



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112094790 A

(43) 申请公布日 2020.12.18

(21) 申请号 202011284911.3

A23L 33/135 (2016.01)

(22) 申请日 2020.11.17

A23L 29/00 (2016.01)

A23P 10/30 (2016.01)

(71) 申请人 招远新兴化工有限公司

A23L 33/105 (2016.01)

地址 265400 山东省烟台市招远市金岭镇
上华山

A23L 33/10 (2016.01)

A23L 11/00 (2016.01)

申请人 河北一然生物科技有限公司

A61K 35/747 (2015.01)

(72) 发明人 赵林森 路江浩 贾晓蒙 高景伟

A61K 36/899 (2006.01)

杨玲 赵星 贾洪利 郭润晴

A61K 9/19 (2006.01)

张士成

A61K 47/12 (2006.01)

(74) 专利代理机构 北京睿博行远知识产权代理
有限公司 11297

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

代理人 龚家骅

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

(51) Int.Cl.

C12R 1/25 (2006.01)

G12N 1/20 (2006.01)

G12N 1/04 (2006.01)

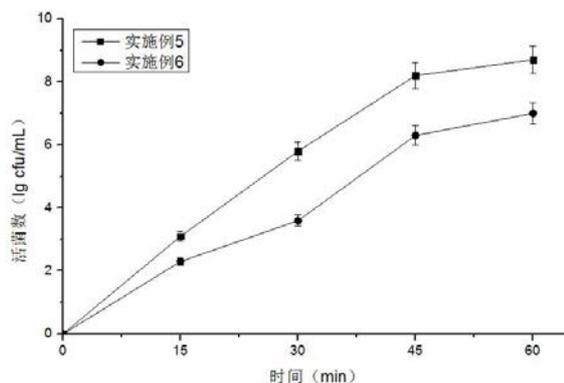
权利要求书1页 说明书11页 附图6页

(54) 发明名称

一种调节肠道菌群的植物乳杆菌LP45活菌制剂及应用

(57) 摘要

本发明提供一种植物乳杆菌活菌制剂及其用途,属于生物技术领域,包括植物乳杆菌冻干菌粉及冻干植物乳杆菌微胶囊,其中,制备过程中所用冷冻干燥保护剂包括甘油1-3wt%、10-羟基-2-癸烯酸0.05-0.15wt%,10-羟基-2-癸烯酸与甘油质量比为1:15-20。本发明提供的一种植物乳杆菌活菌制剂具有生物活性高,能够增强机体免疫功能、高效且持久调整肠道菌群平衡的优点。



1. 一种植物乳杆菌冻干菌粉的制备方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

a、将植物乳杆菌LP45发酵培养后离心收集菌体;

b、用冷冻干燥保护剂与菌体混合均匀,得到菌悬液;

c、将菌悬液倒入冻干瓶,瓶口密封,在-40至-80℃预冻10-14h,再置于真空冷冻干燥机中-40至-50℃条件下干燥14-20h,得到所述植物乳杆菌冻干菌粉;

所述冷冻干燥保护剂包括甘油1-3wt%、10-羟基-2-癸烯酸0.05-0.15wt%,10-羟基-2-癸烯酸与甘油的质量比为1:15-20。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述冷冻干燥保护剂中还包括脱脂乳粉10-15wt%、海藻糖5-10wt%、蔗糖3-8wt%、明胶1-3wt%、谷氨酸钠0.05-2wt%、L-半胱氨酸0.05-1wt%和硫酸锰0.3-0.5wt%。

3. 一种植物乳杆菌冻干菌粉,其特征在于:采用权利要求1-2任一项中所述的方法进行制备。

4. 一种冻干植物乳杆菌微胶囊的制备方法,其特征在于,具体步骤包括:

S1、单层微胶囊的制备:将培养的植物乳杆菌LP45发酵液离心收集菌体,将收集的菌体与冷冻干燥保护剂混合均匀,加入3wt%海藻酸钠溶液混合均匀后,加入碳酸钙溶液混合均匀,加入含有1.5%体积分数的吐温80的大豆油,400-500r/min搅拌乳化12-18min,加入含有0.5%体积分数的冰醋酸的大豆油,400-500r/min搅拌20-25min,向搅拌后的混合溶液中加入醋酸盐溶液,静置1.5-2h,离心收集微胶囊,用生理盐水重复洗涤3-5次,得到单层微胶囊;

S2、二次包衣的制备:将得到的单层微胶囊置于质量体积分数为0.2%的壳聚糖溶液中,100-150r/min搅拌15-20min,静置40-60min,过滤收集微胶囊,得到植物乳杆菌微胶囊;

S3、冷冻干燥:将制得的植物乳杆菌微胶囊经过预冻后进行真空冷冻干燥,得到冻干植物乳杆菌微胶囊;

所述步骤S1中冷冻干燥保护剂包括:脱脂乳粉10-15wt%、海藻糖5-10wt%、蔗糖3-8wt%、甘油1-3wt%、10-羟基-2-癸烯酸0.05-0.15wt%、明胶1-3wt%、谷氨酸钠0.05-2wt%、L-半胱氨酸0.05-1wt%和硫酸锰0.3-0.5wt%,所述10-羟基-2-癸烯酸与甘油质量比为1:15-20。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:所述菌体与冷冻干燥保护剂的质量体积比为1:2-4。

6. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:所述海藻酸钠和碳酸钙的质量比为2-5:1。

7. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:所述菌体与海藻酸钠溶液的质量比为1:2.5-3.5。

8. 一种冻干植物乳杆菌微胶囊,其特征在于:采用权利要求4-7任一项中所述的方法进行制备。

9. 权利要求3所述的一种植物乳杆菌冻干菌粉在制备调理胃肠道的药品或食品中的用途。

10. 权利要求8所述的一种冻干植物乳杆菌微胶囊在制备调理胃肠道的药品或食品中的用途。

一种调节肠道菌群的植物乳杆菌LP45活菌制剂及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种调节肠道菌群的植物乳杆菌LP45活菌制剂及应用。

背景技术

[0002] 植物乳杆菌(*L. plantarum*)属于乳杆菌科中的乳杆菌属,革兰氏阳性菌,兼性厌氧,是人体胃肠道的益生菌群,代谢可以产生有机、细菌素、过氧化氢、双乙酰等多种天然抑菌物质,调整菌群之间的关系,维持和保证菌群最佳优势组合以及组合的稳定,阻止了致病菌的定殖与入侵,拮抗致病菌和有害微生物的生长及毒素的黏附,具有维持肠道菌群平衡的作用。但是乳酸菌较难长期保存,因此,乳酸菌的保藏成了热门的研究课题。利用真空冷冻干燥技术生产活菌制剂是多种保藏方法中较为理想的一种。而制作菌粉的关键是保护剂种类及配比的选择。因此,选择一种使用便捷的保藏形式,以及研究使菌种存活率高的保护剂配方有着积极意义。

[0003] 乳酸菌的长期保藏方法,多采用冷冻干燥法或喷雾干燥法,将乳酸菌制成粉剂,用以延长保存时间。冷冻干燥是将欲保藏的微生物细胞悬浮液冻结后,在真空条件下使冰升华,最后达到干燥的目的。此方法主要是根据微生物生理、生化特点,干燥后使微生物的代谢处于不活泼、生长繁殖受到抑制,达到休眠状态,以保持菌株原有特性。而且用这种方法生产的发酵剂与喷雾干燥法等其他方法生产的发酵剂相比具有更高的稳定性、活性。但真空冷冻干燥过程是使发酵液中的游离水在冻结状态下失去的一个过程,冷冻和干燥两个过程会造成部分微生物细胞的损伤、死亡及某些酶蛋白分子的钝化,如果冻干工艺中保护剂选择不当,就会使乳酸菌的存活率下降。发酵液干燥前后乳酸菌的存活率大小可直接体现不同保护剂对乳酸菌活力的影响。因此,冻干保护剂是制作干燥发酵剂最为关键的因素之一,它不仅影响发酵剂在冻干过程中的细胞存活率,也影响保藏期间的细胞稳定性。

[0004] 现有技术如公开号为CN 103695330 A的中国发明专利,公开了一种植物乳杆菌活菌制剂的制备方法,是将植物乳杆菌培养至稳定期后加入经过破壁处理的酿酒酵母,将发酵液离心得到菌泥,菌泥中混入保护剂进行真空干燥,将真空干燥得到的植物乳杆菌菌粉与低聚糖混合。本发明的方法简便、成本低,实现了废物资源化,适合工业化生产。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种生物活性高,能够增强机体免疫功能、高效且持久调整肠道菌群平衡的一种调节肠道菌群的植物乳杆菌LP45活菌制剂及应用。

[0006] 本发明为实现上述目的所采取的技术方案为:

提供一种植物乳杆菌冻干菌粉的制备方法,具体包括以下步骤:

- a、将植物乳杆菌LP45发酵培养后离心收集菌体;
- b、用冷冻干燥保护剂与菌体混合均匀,得到菌悬液;
- c、将菌悬液倒入冻干瓶,瓶口密封,在-40至-80℃预冻10-14h,再置于真空冷冻干燥机

中-40至-50℃条件下干燥14-20h,得到所述植物乳杆菌冻干菌粉;

上述冷冻干燥保护剂包括甘油1-3wt%、10-羟基-2-癸烯酸0.05-0.15wt%,10-羟基-2-癸烯酸与甘油质量比为1:15-20。10-羟基-2-癸烯酸与甘油质量比为1:15-20时,可能通过增强甘油对水的结晶过程的弱化,更好的保护细胞免受损伤,能够有效提高菌体在冻干过程中的活菌存活率,有利于植物乳杆菌在胃肠道中定植,提高对人体的保健作用。

[0007] 优选地,上述冷冻干燥保护剂中还包括脱脂乳粉10-15wt%、海藻糖5-10wt%、蔗糖3-8wt%、明胶1-3wt%、谷氨酸钠0.05-2wt%、L-半胱氨酸0.05-1wt%和硫酸锰0.3-0.5wt%。

[0008] 提供一种植物乳杆菌冻干菌粉,采用上述一种植物乳杆菌冻干菌粉的制备方法进行制备。

[0009] 提供一种冻干植物乳杆菌微胶囊的制备方法,具体步骤包括:

S1、单层微胶囊的制备:将培养的植物乳杆菌LP45发酵液离心收集菌体,将收集的菌体与冷冻干燥保护剂混合均匀,加入3wt%海藻酸钠溶液混合均匀后,加入碳酸钙溶液混合均匀,加入含有1.5%体积分数的吐温80的大豆油,400-500r/min搅拌乳化12-18min,加入含有0.5%体积分数的冰醋酸的大豆油,400-500r/min搅拌20-25min,向搅拌后的混合溶液中加入醋酸盐溶液,静置1.5-2h,离心收集微胶囊,用生理盐水重复洗涤3-5次,得到单层微胶囊;

S2、二次包衣的制备:将得到的单层微胶囊置于质量体积分数为0.2%的壳聚糖溶液中,100-150r/min搅拌15-20min,静置40-60min,过滤收集微胶囊,得到植物乳杆菌微胶囊;

S3、冷冻干燥:将制得的植物乳杆菌微胶囊经过预冻后进行真空冷冻干燥,得到冻干植物乳杆菌微胶囊;

上述步骤S1中冷冻干燥保护剂包括:脱脂乳粉10-15wt%、海藻糖5-10wt%、蔗糖3-8wt%、甘油1-3wt%、10-羟基-2-癸烯酸0.05-0.15wt%、明胶1-3wt%、谷氨酸钠0.05-2wt%、L-半胱氨酸0.05-1wt%和硫酸锰0.3-0.5wt%,上述10-羟基-2-癸烯酸与甘油质量比为1:15-20。本发明采用微胶囊技术将植物乳杆菌包裹起来,既能使植物乳杆菌顺利通过胆盐、胃酸环境,又因其良好的溶解性可以将植物乳杆菌及时在肠道内释放定植,从而促进植物乳杆菌对人体保健作用的发挥。10-羟基-2-癸烯酸与甘油质量比为1:15-20时,可能通过增强甘油对水的结晶过程的弱化,更好地保护细胞免受损伤及避免冰晶的形成对微胶囊造成的机械损伤,能够提高包埋率和对胃液的耐受力,更好地在肠道中定植,进而提高机体的体液免疫能力,刺激上调抗炎因子的表达,抑制促炎因子的分泌,发挥特异性免疫功能,活化肠粘膜的淋巴细胞,刺激SIgA的分泌,提高肠道粘膜免疫功能,有利于调整肠道菌群平衡。本发明所制得的冻干植物乳杆菌微胶囊的包埋率可达78.3%以上,活菌数可达到 7.5×10^{11} CFU/g以上。

[0010] 优选地,上述步骤S1中菌体与冷冻干燥保护剂的质量体积比(g/mL)为1:2-4。

[0011] 优选地,上述步骤S1中海藻酸钠和碳酸钙的质量比为2-5:1。

[0012] 优选地,上述步骤S1中菌体与海藻酸钠溶液的质量比为1:2.5-3.5。

[0013] 优选地,上述步骤S1中碳酸钙与冰醋酸的摩尔比为1:2.5-3。冰醋酸的含量对于益生菌微胶囊的特性有着显著影响,冰醋酸通过影响碳酸钙中钙离子的溶出从而影响海藻酸钙微胶球的性质。

[0014] 优选地,上述步骤S1中将收集的菌体与冷冻干燥保护剂混合前,先与添加剂溶液进行混合。更为优选地,上述添加剂溶液中包括:4-7wt%的菊粉、1-2wt%的燕麦草提取物(含

60wt%燕麦β-葡聚糖)和1-4wt%的熟鹰嘴豆粉。进一步地,上述燕麦草提取物和熟鹰嘴豆粉的质量比为1:1.2-1.8。燕麦草提取物和鹰嘴豆质量比为1:1.2-1.8时能够协同促进植物乳杆菌生成有机酸,抑制肠道中有害细菌的生长,调整肠道菌群平衡,同时促进氨的消耗减少氨的产生,降低肠道中氨的含量,修复受损的肠道粘膜,进一步调整肠道菌群平衡。

[0015] 优选地,上述步骤S1中添加剂溶液、冷冻干燥保护剂、3wt%海藻酸钠溶液和碳酸钙溶液的体积总和与大豆油的总体积比为1:2-5。水油体积比通过影响制得的益生菌微胶囊的粒径影响微胶囊中混合菌体的包埋率和益生菌活菌数。

[0016] 优选地,上述步骤S2中单层微胶囊与壳聚糖溶液的质量体积比(g/mL)为1:6-8。

[0017] 提供一种冻干植物乳杆菌微胶囊,采用上述一种冻干植物乳杆菌微胶囊的制备方法进行制备。

[0018] 提供上述一种植物乳杆菌冻干菌粉在制备调理胃肠道的药品或食品中的用途。

[0019] 提供上述一种冻干植物乳杆菌微胶囊在制备调理胃肠道的药品或食品中的用途。

[0020] 本发明由于在制备植物乳杆菌活菌制剂时采用了10-羟基-2-癸烯酸与甘油质量比为1:15-20的冷冻干燥保护剂,因而具有如下有益效果:可能通过增强甘油对水的结晶过程的弱化,更好的保护细胞免受损伤及避免冰晶的形成对微胶囊造成的机械损伤,能够提高包埋率和对胃液的耐受力,更好地在肠道中定植,进而提高机体的体液免疫能力,刺激上调抗炎因子的表达,抑制促炎因子的分泌,发挥特异性免疫功能,活化肠粘膜的淋巴细胞,刺激SIgA的分泌,提高肠道粘膜免疫功能,有利于调整肠道菌群平衡。本发明所制得的冻干植物乳杆菌微胶囊的包埋率可达78.3%以上,活菌数可达到 7.5×10^{11} CFU/g以上。

[0021] 本发明由于在制备植物乳杆菌活菌制剂时采用了燕麦草提取物和鹰嘴豆,因而具有如下有益效果:燕麦草提取物和鹰嘴豆质量比为1:1.2-1.8时能够协同促进植物乳杆菌生成有机酸,抑制肠道中有害细菌的生长,调整肠道菌群平衡,同时促进氨的消耗减少氨的产生,降低肠道中氨的含量,修复受损的肠道粘膜,进一步调整肠道菌群平衡。

[0022] 因而本发明是一种生物活性高,能够增强机体免疫功能、高效且持久调整肠道菌群平衡的一种调节肠道菌群的植物乳杆菌LP45活菌制剂及应用。

附图说明

[0023] 图1为本发明试验例2中冻干植物乳杆菌微胶囊活菌数和包埋率的测定结果;

图2为本发明试验例2中模拟人工胃液中菌体存活率的测定结果;

图3为本发明试验例2中微胶囊在模拟人工肠液中活菌数的测定结果;

图4为本发明试验例3中IgG、IL-6、IL-10的含量的检测结果;

图5为本发明试验例3中肠粘膜中SIgA含量的检测结果;

图6为本发明试验例3中有机酸含量的测定结果;

图7为本发明试验例3中肠道氨含量的测定结果。

具体实施方式

[0024] 以下结合实施例对本发明作进一步详细描述:

实施例1:

1、一种植物乳杆菌冻干菌粉的制备方法,包括:

1.1 试验材料:植物乳杆菌LP45菌株,脱脂乳粉,购自完达山企业集团乳品有限公司;海藻糖,购自河北百优生物科技有限公司;明胶,购自广州健科生物科技有限公司;蔗糖,市售级;甘油,购自河南豪淼化工产品有限公司;谷氨酸钠,购自江西百盈生物技术有限公司;L-半胱氨酸,购自江苏新唐生物科技有限公司。

[0025] 1.1.1改良MRS琼脂培养基的配制:蛋白胨10g、牛肉膏10g、酵母膏5g、柠檬酸氢二铵2g、葡萄糖20g、吐温80 1mL、乙酸钠5g、磷酸氢二钾2g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g,琼脂15g, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.25g,蒸馏水1L。

[0026] 1.1.2改良MRS液体培养基的配制:酵母粉4g,20g葡萄糖,10g蛋白胨,5g牛肉粉,2g磷酸氢二钾,5g乙酸钠,2g柠檬酸三铵,0.2g硫酸镁,0.05g硫酸锰,吐温80 1mL,蒸馏水999mL。

[0027] 1.1.3冷冻干燥保护剂的配制:脱脂乳粉12g、海藻糖6g、蔗糖5g、甘油1.6g、10-羟基-2-癸烯酸0.09g、明胶2g、谷氨酸钠1g、L-半胱氨酸0.12g和硫酸锰0.3g,蒸馏水71.9g。

[0028] 1.2菌体收集:将 $-80^{\circ}C$ 冷冻保藏的植物乳杆菌LP45接种于灭菌后的改良MRS琼脂培养基上 $37^{\circ}C$ 培养48h,得到活化培养的斜面种子,挑选茁壮的菌落加入到改良MRS液体培养基, $37^{\circ}C$ 厌氧培养24h,得到一级种子液;将一级种子液按照8%的体积分数接种至改良MRS液体培养基, $37^{\circ}C$ 厌氧培养24h,得二级种子液;将二级种子液按照8%的体积分数接种至改良MRS液体培养基, $37^{\circ}C$ 厌氧发酵培养22h,发酵液在 $4^{\circ}C$ 下4000g离心5min,去上清液,所得菌泥用无菌生理盐水溶液洗涤3次后,离心收集菌体;

1.3冷冻干燥:将菌体与冷冻干燥保护剂按照质量体积比(g/mL)1:3的比例混合均匀,得到菌悬液,将菌悬液倒入冻干瓶,瓶口密封,在 $-70^{\circ}C$ 预冻12h,再在真空冷冻干燥机中 $-40^{\circ}C$ 下干燥18h,得到植物乳杆菌冻干菌粉。

[0029] 实施例2:

1.1.3冷冻干燥保护剂的配制:脱脂乳粉12g、海藻糖6g、蔗糖5g、甘油1.6g、明胶2g、谷氨酸钠1g、L-半胱氨酸0.12g和硫酸锰0.3g,蒸馏水71.9g。其余部分和实施例1完全一致。

[0030] 实施例3:

1.1.3冷冻干燥保护剂的配制:脱脂乳粉12g、海藻糖6g、蔗糖5g、甘油1.6g、10-羟基-2-癸烯酸0.06g、明胶2g、谷氨酸钠1g、L-半胱氨酸0.12g和硫酸锰0.3g,蒸馏水71.9g。其余部分和实施例1完全一致。

[0031] 实施例4:

1.1.3冷冻干燥保护剂的配制:脱脂乳粉12g、海藻糖6g、蔗糖5g、甘油1.6g、10-羟基-2-癸烯酸0.15g、明胶2g、谷氨酸钠1g、L-半胱氨酸0.12g和硫酸锰0.3g,蒸馏水71.9g。其余部分和实施例1完全一致。

[0032] 实施例5:

1、一种冻干植物乳杆菌微胶囊的制备方法,具体包括:

1.1 试验材料:植物乳杆菌LP45菌株,脱脂乳粉,购自完达山企业集团乳品有限公司;海藻糖,购自河北百优生物科技有限公司;明胶,购自广州健科生物科技有限公司;蔗糖,市售级;甘油,购自河南豪淼化工产品有限公司;谷氨酸钠,购自江西百盈生物技术有限公司;L-半胱氨酸,购自江苏新唐生物科技有限公司。海藻酸钠为褐色粉末,购自江苏仟泊生物工程有限公司;菊粉、壳聚糖,购自南京熙美诺生物科技有限公司;大豆油,市售级;熟鹰嘴豆粉,

购自江苏腾昌生物科技有限公司;燕麦草提取物,含60%(m/m)燕麦 β -葡聚糖,购自西安佰斯特生物科技有限公司。

[0033] 需要说明的是,在具体的应用场景中,上述的燕麦草提取物、熟鹰嘴豆粉可以用低聚果糖和抗性糊精进行替代,这样的变化可以根据实际情况进行调整,并不会影响本发明的保护范围。

[0034] 1.1.1改良MRS琼脂培养基的配制:蛋白胨10g、牛肉膏10g、酵母膏5g、柠檬酸氢二铵2g、葡萄糖20g、吐温80 1mL、乙酸钠5g、磷酸氢二钾2g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g,琼脂15g, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.25g,蒸馏水1L。

[0035] 1.1.2改良MRS液体培养基的配制:酵母粉4g,20g葡萄糖,10g蛋白胨,5g牛肉粉,2g磷酸氢二钾,5g乙酸钠,2g柠檬酸三铵,0.2g硫酸镁,0.05g硫酸锰,吐温80 1mL,蒸馏水999mL。

[0036] 1.1.3冷冻干燥保护剂的配制:脱脂乳粉12g、海藻糖6g、蔗糖5g、甘油1.6g、10-羟基-2-癸烯酸0.09g、明胶2g、谷氨酸钠1g、L-半胱氨酸0.12g和硫酸锰0.3g,蒸馏水71.9g。

[0037] 1.1.4添加剂溶液的配制:菊粉5g、燕麦草提取物1.6g、熟鹰嘴豆粉2g、水91.4g。

[0038] 1.1.5 0.2M醋酸盐溶液(pH5.5)的配制:将9.0mL 0.2M醋酸钠溶液与1mL 0.2M醋酸溶液混合均匀。

[0039] 1.1.6壳聚糖溶液的配制:取0.2g壳聚糖溶于90mL蒸馏水,加入0.4mL冰醋酸使其溶解,加蒸馏水定容至100mL,用1mol/L的氢氧化钠调节溶液pH至5.8。

[0040] 1.2菌体收集:将 $-80^\circ C$ 冷冻保藏的植物乳杆菌LP45接种于灭菌后的改良MRS琼脂培养基上 $37^\circ C$ 培养48h,得到活化培养的斜面种子,挑选茁壮的菌落加入到改良MRS液体培养基, $37^\circ C$ 厌氧培养24h,得到一级种子液;将一级种子液按照8%的体积分数接种至改良MRS液体培养基, $37^\circ C$ 厌氧培养24h,得二级种子液;将二级种子液按照8%的体积分数接种至改良MRS液体培养基, $37^\circ C$ 厌氧发酵培养22h,发酵液在 $4^\circ C$ 下4000g离心5min,去上清液,所得菌泥用无菌生理盐水溶液洗涤3次后,离心收集菌体。

[0041] 1.3单层微胶囊的制备:将收集的5g菌体与6mL添加剂溶液、15mL冷冻干燥保护剂混合均匀,加入15g 3wt%海藻酸钠溶液混合均匀后,加入0.11g碳酸钙混合均匀,加入含有1.5v/v%吐温80的大豆油66.5mL,400r/min搅拌乳化15min,加入含有0.5v/v%冰醋酸的大豆油30mL,400r/min搅拌25min,向搅拌后的混合溶液中加入80mL 0.2M醋酸盐溶液(pH5.5),静置2h,离心收集微胶囊,用生理盐水重复洗涤3次,得到单层微胶囊。

[0042] 1.4二次包衣的制备:将得到的单层微胶囊4g置于28mL壳聚糖溶液中,120r/min搅拌15min,静置60min,过滤收集微胶囊,得到植物乳杆菌微胶囊;

1.5冷冻干燥:将制得的植物乳杆菌微胶囊倒入冻干瓶,瓶口密封,在 $-70^\circ C$ 预冻12h,再在真空冷冻干燥机中 $-40^\circ C$ 下干燥18h,得到冻干植物乳杆菌微胶囊。

[0043] 实施例6:

1.1.3冷冻干燥保护剂的配制:脱脂乳粉12g、海藻糖6g、蔗糖5g、甘油1.6g、明胶2g、谷氨酸钠1g、L-半胱氨酸0.12g和硫酸锰0.3g,蒸馏水71.9g。其余部分和实施例5完全一致。

[0044] 实施例7:

1.1.4添加剂溶液的配制:菊粉5g、燕麦草提取物1.6g、熟鹰嘴豆粉1.5g、水91.9g。其余部分和实施例5完全一致。

[0045] 实施例8:

1.1.4添加剂溶液的配制:菊粉5g、燕麦草提取物1.6g、熟鹰嘴豆粉4g、水89.4g。其余部分和实施例5完全一致。

[0046] 实施例9:

1.1.4添加剂溶液的配制:菊粉5g、燕麦草提取物1.6g、水93.4g。其余部分和实施例5完全一致。

[0047] 实施例10:

1.1.4添加剂溶液的配制:菊粉5g、熟鹰嘴豆粉2g、水93g。其余部分和实施例5完全一致。

[0048] 实施例11:

1.1.4添加剂溶液的配制:菊粉5g,水95g。其余部分和实施例5完全一致。

[0049] 试验例1:

植物乳杆菌冻干菌粉的活菌数测定:

1.1活菌计数:采用平板计数法进行活菌计数,即在无菌条件下分别将收集的菌体用无菌水以10倍递增稀释至合适的浓度梯度,取0.1mL合适的浓度梯度的混合培养液接种到MRS固体培养基中,均匀涂布后置于恒温培养箱中37℃培养48h。将菌落数在30-300 cfu/mL之间的平板进行统计并分别计算相同稀释倍数的菌落数,再计算平均值,作为冻干前计数。计算公式:

单位体积中活菌个数(cfu/mL)=相同稀释梯度的平均菌落数×稀释的倍数×5

其中,A取大方格中的总菌数,B为菌液的稀释倍数。

[0050] 1.2冻干菌粉的活菌计数:冷冻干燥结束后,得到菌粉,无菌生理盐水对其进行冻干前的等体积复水,在漩涡震荡仪上充分震荡混合均匀后,按照上述梯度稀释步骤进行冻干菌粉的活菌计数,作为冻干后计数。

[0051] 1.3冻干存活率计算:菌体冻干后,活菌计数。每次试验取3个平行样。

[0052] 冻干存活率(%)= $V_2 \times 100 / V_1$

V_1 -冻干前的活菌数(1mL液体样的活菌数,cfu/mL);

V_2 -冻干后的活菌数(1mL液体样冻干后的活菌数,cfu/mL)。

[0053] 冻干前、冻干后的活菌数以及冻干存活率见表1。

[0054] 表1 冻干前、冻干后的活菌数以及冻干存活率

组别	冻干前活菌数(cfu/mL)	冻干后活菌数(cfu/mL)	冻干存活率(%)
实施例1	$(9 \pm 0.03) \times 10^{11}$	$(6.92 \pm 0.01) \times 10^{11}$	76.9 ± 0.01
实施例2	$(9 \pm 0.03) \times 10^{11}$	$(5.27 \pm 0.14) \times 10^{11}$	58.6 ± 0.08
实施例3	$(9 \pm 0.02) \times 10^{11}$	$(5.34 \pm 0.07) \times 10^{11}$	59.3 ± 0.04
实施例4	$(9 \pm 0.03) \times 10^{11}$	$(5.45 \pm 0.07) \times 10^{11}$	60.6 ± 0.05

由表1可以看出,实施例1中冻干后的菌粉中活菌数和植物乳杆菌的冻干存活率明显高于实施例2、实施例3、实施例4,且实施例2、实施例3、实施例4无明显差别,这说明,10-羟基-2-癸烯酸与甘油质量比为1:15-20时,可能通过增强甘油对水的结晶过程的弱化,更好的保护细胞免受损伤,能够有效提高菌体在冻干过程中的活菌存活率,有利于植物乳杆菌在胃肠道中定植,提高对人体的保健作用。

[0055] 试验例2:

2.1冻干植物乳杆菌微胶囊的活菌数测定:

2.1.1植物乳杆菌活菌数测定:与试验例1中1.1活菌数的测定方法相同。

[0056] 2.1.2冻干植物乳杆菌微胶囊活菌数和包埋率的测定:冷冻干燥结束后,得到冻干植物乳杆菌微胶囊,用电子分析天平准确称重后,无菌生理盐水对其进行冻干前的等体积复水,在漩涡震荡仪上充分震荡混合均匀后,取0.1g微胶囊,置于10倍体积的0.06mol/L的柠檬酸钠溶液中,用漩涡震荡仪将溶液震荡至混合均匀后,转移到恒温摇床中(180r/min, 37℃)震荡使微胶囊充分溶解。从充分溶解后的溶液中吸取1mL进行梯度稀释,按照2.1.1植物乳杆菌活菌数的测定方法测定活菌数,计算微胶囊的包埋率,包埋率的计算公式如下:

包埋率=(微胶囊中的活菌数/加入的活菌数)×100%。

[0057] 冻干植物乳杆菌微胶囊活菌数和包埋率的测定结果见图1。

[0058] 2.2微胶囊在模拟人工胃液中菌体存活率测定

模拟胃液的配制:取0.1mol/L盐酸16.4mL,加蒸馏水稀释,按照每100mL加1.0g胃蛋白酶,混匀,调节pH值至1.2,0.22μm无菌滤膜过滤,现配现用。称取上述实施例制备的冻干植物乳杆菌微胶囊1g置于50mL已预热好的人工胃液的三角瓶中混合均匀,转移至恒温摇床中(180r/min,37℃)震荡,分别在0min、5min、30min、45min和60min取样,采用平板计数法测定活菌数,确定此时微胶囊中菌体的存活率。模拟人工胃液中菌体存活率的测定结果见图2。

[0059] 2.3微胶囊在模拟人工肠液中活菌数的分析

模拟肠液的制备:用电子天平称取磷酸二氢钾6.5g,量筒加入50mL水使其溶解,氢氧化钠溶液(0.1mol/L)将此溶液的pH值调节至7.4,再用水溶解胰蛋白酶10g,将二者混合均匀,过滤后加水定容至1000mL容量瓶中,0.2μm无菌微孔滤膜过滤除菌备用。称取上述实施例制备的冻干植物乳杆菌微胶囊1g置于50mL已预热好的人工肠液的三角瓶中混合均匀,转移至恒温摇床中(180r/min,37℃)震荡,分别在0min、5min、30min、45min和60min取样,按照采用平板计数法测定活菌数。微胶囊在模拟人工肠液中活菌数的测定结果见图3。

[0060] 由图1、图2、图3可以看出实施例5制得的冻干植物乳杆菌微胶囊的包埋率和活菌数明显高于实施例6,在模拟人工胃液中菌体存活率和模拟人工肠液中的活菌数均明显高于实施例6,这说明,10-羟基-2-癸烯酸与甘油质量比为1:15-20时,可能通过增强甘油对水的结晶过程的弱化,更好的保护细胞免受损伤及避免冰晶的形成对微胶囊造成的机械损伤,能够提高包埋率和对胃液的耐受力,使得植物乳杆菌更加快速和高效地在肠道中定植。

[0061] 试验例3:

3.1动物模型的建立:180只SPF C57BL/6N(雄性,6周龄,18-22g)小鼠,适应性喂养1周。设置空白组、生理盐水对照组、治疗组,将180只小鼠随机分为9组,每组20只,其中,治疗组分为实施例5组、实施例6组、实施例7组、实施例8组、实施例9组、实施例10组、实施例11组。空白组和生理盐水对照组均灌服无菌生理盐水0.4mL/只、各治疗组分别灌服各实施例制得的冻干植物乳杆菌微胶囊1.8mg/只,每天灌胃一次,连续灌胃5天后,在第10天除空白组之外,其余各组分别对其进行浓度为7lg cfu/g的大肠杆菌灌胃,每天两次,每次0.4mL,连续灌胃3天。

[0062] 3.2 IgG、IL-6、IL-10含量的检测:在大肠杆菌感染后12d对小鼠进行眼球取血,将取得的血液室温静置20min,3000r/min,离心10min,取上清血清。使用ELISA法按照试剂盒

的说明进行IgG、IL-6、IL-10的含量的检测。IgG、IL-6、IL-10的含量的检测结果见图4。

[0063] 3.3肠粘膜中SIgA含量检测:在大肠杆菌感染后12d,将小鼠在无菌超净工作台内解剖,取得小鼠肠道中的回盲部4cm的肠段,置于事先灭菌过的培养皿中,加入PBS缓冲液,用镊子将小肠PBS中轻轻涮洗,再将此小肠放在一清洁的呈有PBS缓冲液的培养皿中,用手术刀片轻轻的将小肠纵向剖开,用移液器小心的将肠道内的食物残留等冲干净,注意动作要轻缓以免将肠粘膜冲坏,再使用手术刀片轻轻刮取小肠粘膜,将取得的小肠粘膜置于组织研磨器中,加入0.5ml的PBS研磨,将研磨好的肠粘膜匀浆倒入已灭菌的1.5ml的离心管中,在组织研磨器中再加入0.5ml的PBS将剩余的未研磨彻底的肠粘膜组织进行二次研磨彻底,将此研磨液再倒入之前的1.5ml的离心管中,盖好。室温3000r/min离心10分钟,取上清液置于事先灭菌的1.5ml的离心管中,-20℃保存,使用ELISA法按照试剂盒的说明进行肠粘膜中SIgA含量检测。肠粘膜中SIgA含量的检测结果见图5。

[0064] 由图4、图5可以看出,实施例5的IgG、IL-10、肠粘膜中SIgA的含量明显高于实施例6,IL-6的含量明显低于实施例6,这说明,10-羟基-2-癸烯酸与甘油质量比为1:15-20时,能够使得植物乳杆菌更加快速和高效地在肠道中定植,进而提高机体的体液免疫能力,刺激上调抗炎因子的表达,抑制促炎因子的分泌,发挥特异性免疫功能,活化肠粘膜的淋巴细胞,刺激SIgA的分泌,提高肠道粘膜免疫功能。

[0065] 3.4 有机酸水平的测定

3.4.1试剂配制:

精确称取一定质量的3-NPH·HCl,溶解于甲醇中,定容至终浓度为20mM。

[0066] 精确称取一定质量的1-EDC·HCl,溶解于3v/v%吡啶-甲醇溶液中,定容至终浓度为250mM。

[0067] 3.4.2标准曲线制作:乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、正戊酸、异戊酸标准品配成梯度混合溶液,进行HPLC检测,重复测定3次,流动相比比例为甲醇:水=32 : 68;流速1.2mL/min;检测波长230nm;柱温40℃;进样体积30μL;色谱柱XAqua C18 4.6 mm × 250 mm column (ACCHROM, China)。得到各浓度对应的色谱峰面积,以此制作标准曲线,乙酸的标准曲线方程为: $y=62.578x-5.7221$, $R^2=0.9981$;丙酸的标准曲线方程为: $y=131.92x+20.134$, $R^2=0.9976$;正丁酸的标准曲线方程为: $y=186.62x+14.242$, $R^2=0.9985$;异丁酸的标准曲线方程为: $y=220.15x+1.8962$, $R^2=0.9991$;正戊酸的标准曲线方程为: $y=245.46x+1.0587$, $R^2=0.9989$;异戊酸的标准曲线方程为: $y=249.72x+0.1285$, $R^2=0.9996$;

3.4.3样品液的获得和测定:在大肠杆菌感染后12d,取约100mg结肠粪便,置于冰浴,按1:9(w/v)加入超纯水,振荡直至混匀,超声5min,置于冰浴20min,离心(4800g×20min, 4℃)取上清。量取50μL上清液,加入200μL 3-NPH·HCl溶液和100μL 1-EDC·HCl溶液,反复颠倒几次,混合均匀。60℃水浴20min。冷却至室温后,过0.22μm孔径滤膜,HPLC检测。计算对应SCFA峰的峰面积,采用外标法做出标准曲线,测定上清液中乙酸、丙酸、丁酸和戊酸的浓度,并换算出其在粪便样品中的含量,以μmol/g粪便表示。以乙酸、丙酸、丁酸和戊酸之和表示总有机酸含量。有机酸含量的测定结果见图6。

[0068] 3.5肠道氨的测定:

3.5.1试剂配制:

NH₄⁺显色液I:称取苯酚25g,亚硝基铁氰化钠0.125g,分别用超纯水溶解后混合,并定

容至500mL(4℃避光保存,两周内使用);

NH_4^+ 显色液II:称取氢氧化钠6.25g,用超纯水溶解,加入次氯酸钠溶液10mL,补超纯水定容至250mL(4℃避光保存,24h内使用);

NH_4^+ 储备液:将硫酸铵在105℃至恒重,准确称取0.4714g,用超纯水溶解,并定容至1000mL,作为 NH_4^+ 浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储备液(4℃避光保存,两周内使用);

NH_4^+ 工作液:吸取5mL储备液,用超纯水稀释,定容至100mL,即 NH_4^+ 浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准液(4℃避光保存,24h内使用);

NH_4^+ 溶解液:准确称取74.55g氯化钾,用超纯水溶解,并定容至1000mL(浓度为2mol/L,121℃高温灭菌15min,室温保存);

蛋白沉淀液:称取10g三氯乙酸,用超纯水溶解,定容至50mL(质量浓度为20%,4℃避光保存,24h内使用)。

[0069] 3.5.2标准曲线绘制:依次配制8个浓度梯度的氨标准溶液:0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、27.78 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、34.72 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、55.56 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、69.44 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、111.11 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、138.89 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、222.22 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。移取4mL待测液于25mL具塞比色管试管中,依次加入 NH_4^+ 显色液I和 NH_4^+ 显色液II各2.5mL,混匀后置于37℃恒温水浴保温30min后取出,用1cm玻璃比色皿,以0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准样品调零,在分光光度计在630nm下测定吸光值。以吸光值 A_{630} 为纵坐标(经稀释后测得的A值需乘以稀释倍数,得到实际的A值),氨浓度为横坐标绘制标准曲线,标准曲线方程为: $y=0.0136x-0.234$, $R^2=0.9994$ 。

[0070] 3.5.3样品液的获得和测定:在大肠杆菌感染后12d,取约50mg的结肠粪便样品,加入4.3.4.1所述 NH_4^+ 溶解液和蛋白沉淀液各500 μL ,振荡直至混匀,离心(5000g \times 2min)。吸取200 μL 上清液至装有3.8mL超纯水(稀释20倍)的25mL具塞比色管中,作为样品液。对照液(稀释液)的配置:除不加粪便样品外,与样品液相同处理得到,即氯化钾终浓度为0.05mol/L,三氯乙酸质量终浓度为0.5%的水溶液。对照液调零,用分光光度计测定样品液的吸光值。通过标准曲线和测得的 A_{630} ,计算样品液中的氨浓度,根据粪便重量、稀释倍数等换算关系计算粪便样品中的氨浓度,以 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 粪便表示。肠道氨含量的测定结果见图7。

[0071] 由图6、图7可以看出,实施例5的乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、总有机酸的含量均明显高于实施例7、实施例8、实施例9、实施例10、实施例11,肠道氨含量明显低于实施例7、实施例8、实施例9、实施例10、实施例11,这说明,燕麦草提取物和鹰嘴豆质量比为1:1.2-1.8时能够协同促进植物乳杆菌生成有机酸,抑制肠道中有害细菌的生长,同时促进氨的消耗减少氨的产生,降低肠道中氨的含量。

[0072] 3.6肠道菌群检测:

将小鼠进行眼球取血,对放血后的小鼠断颈处理,在无菌超净工作台内解剖小鼠,取盲肠内容物0.1g,放入呈有0.9mL无菌生理盐水的1.5mL的事先灭菌的离心管中,使用漩涡振荡器震荡使粪便与生理盐水混合均匀之后进行10倍梯度系列稀释,使用预实验中确定的稀释倍数的浓度在相应的选择性培养基均匀涂布,对于两种厌氧菌双歧杆菌、乳酸杆菌要快速的进行稀释、涂板的过程,避免厌氧菌在有氧条件下死亡造成实验结果出现偏差。涂布结束后,两种厌氧菌要放在装有厌氧袋的厌氧箱中密封盖好,放入恒温培养箱中37℃培养48小时。需氧菌肠杆菌、肠球菌两种菌,涂布结束后直接放入恒温培养箱中,37℃培养48小时。48小时后按照选择性培养基的使用说明进行菌落计数。感染后6d各实验组小鼠肠道菌

群数量见表2。感染后12d各实验组小鼠肠道菌群数量见表3。

[0073] 表2 感染后6d各实验组小鼠肠道菌群数量(lg cfu/g)

	乳酸杆菌	双歧杆菌	肠杆菌	肠球菌
空白组	8.25±0.17	8.95±0.34	8.36±0.19	8.47±0.33
生理盐水对照组	5.60±0.20	8.18±0.30	9.57±0.17	9.78±0.20
实施例5	10.21±0.15	10.15±0.22	7.81±0.21	7.43±0.17
实施例6	8.09±0.11	9.08±0.17	8.67±0.18	7.92±0.22
实施例7	8.18±0.15	8.86±0.13	8.32±0.17	7.75±0.19
实施例8	8.16±0.14	8.85±0.11	8.33±0.17	7.76±0.16
实施例9	8.16±0.09	8.83±0.14	8.33±0.16	7.78±0.15
实施例10	8.15±0.12	8.85±0.16	8.34±0.14	7.78±0.18
实施例11	8.13±0.11	8.82±0.15	8.36±0.09	7.77±0.13

表3 感染后12d各实验组小鼠肠道菌群数量(lg cfu/g)

	乳酸杆菌	双歧杆菌	肠杆菌	肠球菌
空白组	8.23±0.14	8.97±0.35	8.27±0.15	8.65±0.34
生理盐水对照组	5.66±0.19	6.65±0.28	9.73±0.17	9.74±0.23
实施例5	9.33±0.10	9.19±0.22	7.65±0.23	7.62±0.19
实施例6	8.04±0.13	8.60±0.19	8.75±0.17	7.99±0.20
实施例7	8.17±0.11	8.48±0.15	8.87±0.14	7.82±0.17
实施例8	8.15±0.12	8.46±0.18	8.89±0.18	7.83±0.15
实施例9	8.14±0.08	8.46±0.16	8.90±0.16	7.85±0.18
实施例10	8.13±0.14	8.45±0.17	8.89±0.11	7.84±0.19
实施例11	8.11±0.09	8.45±0.14	8.92±0.06	7.86±0.21

由表2、表3可以看出,感染后6d和12d,实施例5均能够使得肠道内乳酸杆菌、双歧杆菌的含量均达到正常水平并且能够有效的提高乳酸杆菌和双歧杆菌的含量,有效抑制条件致病菌肠杆菌、肠球菌在感染后的增加并能够明显降低其含量,感染后6d,实施例6能够提高乳酸杆菌和双歧杆菌的含量,但乳酸杆菌含量仍低于正常水平,能够抑制条件致病菌肠杆菌、肠球菌在感染后的增加,但肠杆菌的含量仍高于正常水平,感染后12d,实施例6的双歧杆菌的含量有所降低且于正常水平,条件致病菌肠杆菌有所上升且高于正常水平,可以看出实施例5对大肠杆菌引起的肠道菌群失调有着更好的预防效果,能够维持肠道菌群平衡且持久,这说明,10-羟基-2-癸烯酸与甘油质量比为1:15-20时,能够使得植物乳杆菌更加快速和高效地在肠道中定植,增强机体的免疫功能,进而能够更有效且持久地调整菌群平衡。

[0074] 由表2、表3可以看出,感染后6d和12d,实施例5均能够使得肠道内乳酸杆菌、双歧杆菌的含量均达到正常水平并且能够有效的提高乳酸杆菌和双歧杆菌的含量,有效抑制条件致病菌肠杆菌、肠球菌在感染后的增加并能够明显降低其含量,感染后6d,实施例7、实施例8、实施例9、实施例10、实施例11能够提高乳酸杆菌和双歧杆菌的含量接近正常水平,能够抑制条件致病菌肠杆菌、肠球菌在感染后的增加,感染后12d,实施例7、实施例8、实施例9、实施例10、实施例11的双歧杆菌的含量有所降低低于正常水平,条件致病菌肠杆菌有所

上升且高于正常水平,可以看出实施例5对大肠杆菌引起的肠道菌群失调有着更好的预防效果,能够维持肠道菌群平衡且持久,这说明,燕麦草提取物和鹰嘴豆质量比为1:1.2-1.8时能够抑制肠道中有害细菌的生长,降低肠道氨含量,修复肠道粘膜损伤,进而能够更有效且持久地调整菌群平衡。

[0075] 在一种具体的实施例中,本发明实施例的植物乳杆菌LP45(YMC1005或L45)也可以是从内蒙古乌兰察布市四子王旗乌兰哈达苏木站乌兰哈达嘎查的传统酸奶酪中分离筛选获得,具体分离鉴定步骤如下:

将内蒙古四子王旗酸奶酪样品溶解于灭菌生理盐水试管中,充分震荡混匀,混匀后使用接菌环蘸取混合液体并于MRS平板上划线培养(37℃ 72h),分离菌株。用接菌环从第一代平板挑取单菌落,在新MRS平板上划线培养(37℃ 72h),进行纯化。同样方法再纯化2次,使最终平板上为同一形态菌落为止。挑取单菌落接菌于MRS液体培养基中37℃培养18h,以备保藏和鉴定使用。

[0076] 将液体培养基菌悬液收集至灭菌离心管中,清洗离心2次,进行基因组DNA的提取,提取完毕后,利用通用引物27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',1495r:5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'进行16SrDNA的PCR实验,完成PCR后将最终PCR产物进行测序,并将测序结果与Gene Bank中相关序列进行比较,比较结果显示LP45(YMC1005或L45)属于植物乳杆菌。

[0077] 将LP45(YMC1005或L45)及ATCC14917(植物乳杆菌)菌株的纯培养液进行清洗离心,将获得的菌体进行基因组DNA的提取,提取完毕后,利用随机引物5'-GACGGATCAG-3'进行RAPD实验,将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,并进行凝胶成像,对比两株植物乳杆菌的电泳条带,结果显示,植物乳杆菌LP45(YMC1005或L45)与植物乳杆菌ATCC14917属于同一种属的不同菌株,结果见附图1。将植物乳杆菌LP45(YMC1005或L45)于2013年8月26日保藏于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,保藏号为:CGMCC No.8072。

[0078] 上述实施例中的常规技术为本领域技术人员所知晓的现有技术,故在此不再详细赘述。

[0079] 以上实施方式仅用于说明本发明,而并非对本发明的限制,本领域的普通技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,还可以做出各种变化和变型。因此,所有等同的技术方案也属于本发明的范畴,本发明的专利保护范围应由权利要求限定。

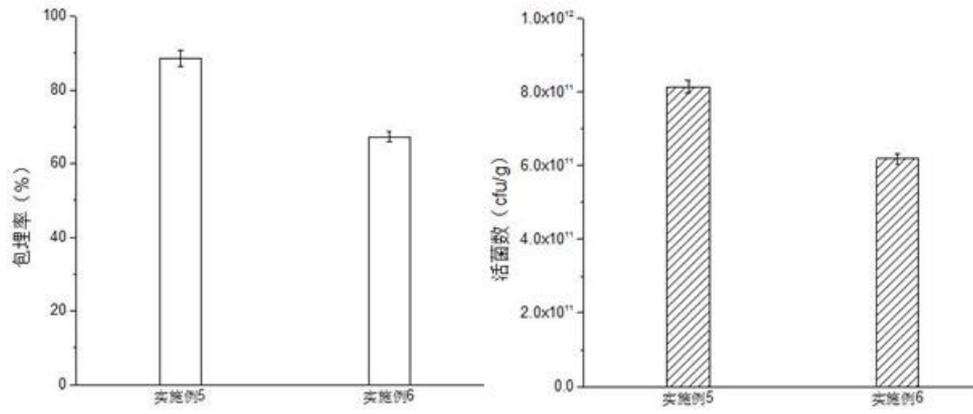


图1

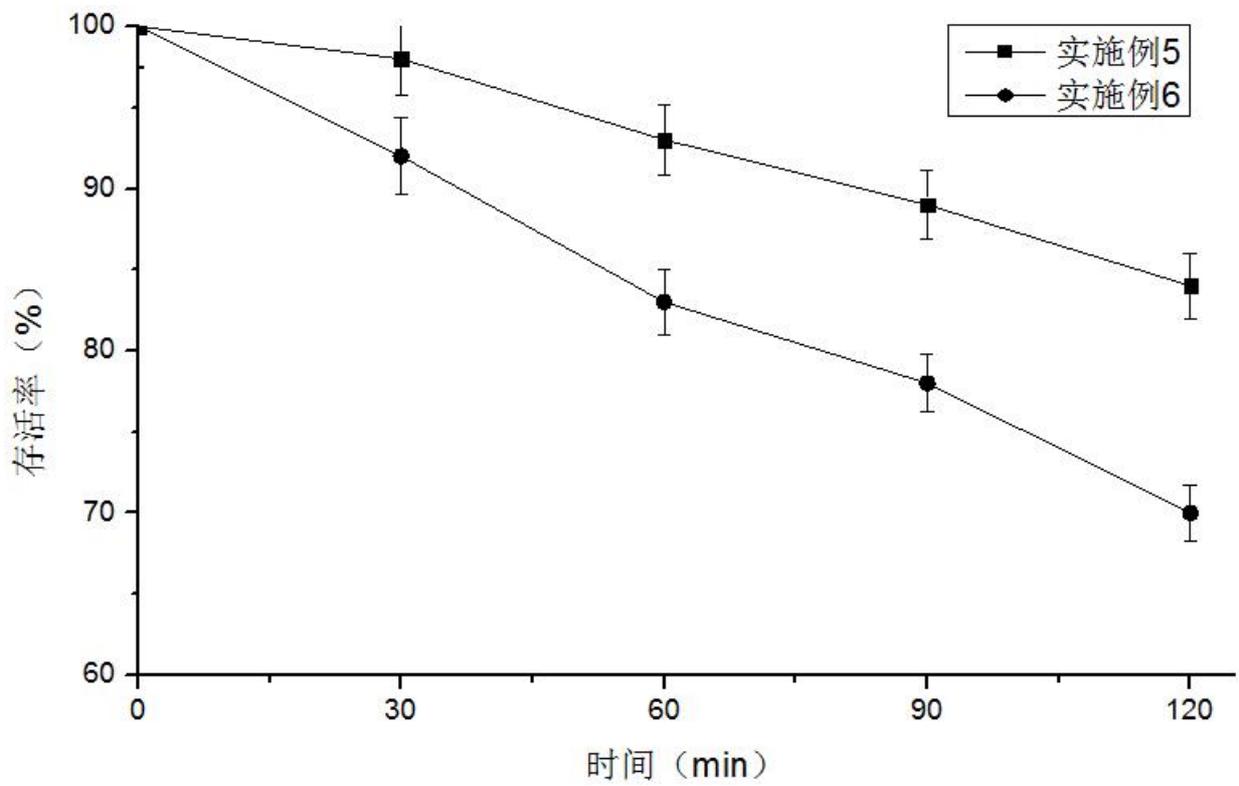


图2

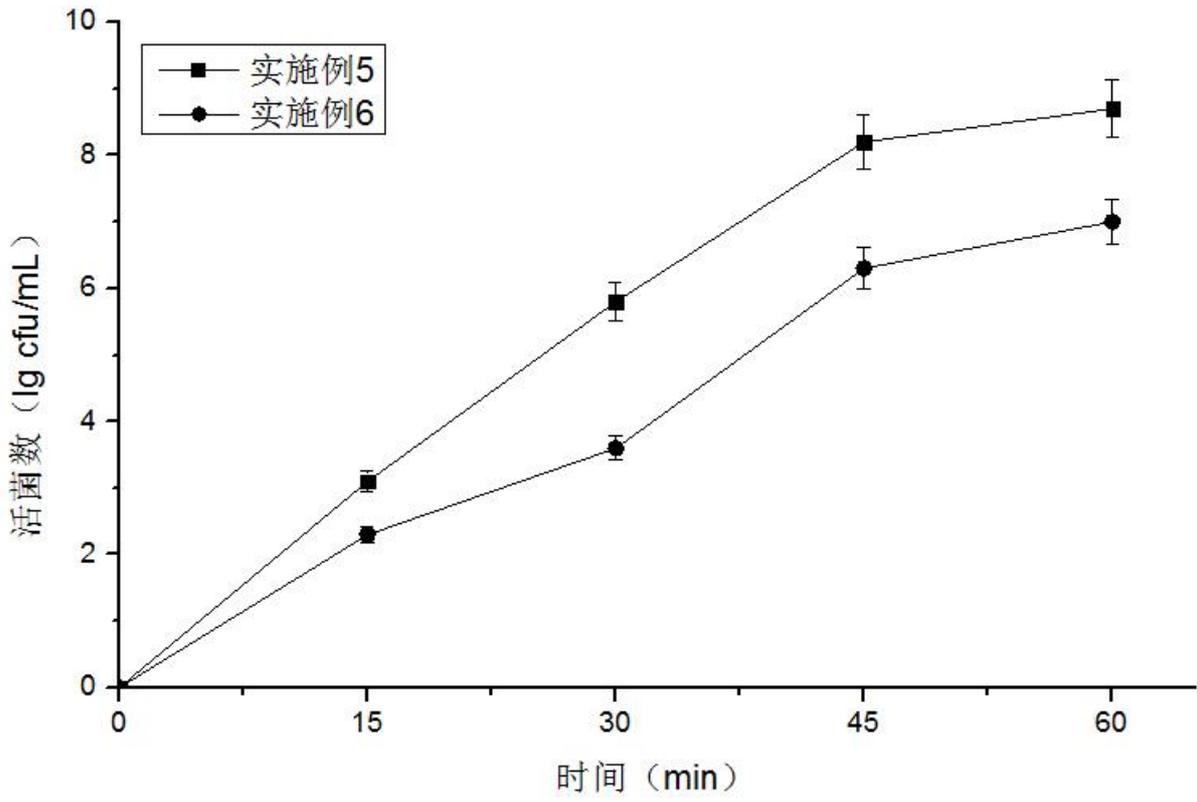


图3

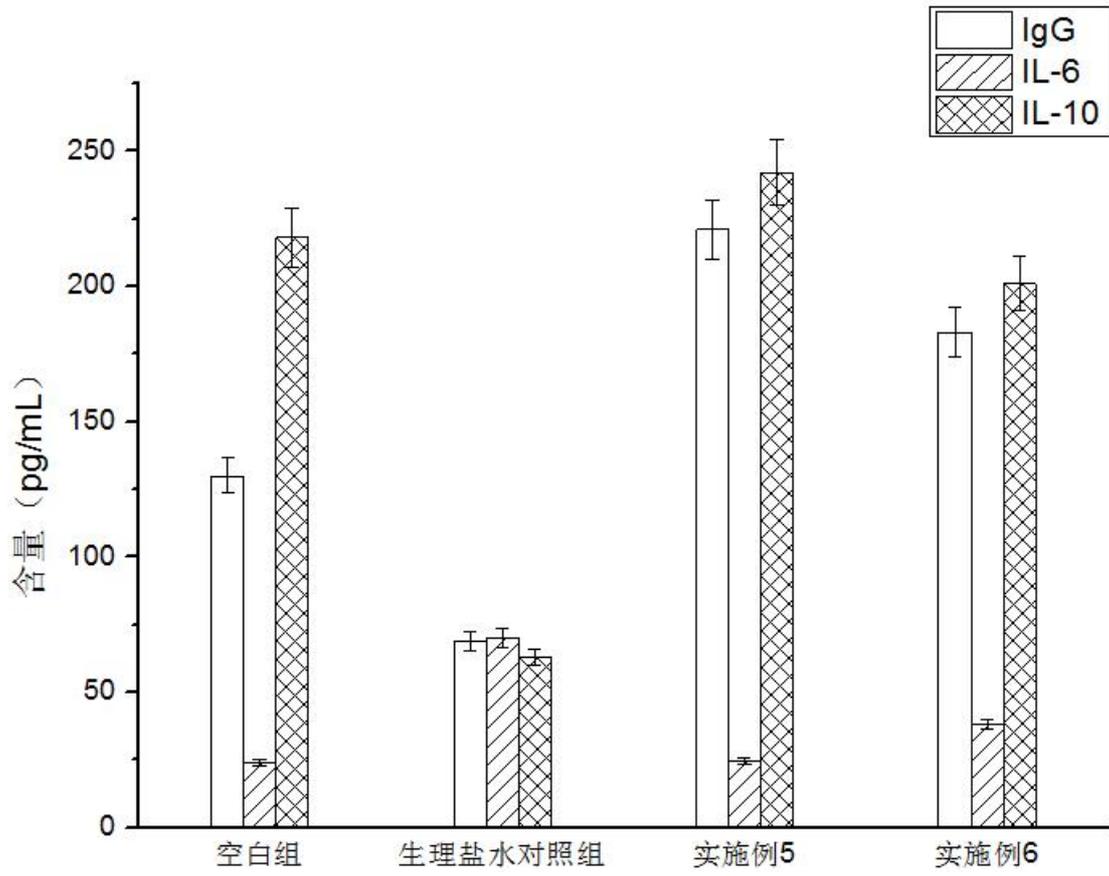


图4

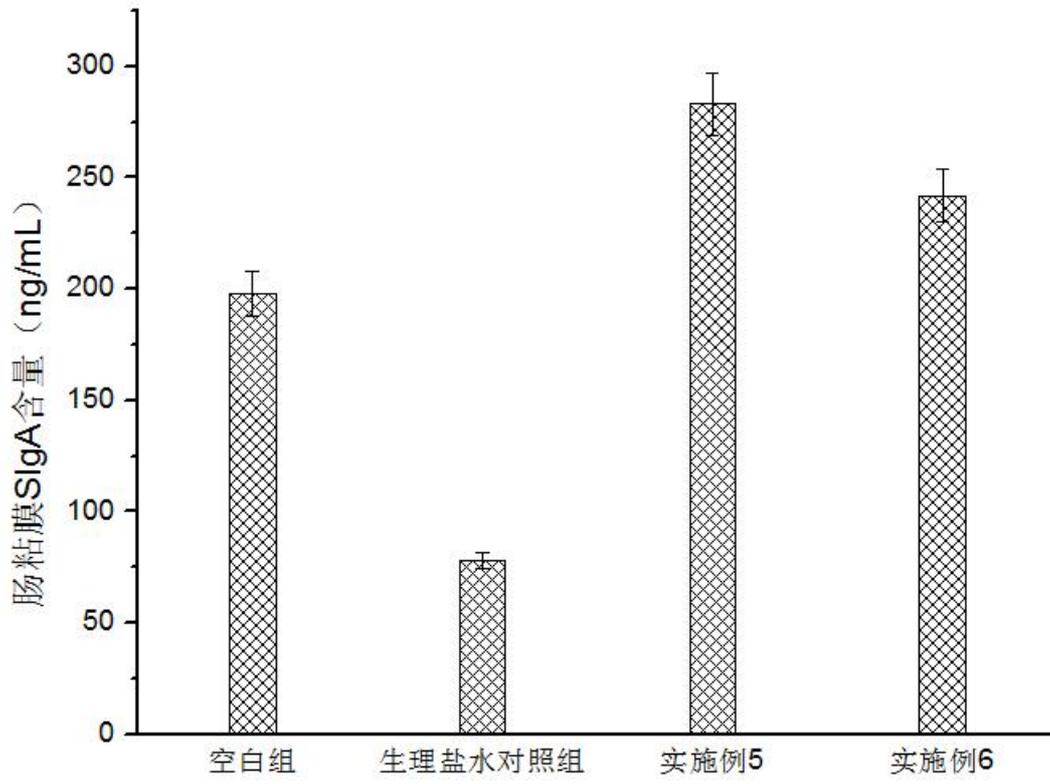


图5

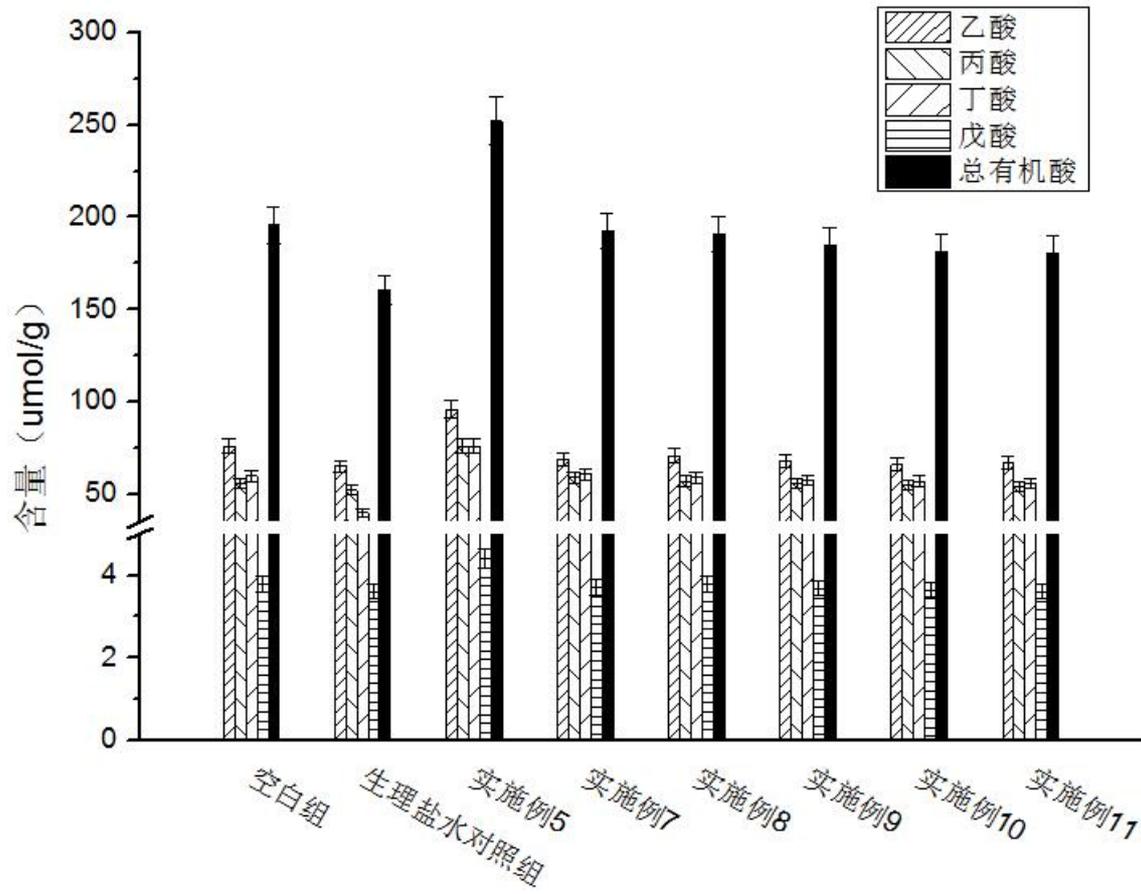


图6

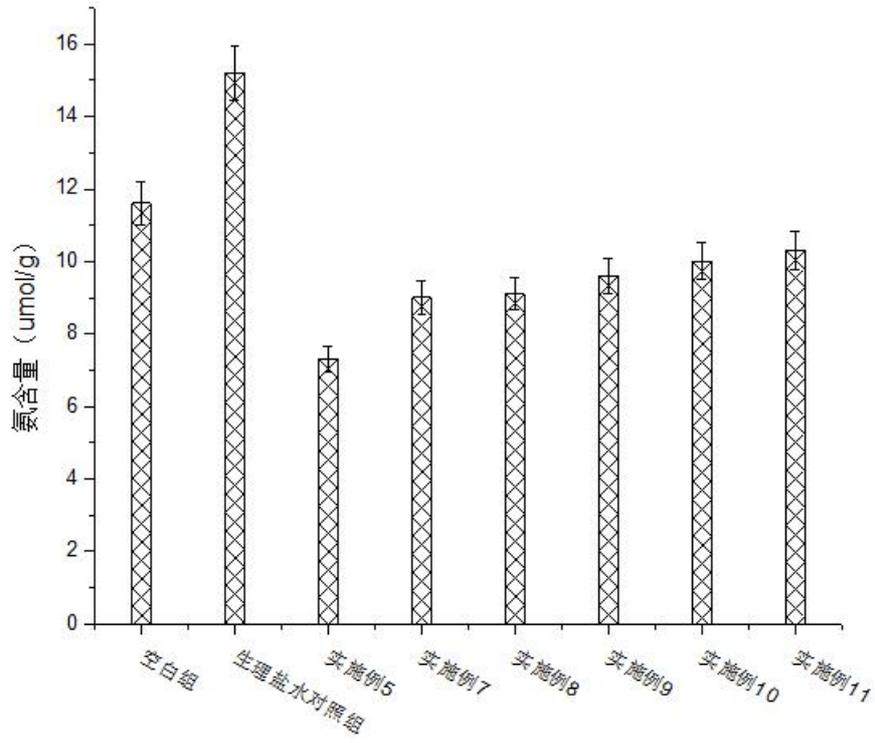


图7