预防便秘的发酵乳杆菌Lactobacillus fermentum strain Zhao及其用途

(57)摘要

本发明公开了一种可调节肠道运动、预防便秘的发酵乳杆菌(Lactobacillus fermentum strain Zhao)保藏编号为CCTCC NO:M 2013513及其用途,该菌株的耐酸性较强,在pH3.0的人工胃液下3h后存活率达到了85.12±5.18%,在1.0%浓度胆盐下可以缓慢生长,生长效率达到无胆盐培养的18.33±0.52,Lactobacillus fermentum strain Zhao细胞的疏水性也达到了70.80±0.61%。能在人的肠道内正常生长。小鼠体内试验还表明,发酵乳杆菌(Lactobacillus fermentum strain Zhao)能够减缓便秘引起的小鼠体重减轻趋势,加快排黑便时间,提高小肠推进率,不同程度的增加血清的MTL、Gas、ET、AchE、SP和VIP因子水平,降低SS因子,增加摄食量和饮水量,降低排便量、排便颗粒数和粪便含水量下降的趋势,与便秘药物起到相似的作用,

表现出一定的便秘预防效果。



1. 一种可调节肠道运动、预防便秘的发酵乳杆菌,所述发酵乳杆菌为*Lactobacillus fermentum strain zhao*,于2013年10月30日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:M2013513。

2. 如权利要求1所述的发酵乳杆菌在制备发酵食品中的用途,其特征在于,所述发酵食品为含有发酵乳杆菌*Lactobacillus fermentum strain zhao*的乳酸菌奶饮料、乳粉、胶囊制品或发酵乳中的一种或多种。

一种可调节肠道运动、预防便秘的发酵乳杆菌*Lactobacillus fermentum strain Zhao*及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,尤其涉及一种可调节肠道运动、预防便秘的发酵乳杆菌*Lactobacillus fermentum strain Zhao*及其用途。

背景技术

[0002] 乳杆菌与人类生活关系密切,是广泛应用于食品发酵、工业乳酸发酵及医疗保健领域中的有益微生物之一。现已认识的乳杆菌属和双歧杆菌属中的许多种都具有特定的优良性质和遗传性状,表现出极强的益生菌特性。乳杆菌不仅能够提高食品营养价值,改善食品风味,延长保存时间,还可以改善食品的功能性质。它能够通过分解食物中的蛋白质、糖类、合成维生素,提高食物的消化率和生物价,促进消化吸收。还能够减少人体胆固醇含量、增强免疫功能、抗变异原性、抗肿瘤、抗高血压等。近年来,乳杆菌以其特殊的生理活性和营养功能而成为益生菌的主要来源,正日益引起人们的重视。

[0003] 便秘是非常普遍的一种疾病,在人群中的患病率高达27%,它可以影响各年龄段的人。习惯性便秘因用力增加腹压,屏气使劲排便,是诱发中老年男性高血脂、心脑血管疾病、动脉硬化、肿瘤等疾病及其并发症的罪魁祸首,从而导致老人心脑血管病变死亡率急剧增加,出现痔疮、肛裂等问题,令人痛苦不堪。另外长期便秘,大量便渣会滞留在肠道内发酵、腐烂,大量毒素和有害菌被肠道反复吸收,通过血液循环到达人体各部位,成为女性健康和美丽的罪魁祸首。便秘还会使小孩胃肠道菌群失衡,导致精力不集中、思维迟钝、营养不良、心情急躁、消瘦、免疫力下降、易感冒、生长迟缓,如不及时调理,可能造成不可逆的病变。因便秘发病率高、病因复杂,患者常有许多苦恼,便秘严重时会影响生活质量。因此,寻找一种能够代替药物来预防便秘的生物制品有很大的现实意义,微生态疗法恰是以一个崭新的手段解决了传统疗法存在的多种问题。

[0004] 国内外对乳酸菌的生理功能有大量的研究报道,但对乳酸菌预防便秘的功能性研究报道很少。关于乳酸菌预防便秘的研究对食品科学、预防医学和微生物学等许多学科都有很大价值。发酵乳制品是人们摄入乳酸菌的一条重要渠道,筛选优良的具有预防便秘和安全的乳酸菌菌株,对于开发功能性乳制品、丰富现有乳制品种类、提高乳品的附加值将具有重要意义。因此,具有预防便秘的乳酸菌具很大的研究和应用价值。

[0005] 在目前已经公开的文献与专利或专利申请中,例如CN101144064A公开了一种具有抗致突变活性、产胞外多糖的短乳杆菌及其用途,用于发酵食品中以改善食品品质,增加其营养学功能。CN1796540A公开了具有抗肠道致病菌和抗氧化特性的双歧杆菌及其用途,用于制备食品组合物或药物组合物,杀死或抑制幽门螺旋杆菌或大肠杆菌,治疗由其引起的各种疾病。CN102174450A公开了一种抗幽门螺杆菌感染的植物乳杆菌及其用途,用于制备药物组合物、发酵剂、动物饲料添加剂和保健品中来预防或减轻幽门螺杆菌的感染。CN101144065A公开了一种耐过氧化氢、清除自由基的抗氧化干酪乳杆菌及其用途,用于发酵食品及乳品胶囊制品中以开发功能性乳制品、丰富现有乳制品种类、提高乳品的附加值。

但是,这些专利或专利申请没有完全涉及具有调节肠道运动、预防便秘等性能的微生物。因此,目前还需要有一种具有调节肠道运动、预防便秘的微生物及其含有它们的食品。

发明内容

[0006] 为了解决上述问题,本发明提供了一种可调节肠道运动、预防便秘的发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum strain Zhao* 及其用途,主要提供一种可调节肠道运动、预防便秘的发酵乳杆菌菌株和提供一种所述发酵乳杆菌在发酵食品中的用途。

[0007] 本发明提供的一种可调节肠道运动、预防便秘的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 于2013年10月30日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 该保藏中心位于:中国.武汉.武汉大学,保藏编号为CCTCC NO:M2013513。

[0008] 本发明人从自然发酵牦牛酸乳中筛选出一株发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*), 利用形态特征、培养性状和生理生化特征等微生物学特性对该乳酸杆菌 *Lactobacillus fermentum strain Zhao* 鉴定为发酵乳杆菌,该菌株已于2013年10月30日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为CCTCC NO:M2013513。

[0009] 所述发酵乳杆菌的形态学特征具体为:

[0010] 菌体特征:呈革兰氏染色阳性,细胞杆状,菌体约0.5-1.0 μ m宽,1.5-4 μ m长,成单、成对或者成链,不形成芽孢,两端圆形。

[0011] 菌落特征:在MRS培养基上形成明显的菌落,直径在0.5-2.0mm之间,圆形,边缘整齐,乳白色,透明,表面湿润光滑,不产生色素。

[0012] 所述发酵乳杆菌体内耐受特征为:

[0013] 发酵乳杆菌的菌株耐酸性较强,在pH3.0的人工胃液下3h后存活率达到了85.12 \pm 5.18%;在1.0%浓度胆盐下可以缓慢生长,生长效率达到无胆盐培养的18.33 \pm 0.52%;发酵乳杆菌细胞的疏水性达到了70.80 \pm 0.61%。

[0014] 所述发酵乳杆菌来源于传统发酵食品,属公认安全 (Generally Recognized As Safe, GRAS) 菌种,用于发酵食品中。

[0015] 所述发酵食品为含有发酵乳杆菌的乳酸菌奶饮料、乳粉、胶囊制品或发酵乳中的一种或多种。

[0016] 所述含有发酵乳杆菌的乳酸菌奶饮料是按照下述步骤制备得到的:

[0017] 所述发酵乳杆菌的原始菌种在温度-75 $^{\circ}$ C下以30% (重量) 甘油悬液形式保存,或者在温度4 $^{\circ}$ C下以冷冻干燥菌粉的形式保存备用;

[0018] 利用所述发酵乳杆菌的原始菌种制备发酵乳杆菌工作发酵剂;

[0019] 原料乳在95 $^{\circ}$ C下加热杀菌20min或在140 $^{\circ}$ C下高温热杀菌2s,冷却到4 $^{\circ}$ C,加入所述发酵乳杆菌工作发酵剂,使其浓度达到10⁶cfu/mL以上,在4 $^{\circ}$ C冷藏保存;

[0020] 所述的原料乳是一种或多种选自脱脂奶、鲜奶、复原奶的原料乳。

[0021] 所述含有发酵乳杆菌的乳粉是按照下述步骤制备得到的:

[0022] 所述发酵乳杆菌的原始菌种在温度-75 $^{\circ}$ C下以30% (重量) 甘油悬液形式保存,或者在温度4 $^{\circ}$ C下以冷冻干燥菌粉的形式保存备用;

[0023] 利用所述发酵乳杆菌的原始菌种制备发酵乳杆菌工作发酵剂;

[0024] 原料乳在95 $^{\circ}$ C下加热杀菌20min或在140 $^{\circ}$ C下高温热杀菌2s,然后冷却到37 $^{\circ}$ C,再

以原料乳体积的4%接菌量接种所述的发酵乳杆菌工作发酵剂,37℃下发酵16h,得到发酵乳杆菌发酵乳;所述发酵乳杆菌发酵乳和灭菌后的原料乳按照1:3(V:V)配比加入,进行均质,真空浓缩、喷雾干燥得到含发酵乳杆菌的乳粉。

[0025] 所述含有发酵乳杆菌的胶囊制品是按照下述步骤制备得到的:

[0026] 所述发酵乳杆菌的原始菌种在温度-75℃下以30%(重量)甘油悬液形式保存,或者在温度4℃下以冷冻干燥菌粉的形式保存备用;

[0027] 利用所述发酵乳杆菌的原始菌种制备发酵乳杆菌工作发酵剂;

[0028] 将原料乳在140℃高温热杀菌2s,然后冷却至37℃,以原料乳体积的4%接菌量接种所述发酵乳杆菌工作发酵剂,在37℃下发酵16h,得到发酵乳杆菌发酵乳;将所述发酵乳杆菌发酵乳和灭菌后的原料乳按照以1:3(V:V)配比加入,均质,真空浓缩、喷雾干燥处理后得到乳粉,将得到含有发酵乳杆菌的胶囊制品。

[0029] 所述含有发酵乳杆菌的发酵乳是按照下述步骤制备得到的:

[0030] 所述发酵乳杆菌的原始菌种在温度-75℃下以30%(重量)甘油悬液形式保存,或者在温度4℃下以冷冻干燥菌粉的形式保存备用;

[0031] 利用所述发酵乳杆菌的原始菌种制备发酵乳杆菌工作发酵剂;

[0032] 原料乳在95℃下加热杀菌20min或在140℃下高温热杀菌2s,然后冷却到37℃,再按照3-5%(体积)加入发酵乳杆菌工作发酵剂,再加入3-5%(体积)可共生的用于制备发酵乳制品的发酵剂,混匀后在37℃下混菌发酵至滴定酸度以乳酸计0.6-0.7%,然后冷却至4℃,再进行冷藏保存得到含有发酵乳杆菌的发酵乳

[0033] 所述发酵乳杆菌工作发酵剂的制备方法包括:

[0034] 将所述发酵乳杆菌的原始菌种接种于12%(重量)的脱脂乳中,110℃灭菌10min,在37℃条件下培养14-16h至凝乳,连续培养活化两代,用作母发酵剂;将所述母发酵剂按3-5%(体积)接种于灭菌乳中,培养14-16h至凝乳,至该凝乳中的活菌数约 10^9 cfu/mL,得到工作发酵剂,可以直接将这种工作发酵剂添加到食品中,或者与可共生的制备发酵乳的商业发酵剂如保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌一起使用制备发酵乳;或

[0035] 将所述发酵乳杆菌的原始菌种接种于MRS液体培养基中,在37℃条件下培养12-16h进行活化,连续活化两代,然后将活化培养物按2-4%(体积)接种于MRS培养基中,培养16-18h,在4℃条件下4000r/min离心15min,去除上清液,得到细胞沉淀,将沉淀用无菌脱脂乳制成悬浮液,得到工作发酵剂。

[0036] 所述的加热杀菌是例如使用上海沃迪自动化装备股份有限公司销售的TW10D1000型管式杀菌机进行的。

[0037] 所述的高温热杀菌是例如使用北京勇创嘉业机械设备有限公司销售的YC-104型板式超高温杀菌机进行的。

[0038] 所述的均质是例如使用常州市均质机械有限公司销售的GJB500-40小型均质机进行的。

[0039] 所述的浓缩是例如使用上海伟宙轻工机械有限公司销售的真空浓缩锅进行的。

[0040] 所述的喷雾干燥是例如使用上海沃迪科技有限公司销售的实验型喷雾干燥机进行的。

[0041] 所述的商品发酵剂优选的是保加利亚乳杆菌或嗜热链球菌。

[0042] 在本发明的意义上,所述的原料乳是一种或多种选自脱脂奶、鲜奶、复原奶的原料乳。

[0043] 本发明实施例的技术方案带来的有益效果如下:

[0044] 本发明为一种分离自四川省红原县牧民家自然发酵牦牛酸乳中的可调节肠道运动、预防便秘的发酵乳杆菌和以该菌株为发酵剂或添加的发酵乳、健康食品以及动物保健制品中的应用,发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 菌株的耐酸性较强,在pH3.0的人工胃液下3h后存活率达到了 $85.12 \pm 5.18\%$,在1.0%浓度胆盐下可以缓慢生长,生长效率达到无胆盐培养的 $18.33 \pm 0.52\%$,*Lactobacillus fermentum strain Zhao* 细胞的疏水性也达到了 $70.80 \pm 0.61\%$ 。这表明发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 能在人的肠道内正常生长。小鼠体内试验还表明,发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 能够减缓便秘引起的小鼠体重减轻趋势,加快排黑便时间,提高小肠推进率,不同程度的增加血清的MTL、Gas、ET、AchE、SP和VIP因子水平,降低SS因子,增加摄食量和饮水量,降低排便量、排便颗粒数和粪便含水量下降的趋势,与便秘药物起到相似的作用,表现出一定的便秘预防效果。

附图说明

[0045] 为了更清楚的说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单的介绍,显而易见的,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0046] 图1发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 菌落形态

[0047] 图2发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 的菌体形态 (1000x)

[0048] 图3小鼠体重随实验时间的变化

[0049] 图4不同组小鼠首次排黑便所需时间

[0050] 图5不同组小鼠的小肠总长度

[0051] 图6不同组小鼠的小肠推进率

[0052] 图7不同组小鼠血清中各因子水平

[0053] 本发明的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 于2013年10月30日保藏于中国典型培养物保藏中心,该保藏中心位于:中国.武汉.武汉大学,编号为CCTCC NO:M2013513。

具体实施方式

[0054] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整的描述,显然所描述的实施例仅是本发明的一部分实施例,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付出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0055] 实施例1:发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 的分离、纯化及初步鉴定。

[0056] 该实施例按照下述步骤进行:

[0057] (1) *Lactobacillus fermentum* strain Zhao 的分离、纯化。

[0058] 以无菌操作吸取样品500 μ L加入至5mL灭菌生理盐水混合作成1:10的均匀稀释液,并继续作一定比例的稀释。选择合适梯度的稀释液,用无菌枪头各吸取100 μ L分别涂布到MRS固体平板培养基中,30 $^{\circ}$ C培养48-72h,观察记录菌落形态,如图1所示。用接种环(或灭菌牙签)从平板表面及内部挑取不同菌落接种于MRS液体培养基中,置30 $^{\circ}$ C,300r/min摇床培养24-48h;重复以上步骤连续活化2代后进行涂片革兰氏染色镜检,如图2所示,确定为G⁺菌的继续活化,直至得到纯菌落(镜检无杂菌),并进行过氧化氢酶实验。将G⁺和过氧化氢酶阴性的无芽孢杆菌、球菌及链球菌均暂定为乳酸菌,并保存,具体操作参照《微生物学实验技术》。

[0059] 实验结果显示,从若尔盖县的十个样品中共分离出乳酸菌56株,乳酸菌活菌数平均在10⁸cfu/mL数量级。

[0060] (2) *Lactobacillus fermentum* strain Zhao 的初步鉴定。

[0061] 革兰氏染色:取典型菌落涂片,进行革兰氏染色,在微生物显微镜油镜下观察菌体形态及其排列方式。挑取视野清晰、形态典型的菌株,进行拍照。

[0062] 过氧化氢酶实验:挑取固体培养基上菌落一接种环,置于洁净试管内,滴加3%过氧化氢溶液2mL,观察结果(于半分钟内发生气泡者为阳性,不发生气泡者为阴性)。

[0063] 结果表明,从样品中分离纯化出的菌株均能在含5%CaCO₃的MRS平板培养基上生长,并在菌落周围形成溶钙圈,革兰氏染色阳性,过氧化氢酶试验阴性。

[0064] 实施例2:发酵乳杆菌*Lactobacillus fermentum* strain Zhao 的体外筛选。

[0065] (1) 益生菌耐受pH3.0人工胃液的筛选。

[0066] 人工胃液的配制:NaCl 0.2%、胃蛋白酶0.35%、用1M的HCl调整pH值为3.0后,在无菌操作台中用真空泵抽滤除菌后备用。

[0067] 益生菌对人工胃液耐受性的测定:取5mL已经活化好的菌株培养液,在无菌操作台中倒入已灭菌10mL离心管中,经3000r/min离心10min收集菌体,加入5mL灭菌生理盐水混匀制成菌悬液,取1mL菌悬液与9mL pH3.0的人工胃液混合,摇匀,置于恒温振荡器中培养(37 $^{\circ}$ C,300r/min),并分别在0h和3h取样,用MRS琼脂培养基倾注37 $^{\circ}$ C培养48h。用平板计数法测定活菌数,计算其存活率(%):存活率(%)=3h的活菌数/0h的活菌数 \times 100%。

[0068] (2) 益生菌耐受不同浓度胆盐的测定。

[0069] 选择在pH3.0人工胃液中存活率在10%以上的菌种做不同胆盐浓度下的生长测试。将活化好的菌种5mL按2%的接种量(100 μ L)用移液枪分别接种于含0.0%牛胆盐(即空白)、0.3%牛胆盐、0.5%牛胆盐、1.0%牛胆盐(W/V)的MRS-THIO培养基(MRS培养基中加0.2%的巯基乙酸钠)。在恒温振荡器中37 $^{\circ}$ C培养24h后,以空白培养基为对照(未接种的MRS-THIO培养基),分别测定上述不同浓度培养基的OD值,计算菌株对胆盐的耐受力。胆盐耐受力=含胆盐的培养基的OD值/空白培养基的OD值 \times 100%。

[0070] (3) 菌液浓度调整。

[0071] 选择在pH3.0人工胃液中存活率在10%以上、耐胆盐较强的的菌种,经镜检观察菌体生长形态良好后进行试验,将活化好的细菌培养物5mL,在无菌操作台中倒入已灭菌10mL离心管中,以3000r/min离心10min收集菌体。以5mL PBS(50mM,pH6.5)缓冲液洗涤菌体,3000r/min离心10min,重复洗涤两次。以PBS缓冲液为空白对照,用缓冲液调整受试菌株菌

体浓度,使其在560nm波长下A0值约为1.00。

[0072] 取4mL调整好浊度的菌液于已灭菌10mL离心管中,加入0.8mL二甲苯,对照组不加二甲苯,振荡30s,停顿10s,后再振荡30s,于试管架上静置5~10min分层,取下层水相,以PBS缓冲液为空白对照,在560nm下测量A值并进行记录。疏水率 $H\% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$ 其中A0和A分别是与二甲苯混匀前、后菌液在560nm下测量得到的A值。

[0073] 乳酸菌是正常肠道菌的一部分,作为益生菌的首要条件之一,是能在胃和小肠前段存活,被筛选的菌株应具有足够的耐酸性和酸性环境下生长发育的特性。

[0074] *Lactobacillus fermentum strain Zhao*的筛选结果如下表1所示:

[0075]

| 菌株编号 | pH3.0人工胃液存活率(%) | 疏水率(%) | 不同胆盐浓度下的生长率(%) | | |
|--|-----------------|------------|----------------|------------|------------|
| | | | 0.3% | 0.5% | 1.00% |
| <i>Lactobacillus fermentum strain Zhao</i> | | | | | |
| <i>s fermentum strain Zhao</i> | 85.12±5.18 | 70.80±0.61 | 25.64±1.80 | 21.73±1.95 | 18.33±0.52 |

[0076] 表1

[0077] 筛选结果表明,*Lactobacillus fermentum strain Zhao*菌株能耐受pH3.0的环境,且存活率在80%以上。

[0078] 通过胃后存活的菌体将与小肠中的胆盐接触,本实验把乳酸菌对胆盐的抵抗能力用于作为潜在益生菌的一个选择标准。耐酸性较好的*Lactobacillus fermentum strain Zhao*菌耐受不同浓度胆盐的结果是对0.3%的胆盐有一定的耐受力,当胆盐浓度升高至0.5%及1.0%时,*Lactobacillus fermentum strain Zhao*菌体现出了很好的胆盐耐受力。

[0079] 除对小肠中胆盐有一定抵抗能力的同时,乳酸菌还需在小肠粘膜上有很好的粘附性,因此将乳酸菌的疏水能力作为另一选择标准,从表1中可以看出,*Lactobacillus fermentum strain Zhao*菌的疏水性达到了70.80±0.61%。

[0080] 通过以上实验我们筛选出了耐酸性、耐胆盐及疏水性较好的*Lactobacillus fermentum strain Zhao*菌,该菌株已于2013年10月30日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号CCTCC NO:M2013513。

[0081] 实施例3:活性炭诱导便秘实验。

[0082] 饲喂健康昆明小鼠,6周龄,体重23±2g,雌性,50只。喂食基础饲料适应5d后,将小鼠根据体重随机分成5组,分别为:正常组、便秘对照组、比沙可啶组、保加利亚乳杆菌组和高、低灌胃剂量的*Lactobacillus fermentum strain Zhao*组,每组10只。饲养在不锈钢笼中,室温保持24±2℃,相对湿度50±10%,12h明暗轮换(8:00~20:00照明)。在整个实验周期,正常组和便秘对照组均喂食基础饲料,实验组小鼠分别每天按 1.0×10^9 CFU/kg灌胃益生菌。2周后开始每天早上9:00给除正常组外其他5组小鼠灌胃浓度为10%的2℃活性炭冰水,0.2mL/只,每天灌胃一次,连续灌胃3天。直至实验最后一天,所有小鼠禁食24h,然后再灌胃活性炭冰水,0.2mL/只。每组中5只小鼠用于测定体重变化、摄食量、饮水量、初次排出黑便所需时间、排粪便数量和粪便水分含量。小鼠另外5只小鼠在灌胃活性炭30min后处

死解剖。

[0083] 实验期内各小组小鼠体重变化、初次排出黑便所需时间参考如图3和图4所示。

[0084] 正常组 (Normal) 小鼠体重随实验时间增加体重增加, 对照组 (Control) 在6天后由于灌胃活性炭出现便秘体重减轻, 比沙可啶 (bisacodyl) 便秘药物组减缓了体重减轻, Lactobacillus fermentum strain Zhao组也减缓了体重减轻, 高浓度组体重减轻更少。

[0085] 与正常组相比, 便秘对照组小鼠首次排黑便时间有极显著差异 ($P < 0.05$)。高、低灌胃剂量的Lactobacillus fermentum strain Zhao组小鼠第一次排黑便的平均时间均低于便秘对照组, 高于正常组和便秘治疗药物比沙可啶组, 表现出一定的便秘预防效果。

[0086] 实验期内各小组小鼠饮食摄入量的变化如下表2:

[0087]

| 处理组 时间/天 | 正常组 | 对照组 | 比沙可啶 | 保加利亚乳 杆菌 | LF-Zhao ($\times 10^9$ CFU/kg b.w.) | |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------|
| | | | | | 0.5 | 1.0 |
| 1 | 2.69 \pm 0.12 | 2.66 \pm 0.17 | 2.72 \pm 0.14 | 2.74 \pm 0.12 | 2.71 \pm 0.15 | 2.70 \pm 0.15 |
| 2 | 2.73 \pm 0.13 | 2.71 \pm 0.21 | 2.77 \pm 0.12 | 2.75 \pm 0.16 | 2.72 \pm 0.16 | 2.75 \pm 0.16 |
| 3 | 2.90 \pm 0.11 | 2.84 \pm 0.20 | 2.86 \pm 0.20 | 2.79 \pm 0.14 | 2.80 \pm 0.12 | 2.82 \pm 0.15 |
| 4 | 3.04 \pm 0.15 | 3.01 \pm 0.16 | 3.02 \pm 0.15 | 3.00 \pm 0.12 | 2.96 \pm 0.17 | 3.07 \pm 0.12 |
| 5 | 3.08 \pm 0.18 | 3.06 \pm 0.15 | 3.07 \pm 0.10 | 3.12 \pm 0.11 | 3.09 \pm 0.13 | 3.11 \pm 0.18 |
| 6 | 3.10 \pm 0.16 | 3.09 \pm 0.14 | 3.12 \pm 0.11 | 3.15 \pm 0.16 | 3.11 \pm 0.12 | 3.15 \pm 0.14 |
| 7 | 3.14 \pm 0.10 | 2.60 \pm 0.22 | 2.88 \pm 0.22 | 2.63 \pm 0.12 | 2.69 \pm 0.15 | 2.75 \pm 0.16 |
| 8 | 3.15 \pm 0.13 | 2.19 \pm 0.15 | 2.78 \pm 0.17 | 2.40 \pm 0.15 | 2.48 \pm 0.15 | 2.58 \pm 0.13 |
| 9 | 3.22 \pm 0.13 | 2.02 \pm 0.09 | 2.70 \pm 0.14 | 2.22 \pm 0.13 | 2.32 \pm 0.10 | 2.40 \pm 0.14 |

[0088] 表2

[0089] 每组小鼠n=10ICR, 比沙可啶:100mg/kg b.w., 保加利亚乳杆菌: 1.0×10^9 CFU/kg b.w., LF-Zhao:Lactobacillus fermentum strain Zhao.

[0090] 正常组 (Normal) 小鼠体重随实验时间摄食量略微增加, 对照组在6天后由于灌胃活性炭出现便秘摄食量减少, 比沙可啶便秘药物组摄食量高于对照组低于正常组, Lactobacillus fermentum strain Zhao组也出现和比沙可啶相似的情况, 高浓度组摄食量减少得更少。

[0091] 实验期内各小组小鼠饮水量的变化如下表3:

[0092]

| 处理组 时间/天 | 正常组 | 对照组 | 比沙可啶 | 保加利亚乳 杆菌 | LF-Zhao ($\times 10^9$ CFU/kg b. w.) | |
|-------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------|-----------------|
| | | | | | 0.5 | 1.0 |
| 1 | 6.24 \pm 0.20 | 6.25 \pm 0.20 | 6.24 \pm 0.20 | 6.24 \pm 0.12 | 6.24 \pm 0.17 | 6.26 \pm 0.12 |
| 2 | 6.26 \pm 0.21 | 6.28 \pm 0.15 | 6.30 \pm 0.20 | 6.22 \pm 0.16 | 6.26 \pm 0.15 | 6.27 \pm 0.13 |
| 3 | 6.27 \pm 0.12 | 6.24 \pm 0.16 | 6.30 \pm 0.16 | 6.26 \pm 0.12 | 6.28 \pm 0.16 | 6.28 \pm 0.14 |
| 4 | 6.25 \pm 0.020 | 6.25 \pm 0.20 | 6.29 \pm 0.15 | 6.28 \pm 0.16 | 6.31 \pm 0.12 | 6.32 \pm 0.10 |
| 5 | 6.32 \pm 0.20 | 6.31 \pm 0.15 | 6.32 \pm 0.20 | 6.30 \pm 0.13 | 6.35 \pm 0.18 | 6.31 \pm 0.11 |
| 6 | 6.34 \pm 0.20 | 6.28 \pm 0.21 | 6.34 \pm 0.18 | 6.32 \pm 0.10 | 6.33 \pm 0.12 | 6.34 \pm 0.12 |
| 7 | 6.37 \pm 0.21 | 6.14 \pm 0.17 | 6.28 \pm 0.15 | 6.17 \pm 0.13 | 6.20 \pm 0.16 | 6.25 \pm 0.12 |
| 8 | 6.38 \pm 0.18 | 5.75 \pm 0.18 | 6.25 \pm 0.15 | 5.93 \pm 0.14 | 5.99 \pm 0.12 | 6.11 \pm 0.12 |
| 9 | 6.40 \pm 0.22 | 5.63 \pm 0.20 | 6.21 \pm 0.17 | 5.75 \pm 0.12 | 5.90 \pm 0.13 | 6.00 \pm 0.15 |

[0093] 表3

[0094] 每组小鼠n=10ICR,比沙可啶:100mg/kgb.w.,保加利亚乳杆菌: 1.0×10^9 CFU/kg b.w.,LF-Zhao:Lactobacillus fermentum strain Zhao.

[0095] 正常组小鼠体重随实验时间饮水量略微增加,对照组在6天后由于灌胃活性炭出现便秘饮水量减少,比沙可啶便秘药物组饮水量高于对照组低于正常组,Lactobacillus fermentum strain Zhao组也出现和比沙可啶相似的情况,高浓度组饮水量减少得更少。

[0096] 试验期内各小组小鼠的排便量、排便颗粒数和粪便水分含量的变化如下表4:

[0097]

| 处理组 目录 | 正常组 | 对照组 | 比沙可啶 | 保加利亚乳 杆菌 | LF-Zhao ($\times 10^9$ CFU/kg b. w.) | |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------|-----------------|
| | | | | | 0.5 | 1.0 |
| 1-6 天 | | | | | | |
| 排便重量(g) | 0.90 \pm 0.09 | 0.94 \pm 0.11 | 1.13 \pm 0.07 | 0.91 \pm 0.05 | 0.90 \pm 0.06 | 0.92 \pm 0.03 |
| 排便颗粒数 | 35 \pm 4 | 36 \pm 7 | 49 \pm 6 | 36 \pm 2 | 34 \pm 3 | 35 \pm 2 |
| 粪便水分含量 (%) | 47 \pm 4 | 47 \pm 5 | 55 \pm 5 | 49 \pm 4 | 47 \pm 3 | 48 \pm 6 |
| 7-9 天 (便秘诱导后) | | | | | | |
| 排便重量(g) | 0.91 \pm 0.05 | 0.37 \pm 0.06 | 0.74 \pm 0.15 | 0.40 \pm 0.05 | 0.52 \pm 0.04 | 0.57 \pm 0.04 |
| 排便颗粒数 | 36 \pm 3 | 19 \pm 6 | 38 \pm 5 | 21 \pm 3 | 24 \pm 4 | 29 \pm 4 |
| 粪便水分含量 (%) | 46 \pm 5 | 16 \pm 3 | 40 \pm 3 | 23 \pm 2 | 25 \pm 3 | 32 \pm 3 |

[0098] 表4

[0099] 每组小鼠 $n=10$ ICR,比沙可啶:100mg/kg b.w.,保加利亚乳杆菌: 1.0×10^9 CFU/kg b.w.,LF-Zhao:Lactobacillus fermentum strain Zhao.

[0100] 前6天各组的排便量,排便颗粒数和粪便水分含量差别不大。6天后便秘诱导后,正常组片变量无明显变化,对照组排便量,排便颗粒数和粪便水分含量较正常组明显下降,比沙可啶和各益生菌组的排便量,排便颗粒数和粪便水分高于对照组,Lactobacillus fermentum strain Zhao高浓度的排便颗粒数和粪便水分含量接近药物组和正常组。

[0101] 实施例4:小肠活性炭推进实验。

[0102] 将小鼠脱颈椎处死,剖开腹腔并分离小鼠的肠系膜,剪取上自幽门、下至回盲部的整根肠管,放于吸水纸上,将整条小肠拉成直线,以测量肠管长度,即为“小肠总长度”,从幽门至活性炭汁前沿为“活性炭推进长度”。通过测量小肠中活性炭的推进长度,按下式计算推进率。推进率(%) = (活性炭推进距离) / (小肠总长度) \times 100。

[0103] 试验期内各小组小鼠的小肠总长度、小肠推进率如图5和图6所示。

[0104] 与正常组相比,便秘对照组小鼠小肠推进率有极显著差异($P < 0.05$),高、低灌胃剂量的Lactobacillus fermentum strain Zhao组小鼠小肠推进率高于便秘对照组,低于正常组和便秘治疗药物比沙可啶组,表现出一定的便秘预防效果。

[0105] 实施例5:小鼠血清中各因子水平的测定。

[0106] 取0.2mL小鼠动脉血,在4℃,3000r/min离心10min,取上层血清。按照胃动素(MTL)、胃泌素(Gas)、内皮素(ET)、生长抑素(SS)、血清乙酰胆碱酯酶(AchE)、P物质(SP)和血管活性肠肽(VIP)测试剂盒说明书的方法测定血清中上述因子水平。

[0107] 实验期内各小组小鼠血清中各因子水平如图7所示。

[0108] 相对于便秘对照组,Lactobacillus fermentum strain Zhao高低组均能不同程度的增加血清的MTL、Gas、ET、AchE、SP和VIP因子水平,降低SS因子水平。所以Lactobacillus fermentum strain Zhao对便秘有预防作用。

[0109] 应用实施例1:利用发酵乳杆菌(Lactobacillus fermentum strain Zhao)制造乳酸菌奶饮料。

[0110] 首先,所述发酵乳杆菌(Lactobacillus fermentum strain Zhao)原始菌种在温度-75℃下以30重量%甘油悬液形式保存,或者在温度4℃下以冷冻干燥菌粉的形式保存备用。

[0111] 然后,可以采用两种方法制备本发明的发酵乳杆菌(Lactobacillus fermentum strain Zhao)工作发酵剂:

[0112] 第一种方法是将上述发酵乳杆菌(Lactobacillus fermentum strain Zhao)原始菌种接种于12重量%在110℃灭菌10min的脱脂乳中,在37℃条件下培养14-16h至凝乳,连续培养活化两代,用作母发酵剂;将所述母发酵剂按3-5%(体积)接种于灭菌乳中,培养14-16h至凝乳,此时该凝乳中的活菌数约 10^9 cfu/mL,得到所述的工作发酵剂,可以直接将这种工作发酵剂添加到食品中,或者与可共生的制备发酵乳的商业发酵剂如保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌一起使用制备发酵乳。

[0113] 第二种方法是将上述发酵乳杆菌(Lactobacillus fermentum strain Zhao)原始菌种接种于MRS液体培养基中,在37℃条件下培养12-16h进行活化,连续活化两代,然后将活化培养物按2-4%(体积)接种于MRS培养基中,培养16-18h,在4℃条件下4000r/min离心

15min,去除上清液,得到细胞沉淀,将沉淀用一定量的无菌脱脂乳制成悬浮液,得到工作发酵剂备用。

[0114] 然后,原料乳在95℃下加热杀菌20min或在140℃下高温热杀菌2s,然后冷却到4℃,再加入前面所述的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 工作发酵剂,使其浓度达到 10^6 cfu/ml以上,在4℃冷藏保存即得到含发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 活菌的乳酸菌奶饮料。

[0115] 在本发明中,所述的MRS液体培养基是本技术领域的技术人员熟知的,是索莱宝公司销售的用于乳杆菌培养的培养基。

[0116] 所述的加热杀菌是例如使用上海沃迪自动化装备股份有限公司销售的TW10D1000型管式杀菌机进行的。

[0117] 所述的高温热杀菌是例如使用北京勇创嘉业机械设备有限公司销售的YC-104型板式超高温杀菌机进行的。

[0118] 应用实施例2:利用发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 制造乳粉。

[0119] 按照上述乳酸菌奶饮料的制备方法制备,只是原料乳在95℃下加热杀菌20min或在140℃下高温热杀菌2s,然后冷却到37℃,再以原料乳体积的4%接菌量接种前面所述的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 工作发酵剂,再在37℃下发酵16h,得到发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 发酵乳;然后所述的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 发酵乳按照1:3 (V:V) 加到上述灭菌原料乳中,进行均质,真空浓缩、喷雾干燥得到含发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 的乳粉。

[0120] 所述的均质是例如使用常州市均质机械有限公司销售的GJB500-40小型均质机进行的。

[0121] 所述的浓缩是例如使用上海伟宙轻工机械有限公司销售的真空浓缩锅进行的。

[0122] 所述的喷雾干燥是例如使用上海沃迪科技有限公司销售的实验型喷雾干燥机进行的。

[0123] 应用实施例3:利用发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 制造胶囊制品。

[0124] 将原料乳在140℃高温热杀菌2s,然后冷却至37℃,以原料乳体积的4%接菌量接种本发明的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 工作发酵剂,在37℃下发酵16h,得到发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 发酵乳。将发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 发酵乳以1:3 (V:V) 加入灭菌后的原料乳中均质,经真空浓缩、喷雾干燥处理后得到乳粉,将得到的乳粉装到胶囊中制成胶囊制品。

[0125] 应用实施例4:利用发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 制备发酵乳。

[0126] 按照上述乳酸菌奶饮料的制备方法制备,只是原料乳在95℃下加热杀菌20min或在140℃下高温热杀菌2s,然后冷却到37℃,再按照3-5% (体积) 加入前面所述的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum strain Zhao*) 工作发酵剂,再加入3-5% (体积) 可共生的制备发酵乳商品发酵剂,混匀后在37℃下混菌发酵至滴定酸度以乳酸计0.6-0.7%,然后冷却

至4℃,再进行冷藏保存得到所述的发酵乳。

[0127] 所述的食品发酵剂优选的是保加利亚乳杆菌或嗜热链球菌。

[0128] 在本发明的意义上,所述的原料乳是一种或多种选自脱脂奶、鲜奶、复原奶的原料乳。

[0129] 以上所述,仅为本发明的具体实施例,但本发明的特征并不局限于此,任何熟悉该项技术的人在本发明领域内,可轻易想到的变化或修饰,都应涵盖在以下本发明的申请专利范围中。

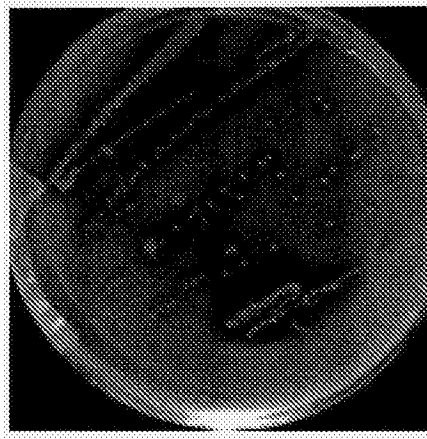


图1

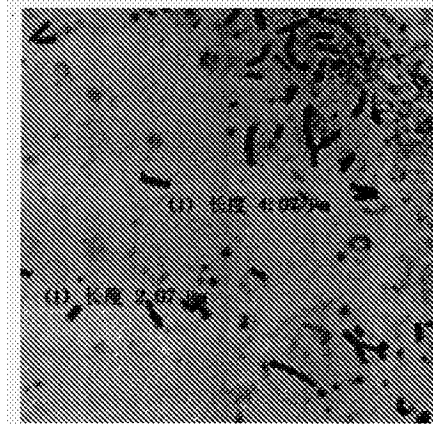


图2

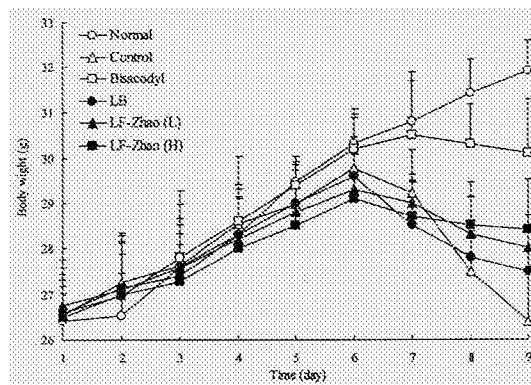


图3

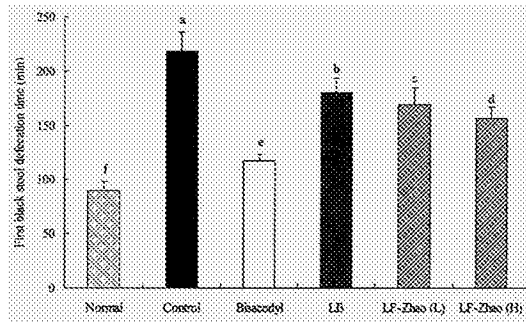


图4

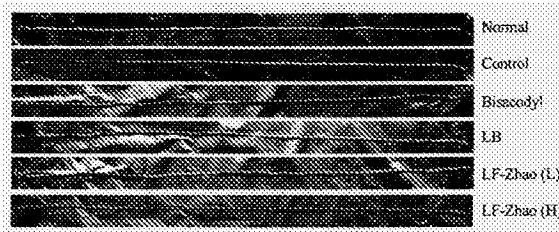


图5

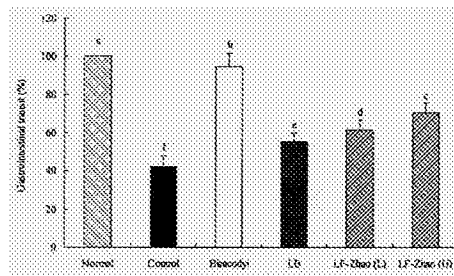
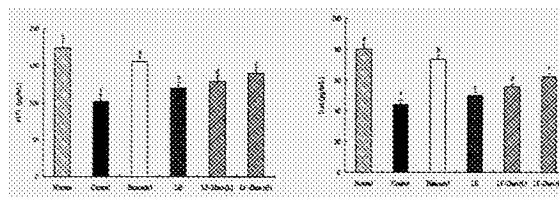


图6



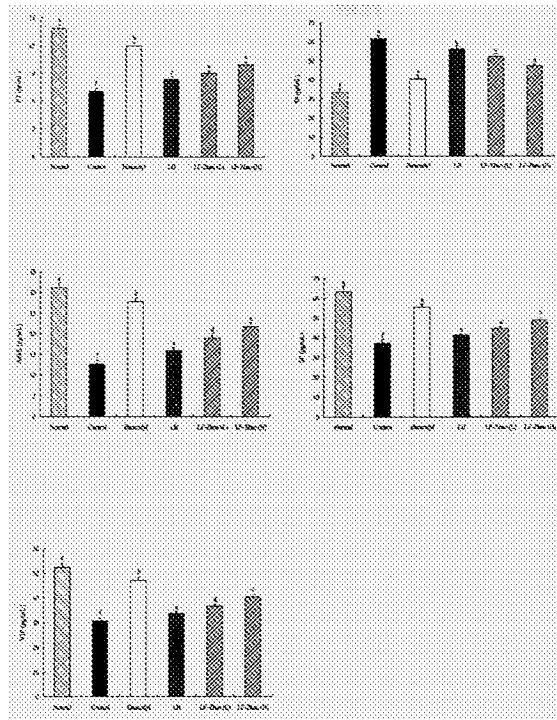


图7