



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116508993 B

(45) 授权公告日 2023.12.15

(21) 申请号 202310285863.7

(22) 申请日 2023.03.21

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116508993 A

(43) 申请公布日 2023.08.01

(83) 生物保藏信息
CGMCC NO.1.12733 2020.07.20
CGMCC NO.20123 2020.06.22

(73) 专利权人 微康益生菌(苏州)股份有限公司
地址 215200 江苏省苏州市吴江经济技术
开发区龙桥路1033号

(72) 发明人 方曙光 董瑶 陈婷 盖忠辉

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

专利代理师 赵颖

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 33/135 (2016.01)

C12N 1/04 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 114806980 A, 2022.07.29

CN 114766677 A, 2022.07.22

CN 113209141 A, 2021.08.06

CN 114634901 A, 2022.06.17

CN 109303115 A, 2019.02.05

CN 113337435 A, 2021.09.03

CN 112322527 A, 2021.02.05

审查员 李碧云

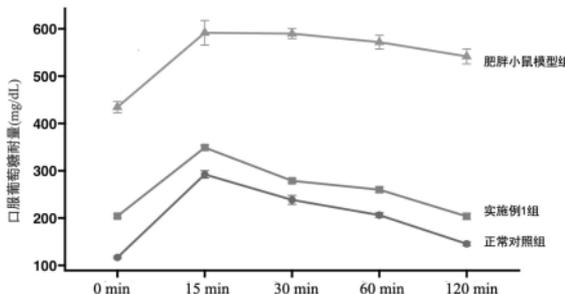
权利要求书1页 说明书11页 附图5页

(54) 发明名称

罗伊氏乳杆菌在制备具有代谢调节作用的
益生菌剂中的应用

(57) 摘要

本发明提供罗伊氏乳杆菌在制备具有代谢调节作用的益生菌剂中的应用,所述罗伊氏乳杆菌为罗伊氏乳杆菌Lactobacillus reuteri LR08菌株,保藏编号为CGMCC No.1.12733,保藏日期为2020年07月20日。本发明创造性地发现罗伊氏乳杆菌Lactobacillus reuteri LR08菌株有益于调整肥胖小鼠的血脂水平,纠正其代谢紊乱。



1. 一种益生菌剂在制备具有减肥、血糖调节和血脂调节功效的产品中的应用,其特征 在于,所述益生菌剂中的菌株由活菌数比为(0.5-5):1的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株和约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株组成;所述罗伊氏乳 杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株的保藏编号为CGMCC No.1.12733,保藏日期为2020 年07月20日;所述约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株的保藏编号为CGMCC No.20123,保藏日期为2020年06月22日;所述罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08 菌株的活菌数不低于3000亿CFU/g;所述约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株 的活菌数不低于3000亿CFU/g。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征 在于,所述益生菌剂还包括冻干保护剂。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征 在于,所述冻干保护剂包括水苏糖、脱脂奶粉、甘露 醇、蔗糖或乳糖中的任意一种或至少两种的组合。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征 在于,所述冻干保护剂包括水苏糖和/或脱脂奶粉。

5. 如权利要求2所述的应用,其特征 在于,所述益生菌剂中罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* LR08菌体与冻干保护剂的质量比为1:(0.5-3)。

6. 如权利要求1所述的应用,其特征 在于,所述益生菌剂的剂型包括液体菌剂、粉状菌 剂、片状菌剂或颗粒状菌剂。

罗伊氏乳杆菌在制备具有代谢调节作用的益生菌剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,涉及罗伊氏乳杆菌在制备具有代谢调节作用的益生菌剂中的应用、一种具有代谢调节作用的罗伊氏乳杆菌的培养物和一种具有代谢调节作用的益生菌剂。

背景技术

[0002] 肥胖是一种慢性代谢性疾病。众所周知,肥胖是许多非传染性疾病,尤其是2型糖尿病的主要危险因素。目前的治疗方法主要包括强化生活方式改变、饮食干预和药物治疗等,但已被证明无法成功控制代谢紊乱的全球增长,甚至还会出现耐药性或反弹等问题。因此,需要一种新的方法来对抗代谢紊乱。

[0003] 近几年,许多研究人员证明了人类肠道微生物群在新陈代谢和代谢疾病中的作用,例如调节肠道激素的作用:肠道微生物调节胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的含量。GLP-1 是一种在食物营养素刺激下,由肠道内分泌细胞合成和分泌的肠促胰素,具有多种生物学的作用。最主要的是作用于胰腺中胰岛 β 细胞和胰岛 α 细胞,以葡萄糖依赖的方式促进胰岛素分泌以及降低餐后胰高糖素的分泌,减少肝糖原的分解,降低餐后血糖。此外还可以延缓胃排空、抑制食欲等,通过作用于多个途径,参与体内血糖的稳态调节。然而,基于现有的研究基础(通常是利用大量的动物试验进行相关功能验证),从现有众多种类的可食用益生菌中筛选一种能够靶向作用GLP-1,从而改善代谢疾病的益生菌,需要耗费大量的人力物力、资金和动物资源。

[0004] CN102438638A公开一种肥胖及肥胖所引起的代谢性疾病的预防和治疗,特别是,通过肠内菌群变化来预防和治疗肥胖。该发明中确认,通过游离脂肪酸吸收能力改善的微生物制剂的摄取,并且利用小肠内细菌的特性改善和移植,能够减少在胃肠道内的脂肪酸吸收。该发明中基于这样的实验结果,提供了肥胖及肥胖所引起的代谢性疾病的预防和治疗方案、预防和治疗用药物组合物和功能性食品、以及能够以这样的目的使用的改良乳酸菌株。该发明具有与目前最广泛用作抗肥胖治疗剂的奥利司他相同水平的体重减少效果。该发明表示,通过小肠内细菌的特性改善和移植,阻断在胃肠道内的脂肪酸吸收,从而能够治疗肥胖。

[0005] CN104968780A公开用于在需要其的哺乳动物中治疗肥胖、糖尿病和相关的病症以及用于改善或减轻所述症状和征象的方法和组合物,所述方法包括给予有效量的一种可药用组合物,持续足以改善、减轻或治疗肥胖、糖尿病或心血管疾病中的至少一种征象或症状的时间,所述可药用组合物包含具有不同但互补的碳水化合物代谢途径的益生菌微生物的混合物。该发明提供了具有所需性质的组合物和它们用于药物和营养制剂中的方法。

[0006] 综上所述,现有技术存在代谢疾病相关的功能性益生菌的筛选方法操作复杂,效率低,研究者需要大量的动物体内实验去试错后才可筛选得到目标的功能菌。因此,利用一种简单高效的代谢疾病相关益生菌的筛选方法,提高目标功能益生菌筛选的成功率,获得更多具有调节机体代谢,缓解肥胖状态的益生菌具有非常重要的意义。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供罗伊氏乳杆菌在制备具有代谢调节作用的益生菌剂中的应用、一种具有代谢调节作用的罗伊氏乳杆菌的培养物和一种具有代谢调节作用的益生菌剂。

[0008] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 第一方面,本发明提供一种罗伊氏乳杆菌在制备具有代谢调节作用的益生菌剂中的应用,所述罗伊氏乳杆菌为罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株,保藏编号为CGMCC No.1.12733,保藏日期为2020年07月20日,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0010] 本发明通过耐胃酸胁迫实验、耐胆盐胁迫实验和细胞胰高血糖素样肽-1的刺激分泌实验筛选出具有显著代谢调节作用的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株。该菌株具有降低胆固醇、降低血糖含量、缓解肠道炎症,进而减缓肥胖小鼠体重增长的效果。具体而言,该菌株可以降低肥胖小鼠总胆固醇含量、三酰甘油含量、低密度脂蛋白含量、口服葡萄糖耐量,并提升高密度脂蛋白含量、血清胰岛素含量和胰高血糖素样肽-1含量。因此,本发明创造性地发现罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株有益于调整肥胖小鼠的血脂水平,纠正其代谢紊乱。

[0011] 本发明所涉及地罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株的筛选步骤如下:

[0012] (1) 对益生菌菌株进行耐胃酸胁迫筛选、耐胆盐胁迫筛选和刺激细胞分泌胰高血糖素样肽-1实验。

[0013] (2) 菌株胁迫筛选存活率不低于50%且刺激细胞产生胰高血糖素样肽-1的产量不低于1ng/mL的菌株为具有代谢调节作用的菌株,其中一株为罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株。

[0014] 第二方面,本发明提供一种具有代谢调节作用的罗伊氏乳杆菌的培养物,所述培养物采用如下制备方法进行制备,所述制备方法包括:

[0015] 将第一方面中所述的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株接种于培养基中,在30-39℃(例如30℃、32℃、34℃、36℃、37℃、39℃等)下培养3-48h(例如3h、10h、15h、20h、25h、30h、35h、40h、45h、48h等)即得。

[0016] 上述数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0017] 本发明优选上述培养条件,罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株在上述培养条件下能够达到生长稳定期,并且具有更优异的血脂代谢调节作用。

[0018] 第三方面,本发明提供一种具有代谢调节作用的益生菌剂,所述具有代谢调节作用的益生菌剂中的菌株包括如第一方面所述的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株。

[0019] 本发明所涉及的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株可以被单独地应用于相关益生菌产品中,也可以与其他化合物或菌株联合应用于益生菌产品中。

[0020] 优选地,所述具有代谢调节作用的益生菌剂中,所述罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株的活菌数不低于3000亿CFU/g。

[0021] 所述不低于3000亿CFU/g的具体数值可以选择3000亿CFU/g、3200亿CFU/g、3400亿

CFU/g、3600亿CFU/g、3800亿CFU/g或4000亿CFU/g等。

[0022] 上述数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0023] 优选地,所述具有代谢调节作用的益生菌剂还包括冻干保护剂。

[0024] 优选地,所述冻干保护剂包括水苏糖、脱脂奶粉、甘露醇、蔗糖或乳糖中的任意一种或至少两种的组合;所述至少两种的组合包括水苏糖和脱脂奶粉的组合、脱脂奶粉和甘露醇的组合或甘露醇和蔗糖的组合等,其他任意的组合方式均可选择,在此便不再一一赘述。更优选地,所述冻干保护剂包括水苏糖和/或脱脂奶粉。

[0025] 优选地,所述具有代谢调节作用的益生菌剂中罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌体与冻干保护剂的质量比为1:(0.5-3)。

[0026] 所述(0.5-3)中的具体数值可以选择0.5、1、1.5、2、2.5或3等。上述数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0027] 优选地,所述具有代谢调节作用的益生菌剂的剂型包括液体菌剂、粉状菌剂、片状菌剂或颗粒状菌剂。

[0028] 本发明所涉及的具有代谢调节作用的益生菌剂的剂型可以根据实际需要灵活选择,如液体菌剂、粉状菌剂、片状菌剂或颗粒状菌剂等。

[0029] 优选地,所述具有代谢调节作用的益生菌剂中的菌株还包括约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株,所述约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株的保藏编号为CGMCC No.20123,保藏日期为2020年06月22日,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0030] 本发明还创造性地发现上述罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株能够与约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株进行复配用于代谢调节,具有比单一菌剂或者其他复配方式更显著优异的效果,说明罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株和约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株在降低肥胖小鼠血脂、血糖和体重增长速度等方面具有协同增效作用。

[0031] 优选地,所述罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株与约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株的活菌数比为(0.5-5):1。

[0032] 本发明所涉及的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株与约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株的活菌数比特定选择(0.5-5):1时,所述益生菌剂具有更强的血糖血脂代谢改善作用。

[0033] 所述(0.5-5)中的具体数值可以选择0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5等。上述数值范围内的其他具体点值均可选择,在此便不再一一赘述。

[0034] 第四方面,本发明提供一种改善代谢综合症的菌株筛选方法,所述筛选方法包括如下步骤:

[0035] (1)对益生菌菌株进行耐胃酸胁迫筛选、耐胆盐胁迫筛选和刺激细胞分泌胰高血糖素样肽-1实验。

[0036] (2)菌株胁迫筛选存活率不低于50%且刺激细胞产生胰高血糖素样肽-1的产量不低于1ng/mL的菌株为所述改善代谢综合症的菌株。

[0037] 本发明所涉及的改善代谢综合症的菌株筛选方法筛选制得的菌株,如罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株、约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株等

菌株具有降低胆固醇、降低口服葡萄糖耐量、缓解消化系统炎症、调节代谢综合征的功效。此外,该筛选方法操作简单,易于工业放大。

[0038] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0039] 1、本发明通过耐胃酸胁迫实验、耐胆盐胁迫实验和细胞胰高血糖素样肽-1的刺激分泌实验筛选出具有显著代谢调节作用的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株。该菌株具有降低胆固醇、降低血糖含量、缓解肠道炎症,进而减缓肥胖小鼠体重增长的效果。具体而言,该菌株可以降低肥胖小鼠总胆固醇含量、三酰甘油含量、低密度脂蛋白含量、口服葡萄糖耐量,并提升高密度脂蛋白含量、血清胰岛素含量和胰高血糖素样肽-1含量。因此,本发明创造性地发现罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株有益于调整肥胖小鼠的血脂水平,纠正其代谢紊乱。

[0040] 2、本发明优选30-39℃下培养3-48h的培养条件,罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株在上述培养条件下能够达到生长稳定期,并且具有更优异的血脂代谢调节作用。

[0041] 3、本发明所涉及的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株可以被单独地应用于相关益生菌产品中,也可以与其他化合物或菌株联合应用于益生菌产品中。

[0042] 4、本发明所涉及的改善代谢综合征的菌株筛选方法筛选制得的菌株,如罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株、约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株等菌株具有降低胆固醇、降低口服葡萄糖耐量、缓解消化系统炎症、调节代谢综合征的功效。此外,该筛选方法操作简单,易于工业放大。

附图说明

[0043] 图1为测试例2中正常对照组、肥胖小鼠模型组、实施例1-6组和对比例1-2组的小鼠血清总胆固醇结果图。

[0044] 图2为测试例2中正常对照组、肥胖小鼠模型组、实施例1-6组和对比例1-2组的小鼠血清三酰甘油结果图。

[0045] 图3为测试例2中正常对照组、肥胖小鼠模型组、实施例1-6组和对比例1-2组的小鼠血清高密度脂蛋白结果图。

[0046] 图4为测试例2中正常对照组、肥胖小鼠模型组、实施例1-6组和对比例1-2组的小鼠血清低密度脂蛋白结果图。

[0047] 图5为测试例3中正常对照组、肥胖小鼠模型组和实施例1组小鼠口服葡萄糖耐量随时间变化的结果图。

[0048] 图6为测试例4中正常对照组、肥胖小鼠模型组和实施例1组小鼠胰腺细胞因子IL-2含量图。

[0049] 图7为测试例4中正常对照组、肥胖小鼠模型组和实施例1组小鼠胰腺细胞因子IL-6含量图。

[0050] 图8为测试例4中正常对照组、肥胖小鼠模型组和实施例1组小鼠胰腺细胞因子IL-10含量图。

[0051] 图9为测试例5中正常对照组、肥胖小鼠模型组、实施例1-6组和对比例1-2组的小鼠血清胰岛素含量图。

[0052] 图10为测试例5中正常对照组、肥胖小鼠模型组、实施例1-6组和对比例1-2组的小鼠GLP-1含量图。

具体实施方式

[0053] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0054] 实施本发明的过程、条件、试剂、实验方法等,除以下专门提及的内容之外,均为本领域的普遍知识和公知常识,本发明没有特别限制内容。各实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

[0055] 除非另有说明,本说明书中使用的所有专业术语和科学用语的含义均与本发明所属技术领域的技术人员一般理解的含义相同。但如有冲突,以包含定义的本说明书为准。

[0056] 下述内容中涉及的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株,保藏编号为CGMCC No.1.12733,保藏日期为2020年07月20日,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0057] 下述内容中涉及的约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株,所述约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株的保藏编号为CGMCC No.20123,保藏日期为2020年06月22日,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0058] 下述实验中MRS固体培养基的制备方法为:称取蛋白胨10g、牛肉膏10g、葡萄糖20g、酵母粉5g、柠檬酸氢二铵2g、 $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 2.6g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g、 $MnSO_4$ 0.05g、琼脂20g和半胱氨酸氨酸盐0.5g,使用去离子水溶解,再加入1mL吐温80,加水定容至1L,灭菌冷却后,倒入灭菌后的培养皿中备用;

[0059] MRS液体培养基:称取蛋白胨10g、牛肉膏10g、葡萄糖20g、酵母粉5g、柠檬酸氢二铵2g、 $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 2.6g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g、 $MnSO_4$ 0.05g和半胱氨酸氨酸盐0.5g,使用去离子水溶解,再加入1mL吐温80,加水定容至1L,灭菌冷却后,倒入灭菌后的培养皿中备用。

[0060] DMEM-H完全培养基为购自北纳生物公司型号为BNCC363314的产品;Trypsin为购自探索平台Adamas life品牌编号为C8018的产品;无葡萄糖和无L-谷氨酰胺的DMEM培养基为购自探索平台Gibco品牌型号为Gibco#11966025的产品;高脂高糖饲料为购自北京博泰宏达生物科技有限公司的产品。

[0061] 制备例1

[0062] 本制备例提供具有代谢调节作用的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株的筛选过程,步骤如下:

[0063] 候选益生菌的活化和培养

[0064] 益生菌候选菌株来自微康益生菌(苏州)股份有限公司菌株资源库,本次实验随机选择乳杆菌或双歧杆菌共80株(分别编号为S1-S80),随后进行活化和培养,步骤如下:将冻存于-80℃的甘油管候选益生菌接入液体MRS培养基中,37℃恒温培养24h,菌液离心后用PBS缓冲溶液清洗3次,浓度调节为 1×10^9 CFU/mL。

[0065] 胃酸胁迫筛选实验

[0066] 首先制备人工模拟胃液:胃蛋白酶(购自源叶生物[®],上海源业生物科技有限公司型号为R30201-100 mL的产品)溶于pH 3.0的PBS缓冲液中使其终浓度为2.5g/L,经0.22μm

滤膜过滤后制备成模拟胃液。

[0067] 随后将候选益生菌使用0.85%生理盐水重悬后,在人工模拟胃液(pH 3.0)中将其菌液密度调节为 1×10^8 CFU/mL。混匀后将其放置于37℃孵育3h后,吸取10 μ L菌液滴加至MRS固体培养基上,37℃培养48h后检测活菌数,候选益生菌的存活率用以下公式计算:存活率(%) = $\log N_1 / \log N_0 \times 100\%$; N_1 为经过胃液处理之后的益生菌活菌数, N_0 为胃液未处理前益生菌的活菌数。

[0068] 实验结果表明存活率高于50%的菌株共计39株。随后使用这39株益生菌进行后续的筛选实验。

[0069] 胆盐胁迫筛选实验

[0070] 首先制备含有牛胆盐的筛选培养基:称取10g牛胆盐(沃凯,国药集团化学试剂有限公司)至100mL无菌水中,0.22 μ m滤膜过滤除菌,制得10%牛胆盐溶液,将10%牛胆盐溶液加入MRS液体培养基中,制得0.1%牛胆盐MRS液体培养基。

[0071] 随后将上述39株菌株1mL菌悬液(浓度为 1×10^9 CFU/mL,采用国标《GB4789.35-2016食品安全国家标准食品微生物学检测乳酸菌检测》中的方法测量菌液浓度),与9mL含0.1%牛胆盐MRS液体培养基混合,在37℃下厌氧静置培养,分别在开始(0h)和处理3h后取样,通过倾注培养法测定活菌数并计算其存活率,公式如下:存活率(%) = $\log N_1 / \log N_0 \times 100\%$; N_1 为经过0.1%胆盐处理之后的益生菌活菌数, N_0 为胆盐处理前益生菌的活菌数。

[0072] 实验结果表明存活率高于50%的菌株共计21株。随后使用这21株益生菌进行后续的筛选实验。

[0073] 刺激分泌细胞高产GLP-1的益生菌筛选实验

[0074] 产生GLP-1的基底细胞选择:具有天然肠内分泌细胞特征的小鼠肠内分泌STC-1细胞(BNCC342403,购于北纳生物)。

[0075] 1、小鼠肠内分泌STC-1细胞活化和培养:

[0076] 细胞复苏与传代:

[0077] (1) 细胞冻存管从-80℃冰箱中取出,迅速放入37℃水浴锅,摇晃冻存管加速溶解,以1min内全部溶解为宜;

[0078] (2) 在超净台中将溶解好的细胞液加入到装有9mL完全培养基(DMEM-H完全培养基:90%DMEM-H+10%FBS)的离心管内,1200rpm离心5min,弃去上清液,用1mL完全培养基重悬细胞;

[0079] (3) 将STC-1细胞悬液加入到含有5mL完全培养基的T25瓶中,放入培养箱培养,培养温度为37℃,气体环境为5% CO₂+95%空气,培养至细胞密度达到80%。

[0080] (4) 将旧培养液吸除,PBS清洗两遍后,加入1mL胰酶(0.25% Trypsin+0.02% EDTA);镜下观察消化情况,在细胞边缘缩小,贴壁松动时(可用吸管吸起些许胰酶轻轻吹打细胞层某处,肉眼可见细胞层脱落,即消化完成,否则继续消化),直接吸掉胰酶,加入5mL完全培养基,轻轻吹打细胞层,把细胞层吹落吹散;

[0081] (5) 将细胞悬液按1:2比例分到新的T25瓶中,添加完全培养基,完全重悬细胞,于培养温度37℃,气体环境5% CO₂+95%空气的培养箱中培养;

[0082] (6) 监测培养基pH值变化和细胞密度,定期换液(每周2次),待细胞密度达约85%时,重复传代操作或者冻存,STC-1细胞控制在35代内,即可作为基底细胞。

[0083] 2、刺激分泌细胞高产GLP-1的益生菌筛选

[0084] 对上述耐胆盐的21株益生菌进行刺激细胞产生GLP-1的实验,具体步骤如下:

[0085] (1) 将小鼠肠内分泌STC-1细胞接种在24孔板中,密度为每孔 2×10^5 个细胞。在添加候选菌株之前,将STC-1细胞用PBS缓冲液洗涤两次,并在无葡萄糖和无L-谷氨酰胺的DMEM培养基中保存30min,随后,益生菌用PBS缓冲液洗涤3次,1800g,离心10min,收集沉淀并悬浮于无葡萄糖和无L-谷氨酰胺的DMEM培养基中,调整至 10^7 CFU/mL活菌数,加入24孔板中。孵育2h后,将上清液收集在1.5mL离心管中,并以6000g,4℃离心以去除细胞和菌株碎片,并通过使用商业酶联免疫吸附测定方法(GLP-1活性ELISA试剂盒,武汉纯度生物科技有限公司)测量上清液的GLP-1产量(单位:pM)。使用未经添加益生菌的STC-1细胞上清液作为对照组,对照组细胞培养操作与实验组一致。

[0086] 结果表明,其中S4、S25菌株具有显著的刺激STC-1细胞产GLP-1的作用,相较于对照组GLP-1含量分别高2.45、2.28倍。S4菌株为罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株,2020年07月20日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。S25菌株为约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09菌株,2020年06月22日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0087] 制备例2

[0088] 本制备例提供罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08和约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉,制备方法如下:

[0089] 罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08按照占培养基总质量2%的接种量接种到MRS液体培养基中,于37℃下培养24h,得到培养液;将培养液离心,得到菌体;将菌体用冻干保护剂(含有水苏糖30g/L、脱脂奶粉170g/L的水溶液)重悬,冻干保护剂和菌体的质量比为1.5:1,得到重悬液;将重悬液采用真空冷冻法进行冻干,得到罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉,检测其活菌数为3000亿CFU/g。

[0090] 约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09按照占培养基总质量2%的接种量接种到MRS培养基中,于37℃下培养23h,得到培养液;将培养液离心,得到菌体;将菌体用冻干保护剂(含有水苏糖30g/L、脱脂奶粉170g/L的水溶液)重悬,冻干保护剂和菌体的质量比为1.3:1,得到重悬液;将重悬液采用真空冷冻法进行冻干,得到约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉,检测其活菌数为3000亿CFU/g。

[0091] 实施例1

[0092] 本实施例提供一种具有代谢调节作用的益生菌剂,所述益生菌剂的制备方法包括:

[0093] 混匀5份罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉和1份约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉,制得所述具有代谢调节作用的益生菌剂。

[0094] 实施例2

[0095] 本实施例提供一种具有代谢调节作用的益生菌剂,所述益生菌剂的制备方法包括:

[0096] 混匀0.5份罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉和1份约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉,制得所述具有代谢调节作用的益生菌剂。

[0097] 实施例3

[0098] 本实施例提供一种具有代谢调节作用的益生菌剂,所述益生菌剂的制备方法包括:

[0099] 混匀3份罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉和1份约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉,制得所述具有代谢调节作用的益生菌剂。

[0100] 实施例4

[0101] 本实施例提供一种具有代谢调节作用的益生菌剂,所述益生菌剂的制备方法与实施例1的区别仅在于益生菌剂中不含约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉,仅含6份罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉,其余均与实施例1相同。

[0102] 实施例5

[0103] 本实施例提供一种具有代谢调节作用的益生菌剂,所述益生菌剂的制备方法与实施例1的区别仅在于将益生菌剂中5份罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉和1份约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉替换为1.7份罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉和4.3份约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉(活菌数比约为0.4:1),其余均与实施例1相同。

[0104] 实施例6

[0105] 本实施例提供一种具有代谢调节作用的益生菌剂,所述益生菌剂的制备方法与实施例1的区别仅在于将益生菌剂中5份罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉和1份约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉替换为5.15份罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉和0.85份约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉(活菌数比约为6:1),其余均与实施例1相同。

[0106] 对比例1

[0107] 本对比例提供一种具有代谢调节作用的益生菌剂,所述益生菌剂的制备方法与实施例1的区别仅在于益生菌剂中不含罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉,仅含6份约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉,其余均与实施例1相同。

[0108] 对比例2

[0109] 本对比例提供一种具有代谢调节作用的益生菌剂,所述益生菌剂的制备方法与实施例1的区别仅在于将益生菌剂中的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉等活菌数的替换为市售的罗伊氏乳杆菌(ATCC23272)制备的冻干粉,市售的罗伊氏乳杆菌的冻干粉制备方法与制备例2中罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉方法一致,其余操作均与实施例1一致。

[0110] 测试例1

[0111] 本测试例对实施例或对比例制得菌剂的小鼠肥胖改善作用进行评价,具体评价方法如下:

[0112] 实验动物:C57BL/6J小鼠(购自上海斯莱克实验动物有限公司型号为C57BL/6J),体重约15g。

[0113] 实验分组:小鼠每组8只,共分为10组,包括正常对照组、肥胖小鼠模型组和实验组。

[0114] 正常对照组:普通饲料饲喂;

[0115] 肥胖小鼠模型组:高脂高糖饲料饲喂。

[0116] 实验组:高脂高糖饲料饲喂,且灌胃给予各实施例或对比例制得的菌剂,每只小鼠灌胃给予总活菌数为 10^9 CFU的菌剂,每日1次。

[0117] 所有小鼠均自由摄食饲料及饮水,菌剂灌胃给药,饲养环境相对湿度55%,恒温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 和12h光暗循环条件下饲养,连续6周,第6周结束测量小鼠重量,计算体重增长率,根据体重增长率评价菌剂对小鼠肥胖的调节作用。体重增长率(%) = (第6周实验结束各组小鼠体重-实验前初始体重) / 实验前初始体重 $\times 100\%$,结果如表1所示。

[0118] 表1

组别	体重增长率(%)
正常对照组	46.67
肥胖小鼠模型组	120.00
实施例1	48.50
实施例2	49.06
实施例3	48.92
实施例4	74.67
实施例5	84.27
实施例6	93.45
对比例1	100.43
对比例2	96.30

[0120] 由表1数据可知,实施例4、对比例1较实施例1相比,分别缺少罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉或约氏乳杆菌 *Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉中的一种,其肥胖小鼠的体重增长率均高于实施例1,表明两种菌株组合应用,协同增效,可以显著减缓肥胖小鼠的体重增长率,达到有效的体重控制作用。

[0121] 实施例5、实施例6较实施例1相比,罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* LR08与约氏乳杆菌 *Lactobacillus johnsonii* LJ09两种菌株的活菌比不在(0.5-5):1的范围内,其体重增长率高于实施例1,表明益生菌剂中两种菌株的比例在优选范围(0.5-5):1内时,肥胖控制作用更强。

[0122] 对比例2较实施例1相比应用市售的罗伊氏乳杆菌,其体重增长率高于实施例1,表明含有本发明所述的罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* LR08菌株的益生菌剂的肥胖体重控制效果更好。

[0123] 测试例2

[0124] 本测试例对实施例或对比例制得菌剂的小鼠血脂调节作用进行评价,具体评价方法如下:

[0125] 分组与实验操作同测试例1,第6周实验结束后,取小鼠尾静脉血,2000rpm,离心10min后取血清,使用全自动生化分析仪检测各组小鼠血清中总胆固醇(total cholesterol,TC)、三酰甘油(triacylglyceride,TAG)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein,HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein,LDL)的含量。结果如图1-4所示,

[0126] 由图1-4可知,实施例4、对比例1较实施例1相比,分别缺少罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉或约氏乳杆菌 *Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干

粉中的一种,其TC、LDL均高于实施例1,HDL低于实施例1,表明两种菌株组合应用,协同增效,可以降低胆固醇、低密度脂蛋白含量,进而改善小鼠血脂代谢紊乱。

[0127] 实施例5、实施例6较实施例1相比,罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08与约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09两种菌株的活菌比不在(0.5-5):1的范围内,其TC、LDL均高于实施例1,HDL低于实施例1,表明益生菌剂中两种菌株的比例在优选范围(0.5-5):1内时,血脂调节作用更强。

[0128] 对比例2较实施例1相比应用市售的罗伊氏乳杆菌,其TC、LDL均高于实施例1,HDL低于实施例1,表明含有本发明所述的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株的益生菌剂的血脂调节效果更好。

[0129] 测试例3

[0130] 本测试例对灌胃实施例1制得菌剂的小鼠葡萄糖耐量水平进行评价,具体评价方法如下:

[0131] 分组与实验操作同测试例1,第6周实验结束后,小鼠禁食6h后测定口服葡萄糖耐量(OGTT),根据小鼠体重口服喂食1.5mg/kg葡萄糖(购自Sigma)。在葡萄糖负载后,于0min、15min、30min、60min和120min抽取小鼠尾部血液,使用血糖仪测量血糖,并绘制口服葡萄糖耐量随时间变化的曲线。如图5所示。

[0132] 结果表明:肥胖小鼠模型组相较于正常对照组初始葡萄糖耐量偏高,其机体调控糖代谢水平紊乱,在注射1.5mg/kg葡萄糖后,血清葡萄糖水平在前15min呈现急剧的上升,随后开始下降,15-30min之间的口服葡萄糖水平下降速度较正常对照组低,表明肥胖小鼠模型组小鼠对葡萄糖的分解利用能力较弱。

[0133] 实施例1组小鼠使用本发明所述益生菌剂干预后,该组小鼠注射葡萄糖,血清葡萄糖水平在前15min上升速度低于肥胖小鼠模型组,且15-30min之间的口服葡萄糖水平下降速度也较肥胖小鼠模型组更快,表明使用本发明所述的益生菌剂干预肥胖小鼠后,可以显著改善肥胖小鼠体内的糖代谢紊乱状况,进而降低肥胖小鼠的口服葡萄糖耐量。

[0134] 测试例4

[0135] 本测试例对灌胃实施例1制得菌剂的小鼠胰腺细胞因子进行分析,具体方法如下:

[0136] 分组与实验操作同测试例1,第6周实验结束后,解剖小鼠,摘取胰腺组织,使用Tris-HCl缓冲液(pH 7.4, AMRESCO®)均质化胰腺组织。在1800g,4℃下离心均质物10min,收集上清液分析蛋白质浓度和细胞因子。使用考马斯蓝染色法(Bradford法)测量蛋白质浓度;使用ELISA方法(小鼠细胞因子试剂盒,武汉纯度生物)测定细胞因子IL-2、IL-6、IL-10水平。结果如图6-8所示。

[0137] 结果表明:肥胖小鼠模型组细胞因子IL-2、IL-6水平高于正常对照组,IL-10低于正常对照组,表明肥胖小鼠的肠道炎症较正常对照组严重。

[0138] 实施例1组小鼠的细胞因子IL-2、IL-6水平显著低于肥胖小鼠模型组,稍高于正常对照组的小鼠,抗炎因子IL-10变化趋势相反,表明本发明所述益生菌剂可以调节炎症反应,降低肥胖小鼠的炎症因子。

[0139] 测试例5

[0140] 本测试例对灌胃各实施例或对比例制得菌剂的小鼠的胰岛素及GLP-1水平进行分析,具体方法如下:

[0141] 分组与实验操作同测试例1,第6周实验结束后,禁食6h,采集小鼠血液。血液采集后立即加入二肽基肽酶4抑制剂(武汉纯度生物,10 μ L/mL),将血液置于6000g,4 $^{\circ}$ C的条件下离心收集血清。使用ELISA方法(胰岛素试剂盒,武汉纯度生物)测量血清胰岛素,使用GLP-1 7-36酰胺试剂盒(Phoenix Pharmaceuticals,USA)测量GLP-1含量。结果如图9-10所示。

[0142] 由图9-10结果可知,实施例1-3组的GLP-1和胰岛素水平均显著高于肥胖小鼠模型组,表明本发明所述益生菌剂可以有效刺激肠内分泌细胞分泌GLP-1,进而促进胰岛 β 细胞生长与胰岛素分泌,提升血清胰岛素含量。

[0143] 实施例4、对比例1较实施例1相比,分别缺少罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08冻干粉或约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09冻干粉中的一种,其GLP-1和胰岛素含量均低于实施例1,表明两种菌株组合应用,协同增效,可以提升肥胖小鼠的胰岛素分泌量,改善其血糖代谢紊乱现象。

[0144] 实施例5、实施例6较实施例1相比,罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08与约氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii* LJ09两种菌株的活菌比不在(0.5-5):1的范围内,其GLP-1和胰岛素含量均低于实施例1,表明益生菌剂中两种菌株的比例在优选范围(0.5-5):1内时,胰岛素分泌量更高。

[0145] 对比例2较实施例1相比应用市售的罗伊氏乳杆菌冻干粉,其GLP-1和胰岛素含量均低于实施例1,表明含有本发明所述的罗伊氏乳杆菌*Lactobacillus reuteri* LR08菌株的益生菌剂较含有市售罗伊氏乳杆菌的益生菌剂的促进胰岛素分泌的效果更强。

[0146] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的制备工艺,但本发明并不局限于上述实施例,即不意味着本发明必须依赖上述实施例才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

[0147] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0148] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

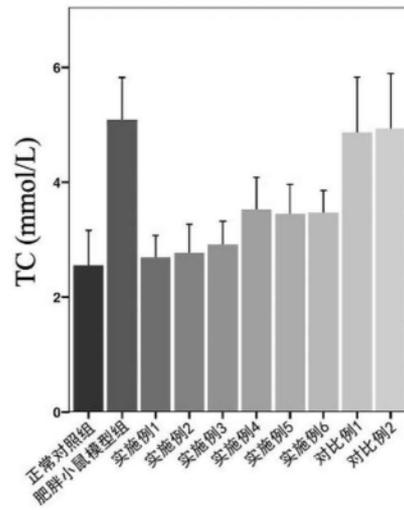


图1

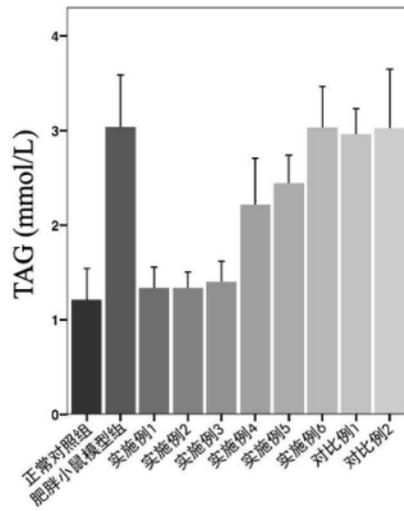


图2

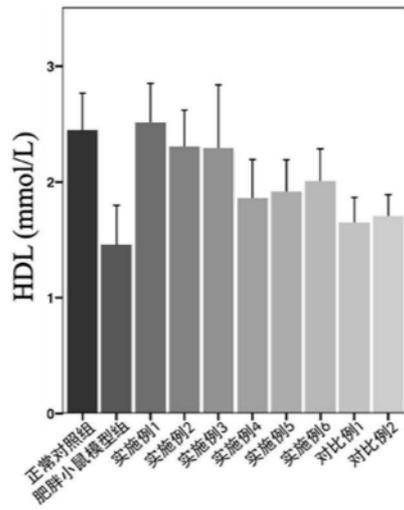


图3

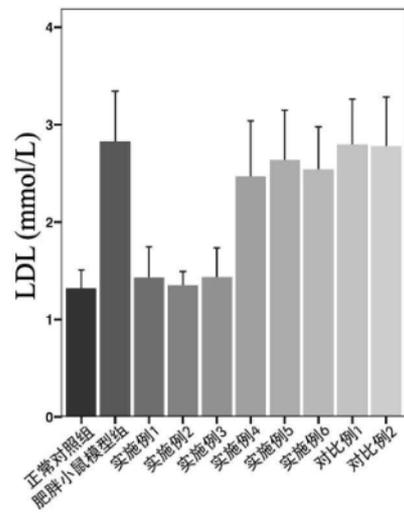


图4

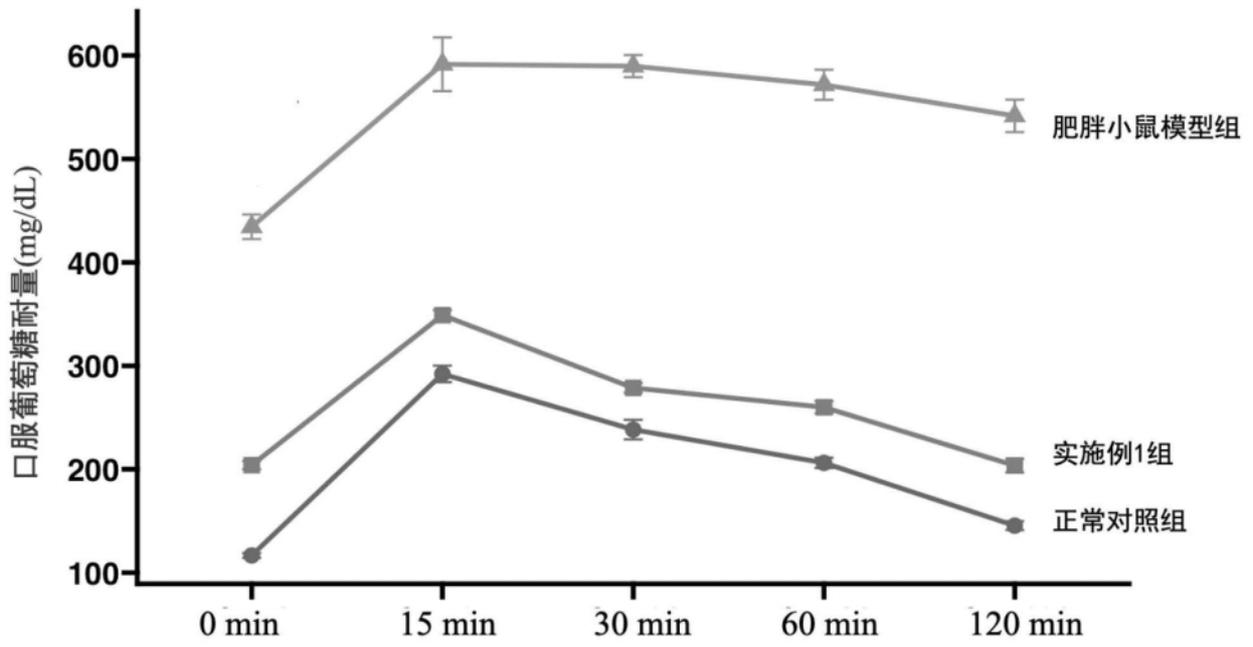


图5

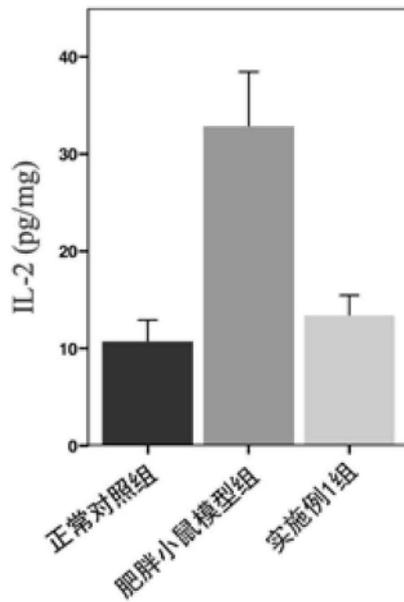


图6

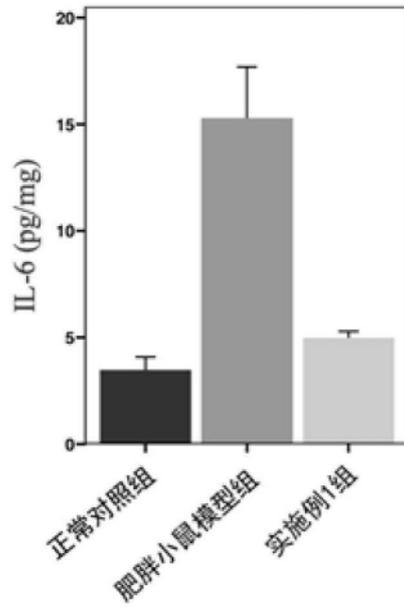


图7

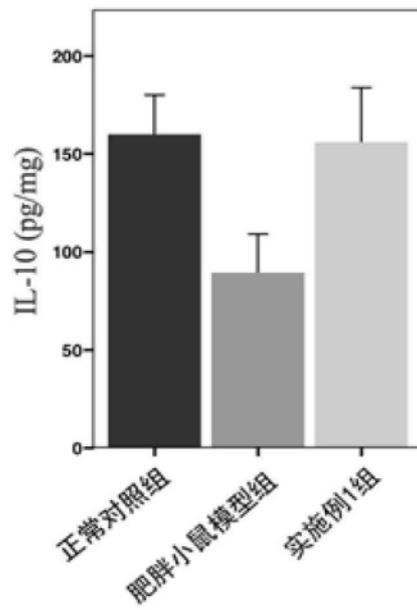


图8

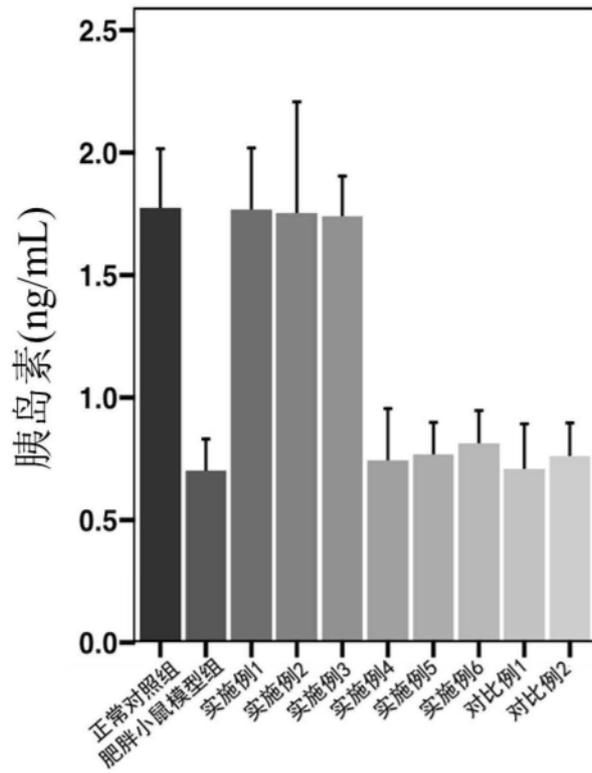


图9

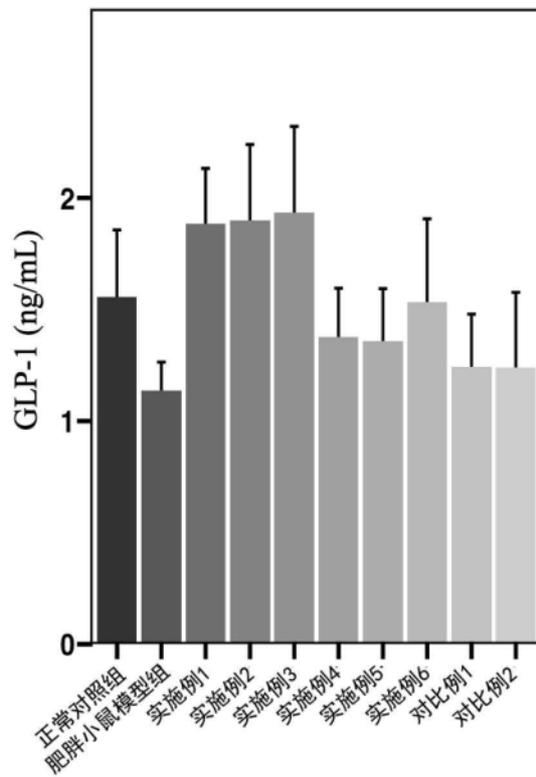


图10