



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114886929 A

(43) 申请公布日 2022.08.12

(21) 申请号 202210476129.4

A23L 33/135 (2016.01)

(22) 申请日 2022.04.29

G12N 1/20 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

G12N 1/04 (2006.01)

CGMCC No.24381 2022.01.21

A61P 25/28 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(71) 申请人 河北一然生物科技股份有限公司

地址 050000 河北省石家庄市中国(河北)

自由贸易试验区正定片区正定县高新技术
技术产业开发区北区邦秀东路16号

(72) 发明人 赵林森 齐世华 杨玲 路江浩

孙策 樊中利

(74) 专利代理机构 河北国维致远知识产权代理

有限公司 13137

专利代理师 任青

(51) Int. Cl.

A61K 35/745 (2015.01)

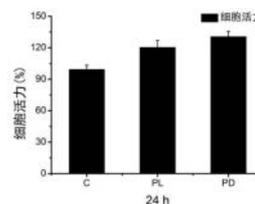
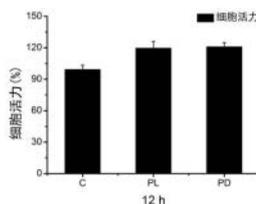
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

两歧双歧杆菌B11在制备改善脑部认知功能、提高记忆力产品中的应用

(57) 摘要

本发明涉及微生物技术领域,特别是涉及两歧双歧杆菌B11在制备改善脑部认知功能、提高记忆力产品中的应用。该两歧双歧杆菌B11已于2022年01月21日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物菌种保藏中心,其保藏编号为CGMCC NO:24381;保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院,中科院微生物研究所。该菌株能够显著提高海马神经元的细胞活力,并提升BDNF和CREB基因的相对表达水平,提高BDNF分泌量,可用于制成通过该作用机制来改善脑部认知功能、提高记忆力的产品。



1. 两歧双歧杆菌B11在制备改善脑部认知功能、提高记忆力产品中的应用,其特征在于,所述两歧双歧杆菌B11的保藏编号为CGMCC No.24381,其分类名称为两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述产品用于改善脑部认知。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述产品用于提高记忆力。
4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述产品为提高神经元细胞活力的产品。
5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述产品为促进血脑源性神经营养因子和/或cAMP反应元件结合蛋白分泌的产品。
6. 根据权利要求1~5任一项所述的应用,其特征在于,所述两歧双歧杆菌B11在所述产品中为活性菌体。
7. 根据权利要求1~5任一项所述的应用,其特征在于,所述两歧双歧杆菌B11在所述产品中为灭活菌体。
8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,灭活的温度 $\leq 65^{\circ}\text{C}$,灭活时间 $\leq 2\text{h}$ 。
9. 根据权利要求1~5任一项所述的应用,其特征在于,所述两歧双歧杆菌B11在所述产品中为其发酵上清液。
10. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述产品为食品、保健食品或口服药物制剂。

两歧双歧杆菌B11在制备改善脑部认知功能、提高记忆力产品中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,特别是涉及两歧双歧杆菌B11在制备改善脑部认知功能、提高记忆力产品中的应用。

背景技术

[0002] 肠道菌群是我们肠道中大量微生物的总称,对机体的免疫功能、营养吸收、新陈代谢和生理的许多其他方面都至关重要。最近的研究表明,肠道菌群会影响中枢神经系统的功能,与健康个体相比,患有神经发育、认知和情绪障碍(如阿尔茨海默病、孤独症、抑郁症和焦虑症)的患者分别具有不同的肠道微生物群组成。大脑和肠道之间的双向交流已得到证实,并提出了微生物-肠-脑轴的概念。该轴的潜在机制是通过微生物群代谢物、免疫系统、神经内分泌系统和模糊的神经通路和宿主大脑相互作用。肠道菌群的代谢物,例如短链脂肪酸(SCFA)、 γ -氨基丁酸、去甲肾上腺素、血清素、多巴胺和乙酰胆碱等,可以穿过肠道黏膜层和血脑屏障,进而可能来调节大脑发育、功能甚至行为。

[0003] 但肠道菌群包含的菌种数量和种类均很多,单纯补充一种或几种益生菌未必能起到调节大脑发育、功能甚至行为的作用,或者即使能够起到一定作用,却未必能达到显著的效果。并且,常见的益生菌产品,如乳酸菌,通常对温度非常敏感,生产、储存或使用过程的高温均容易使灭活,导致产品中有效成分不稳定,使用效果不可靠,进而影响到实际使用的有效性和安全性。

发明内容

[0004] 针对以上技术问题,本发明提供两歧双歧杆菌B11在制备改善脑部认知功能、提高记忆力产品中的应用。本发明通过试验证明,两歧双歧杆菌B11在有活性或灭活的情况下均能够显著提高海马神经元的细胞活力,并提升血脑源性神经营养因子(BDNF)和cAMP反应元件结合蛋白(CREB)基因的相对表达水平,提高BDNF分泌量,能够显著改善脑部认知功能、提高记忆力。

[0005] 为达到上述发明目的,本发明实施例采用了如下的技术方案:

[0006] 两歧双歧杆菌B11在制备改善脑部认知功能、提高记忆力产品中的应用,所述两歧双歧杆菌B11的保藏编号为CGMCC No.24381,其分类名称为两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)。该菌株已于2022年01月21日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物菌种保藏中心,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中科院微生物研究所。

[0007] 经研究发现,有活性和灭活的两歧双歧杆菌B11均可显著提高海马神经元的细胞活力,并提升BDNF和CREB基因的相对表达水平,提高BDNF分泌量,故两歧双歧杆菌B11可用于制成通过该作用机制来改善脑部认知功能、提高记忆力的产品,且在生产、储存或使用过程无需刻意保持低温。

- [0008] 优选地,所述产品用于改善脑部认知。
- [0009] 优选地,所述产品用于提高记忆力。
- [0010] 优选地,所述产品为提高神经元细胞活力的产品。
- [0011] 优选地,所述产品为促进血脑源性神经营养因子和/或cAMP反应元件结合蛋白分泌的产品。
- [0012] 优选地,所述两歧双歧杆菌B11在所述产品中为活性菌体。
- [0013] 优选地,所述两歧双歧杆菌B11在所述产品中为灭活菌体。优选的灭活温度 $\leq 65^{\circ}\text{C}$,灭活时间 $\leq 2\text{h}$ 。
- [0014] 优选地,所述两歧双歧杆菌B11在所述产品中为其发酵上清液。
- [0015] 优选地,所述产品为食品、保健食品或口服药物制剂。将该菌株制成食品、保健食品或口服药物制剂,能够便于使用者在日常饮食中食用,或以治疗、保健为目的进行食用,以利于保持良好的脑部认知功能和记忆力,或对已有损伤的脑部认知功能和记忆力进行修复。
- [0016] 可选地,当该产品为食品时,除上述两歧双歧杆菌B11的活性菌体、灭活菌体或发酵上清液外,还可包括食品主成分以及其他添加剂;当该产品为保健食品或口服药物制剂时,除上述两歧双歧杆菌B11的活性菌体、灭活菌体或发酵上清液外,还可包括保健食品或药学中可接受的赋形剂和添加剂。由于上述两歧双歧杆菌B11在活性和灭活状态下均能发挥改善脑部认知功能、提高记忆力的作用,故在生产、储存、使用时无需刻意保持低温。但生产、储存和使用过程中不宜超过 65°C ,以免活性下降过量而影响产品功效。上述食品包括但不限于液体饮料、固体饮料等;保健食品包括但不限于口服液、粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊等,口服药物制剂的剂型包括但不限于口服液、颗粒剂、片剂、胶囊、散剂等。
- [0017] 采用活性菌体时,可按以下方法进行菌粉的制备:取 -80°C 冻存的两歧双歧杆菌B11甘油管,迅速融化后转接至10mL新鲜常规培养基中, 37°C 厌氧培养 24h,收获1代种子;以3%接种量将1代种子转接至100mL常规培养基中, 37°C 厌氧培养17-24h,收获2代种子;以3%接种量将2代种子转接至250mL常规培养基中, 37°C 厌氧培养17-20h,收获3代种子;将3代种子转接至发酵罐中,观察碱液的消耗量,在菌株生长至对数末期时,离心,弃上清,将菌泥与冻干保护剂混匀,预冻后,经真空冷冻干燥即得两歧双歧杆菌B11的冻干菌粉。
- [0018] 将冻干菌粉用PBS稀释溶解后,再在不超过 65°C 条件下加热 $\leq 2\text{h}$ 来进行热灭活,即可得到灭菌菌体。

附图说明

- [0019] 图1为本发明实施例1中两歧双歧杆菌B11对海马神经元细胞活力的影响;
- [0020] 图2为本发明实施例1中两歧双歧杆菌B11对BDNF基因相对表达水平的影响;
- [0021] 图3为本发明实施例1中两歧双歧杆菌B11对CREB基因相对表达水平的影响;
- [0022] 图4为本发明实施例1中两歧双歧杆菌B11对总BDNF含量的影响;
- [0023] 图1~图4中,C表示空白对照,PL表示活性两歧双歧杆菌B11,PD表示灭活两歧双歧杆菌B11。
- [0024] 图5为本发明实施例2中两歧双歧杆菌B11干预对小鼠莫里斯水迷宫测试的影响。

具体实施方式

[0025] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0026] 以下实施例中所使用的两歧双歧杆菌B11冻干菌粉的制备方法为:

[0027] 取-80℃冻存的两歧双歧杆菌B11甘油管,迅速融化后转接至10mL新鲜常规培养基(向液体MRS培养基中加入浓度为0.5g/mL的半胱氨酸盐酸溶液,调整pH至 6.8 ± 0.1 ,即得)中,37℃厌氧培养24h,收获1代种子;以3%接种量将1代种子转接至100mL常规培养基中,37℃厌氧培养24h,收获2代种子;以3%接种量将2代种子转接至250mL常规培养基中,37℃厌氧培养20h,收获3代种子;将3代种子转接至发酵罐中,观察碱液的消耗量,在菌株生长至对数末期时,离心,弃上清,将菌泥与冻干保护剂混匀,预冻后,经真空冷冻干燥收获两歧双歧杆菌B11的冻干菌粉。

[0028] 实施例1

[0029] 本发明实施例提供了两歧双歧杆菌B11在促进体外培养海马神经元的发育方面的应用效果。

[0030] 1. 实验方法

[0031] (1) 海马神经元的原代培养

[0032] 自安乐死的新生大鼠的头部获得新鲜海马,将海马切成小块,用胰蛋白酶在37℃下消化30min。然后将组织块悬浮在添加了10%胚胎牛血清、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的改良Eagle's培养基中,机械解离成单细胞。

[0033] 单细胞悬液以 1×10^6 个细胞/mL分别以2mL/孔的体积接种到6孔预涂有聚赖氨酸的板子上,37℃、5%CO₂培养24h;更换DMEM培养基(添加5%FBS、2%B27),培养24h;再次更换添加5%FBS、2%B27、1%N₂、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的DMEM,培养2d;更换添加5%FBS、2%B27、1%N₂、100U/mL青霉素、100μg/mL链霉素和0.1%阿糖胞苷的DEME培养基,培养2d;细胞用DMEM洗涤两次,培养基更换为添加1%N₂、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的无血清DMEM,培养7d,用于实验。

[0034] (2) 细胞铺板

[0035] 应用添加1%N₂、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的无血清DMEM培养基,将海马神经元细胞浓度调整为 1.0×10^6 个/mL,以2mL/孔的体积接种于24孔板中,培养24h贴壁后,更换2mL新鲜培养液。

[0036] (3) 菌悬液制备

[0037] 活性菌体菌悬液:取两歧双歧杆菌B11冻干菌粉,用PBS稀释溶解,制成 1×10^9 CFU/mL的菌液;

[0038] 灭活菌体菌悬液:取活性菌体菌悬液,在65℃条件下水浴2h,即得。

[0039] (4) 共孵育

[0040] 分别取200uL两歧双歧杆菌B11的活性菌体菌悬液和灭活菌体菌悬液,分别加到2mL细胞悬液中,即海马神经元细胞与两歧双歧杆菌B11的数量比为1:100,用添加1%N₂、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的无血清DMEM培养基进行共孵育培养。

[0041] (5) 细胞活力测定

[0042] 共孵育培养12或24h后,分别使用甲基噻唑基四唑 (MTT) 测定量化细胞活力:用PBS洗涤细胞2次,将含有0.5mg/mL MTT的培养基加入孔中,在 37℃下孵育4h,之后每孔中加入150μL DMSO以溶解甲臞晶体。使用酶标仪测定570nm的吸光值。

[0043] (6) RNA提取和RT-PCR

[0044] 共孵育培养12或24h后,使用TRIzol试剂提取RNA,然后使用iScript cDNA 合成试剂盒将RNA反转录为cDNA。对BDNF、CREB进行PCR。引物序列见表1。PCR反应体系为(20μL):10 μL 2×10μL TransStart Green qPCR SuperMix、1μL正向引物、1μL反向引物、1μL cDNA和7μL双蒸水组成。PCR反应程序为:94℃变性10s,58℃退火30s,72℃延伸15s,共40个循环。

[0045] 表1引物序列

	基因	正向引物	反向引物
[0046]	BDNF	5'-CGTGATCGAGGAGCTGTTGG-3'	5'-CTGCTTCAGTTGGCCTTTCG-3'
	CREB	5'-CTGATTCCCAAAAACGAAGG-3'	5'-CTGCCCACTGCTAGTTTGGT-3'

[0047] (7) 细胞源性神经营养因子 (BDNF) 测定

[0048] 共孵育培养12或24h后,添加裂解液裂解细胞获得蛋白质,裂解物以 12,000g离心30min,收集上清液,使用ELISA试剂盒检测总细胞BDNF的含量。

[0049] 2. 实验结果

[0050] 将双歧杆菌与海马神经元细胞共孵育后,测定双歧杆菌对细胞活力、BDNF 和CREB基因表达水平和BDNF分泌量的影响,结果如图1~图4所示,共孵育12和24h后,活性和灭活的两歧双歧杆菌B11均可显著提高海马神经元的细胞活力,并提升BDNF和CREB基因的相对表达水平;孵育12h时,活性双歧杆菌可显著提高总BDNF的含量。

[0051] 实施例2

[0052] 本发明实施例提供了两歧双歧杆菌B11在改善阿尔兹海默症模型小鼠的空间记忆障碍方面的应用效果。

[0053] 1. 实验方法

[0054] (1) 菌悬液制备

[0055] 取两歧双歧杆菌B11冻干菌粉,用生理盐水稀释溶解,制成 1×10^9 CFU/mL 的菌悬液,备用。

[0056] (2) 动物分组与干预

[0057] 选8周龄,体重在33~35g之间的雄性APP/PS1小鼠及其野生型同窝仔,APP/PS1小鼠随机分为2组(每组n=15):阿尔兹海默症模型组(A),灌胃 0.2mL无菌生理盐水;双歧杆菌组(P),用0.2mL双歧杆菌(1×10^9 CFU/mL) 每天灌胃1次;选另外15只野生型同窝仔作为正常对照(NC)每天用0.2mL 无菌盐水灌胃1次,共干预21周,结束时通过莫里斯水迷宫测试(Morris water maze test)对小鼠进行行为评估。

[0058] 2. 实验结果

[0059] 莫里斯水迷宫测试显示,A和P组小鼠跨平台的时间和在目标象限中花费的时间明显低于NC组,但与A组相比,P组跨平台次数和在目标象限停留时间显著增加(见图5),表明两歧双歧杆菌B11干预可显著提升阿尔兹海默症模型小鼠的空间记忆障碍。

[0060] 实施例3

[0061] 本实施例提供了一种改善脑部认知功能、提高记忆力的口服液的制备方法。

[0062] 在化料罐中配置常规培养基(每110g培养基中含有脱脂奶粉12g、葡萄糖 8g、酵母浸粉4g、水86g),溶解搅拌均匀后115℃高压灭菌20min,冷却后接入两歧双歧杆菌B11,37℃发酵24h,至pH降至4.3~4.5之间,冷却搅拌,经高温灭菌,分装后得到含双歧杆菌的口服液。

[0063] 实施例4

[0064] 本实施例提供了一种改善脑部认知功能、提高记忆力的口服液的制备方法。

[0065] 在化料罐中配置常规培养基,溶解搅拌均匀后115℃高压灭菌20min,冷却后接入两歧双歧杆菌B11,37℃发酵17h,至pH降至4.3~4.5之间,冷却搅拌,分装后得到含双歧杆菌的口服液。

[0066] 实施例5

[0067] 本实施例提供了一种改善脑部认知功能、提高记忆力的粉剂的制备方法。

[0068] 取两歧双歧杆菌B11的冻干菌粉,与其他常规益生元、甜味剂、果蔬粉等按所需比例混合后,按活菌数或克重作为包装规格进行分装,即可得到含两歧双歧杆菌B11的粉剂产品。

[0069] 实施例6

[0070] 本实施例提供了一种改善脑部认知功能、提高记忆力的颗粒剂的制备方法。

[0071] 取两歧双歧杆菌B11的冻干菌粉,用微晶纤维素、预胶化淀粉、羧甲基纤维素钠、甜菊素用常规的颗粒剂生产方法制成颗粒,按活菌数或克重作为包装规格进行分装,即可得到含两歧双歧杆菌B11的颗粒剂产品。

[0072] 实施例7

[0073] 本实施例提供了一种改善脑部认知功能、提高记忆力的片剂的制备方法。

[0074] 取两歧双歧杆菌B11的冻干菌粉,与预胶化淀粉、交联聚乙烯吡咯烷酮、滑石粉、二氧化硅混合,直接压片,即得。

[0075] 实施例8

[0076] 本实施例提供了一种改善脑部认知功能、提高记忆力的胶囊的制备方法。

[0077] 取两歧双歧杆菌B11的冻干菌粉,与胶囊剂常用赋形剂混合后灌装4#硬质胶囊壳,即得。

[0078] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换或改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

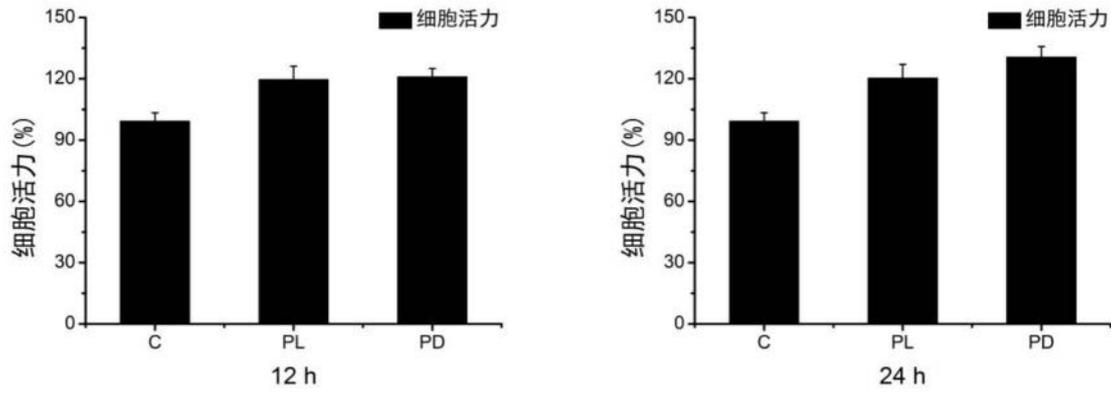


图1

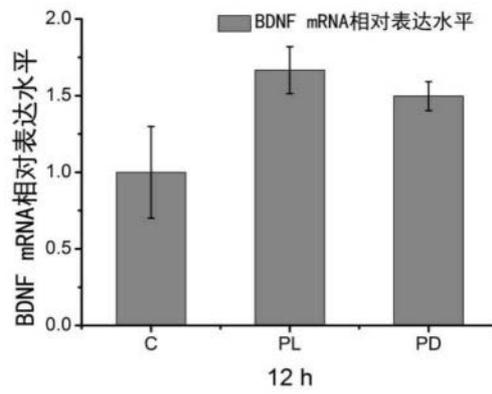


图2

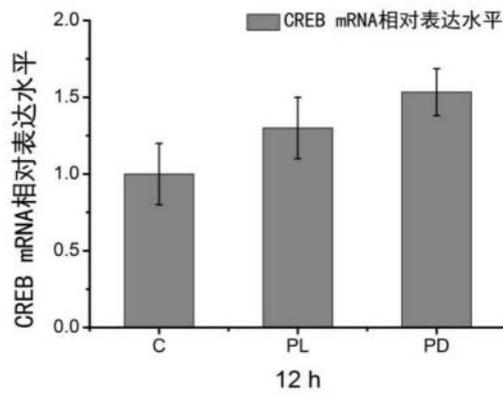


图3

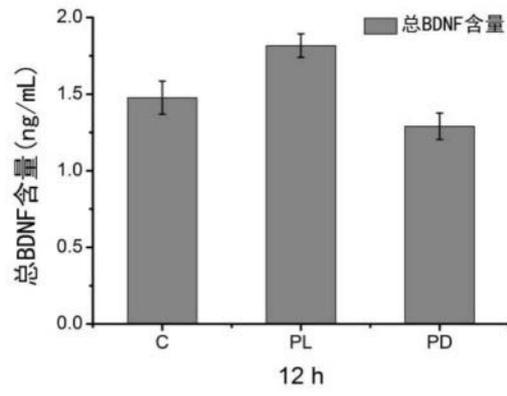


图4

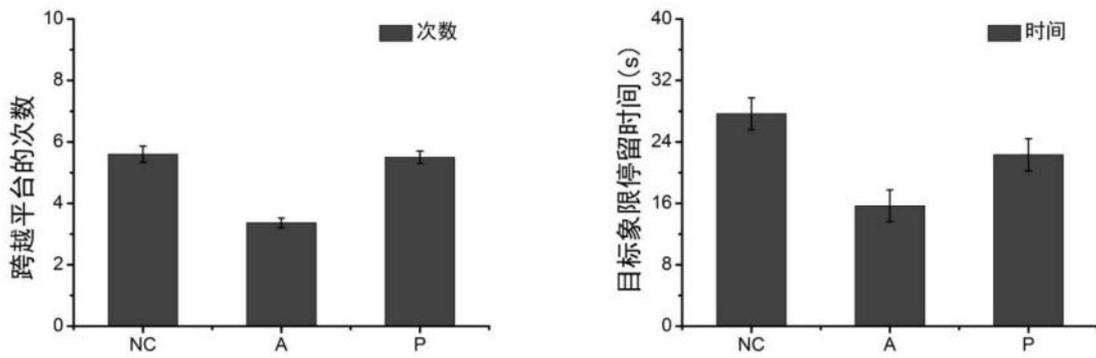


图5