



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102618456 A

(43) 申请公布日 2012.08.01

(21) 申请号 201210046322.0 *A23C 9/18* (2006.01)  
(22) 申请日 2012.02.28 *A23C 9/127* (2006.01)  
(83) 生物保藏信息 *C12R 1/225* (2006.01)  
CGMCC NO. 5496 2011.11.29

(71) 申请人 江南大学  
地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号

(72) 发明人 陈卫 田丰伟 黄文利 赵建新  
张灏 王刚 张秋香 刘小鸣  
范大明 迟菲菲

(74) 专利代理机构 北京君智知识产权代理事务  
所 11305  
代理人 向华

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*A23C 9/123* (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种能够缓解慢性酒精性肝损伤的鼠李糖乳杆菌及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种能够抗氧化、缓解慢性酒精性肝损伤的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107, 还涉及所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在使用其工作发酵剂制备乳制品中的用途。所述的乳制品是含有本发明鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳、乳粉、乳胶囊制品或发酵乳。本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 具有很高的抗氧化能力、二苯基苦基苯肼 (DPPH) 自由基与羟自由基的清除能力、抑制脂质过氧化能力、耐受胆盐、氯化钠和 pH 的能力。本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 能改善酒精性肝损伤小鼠肝功能、抗氧化指标、降低血清内毒素水平及调节肠道菌群分布, 可以有效地缓解酒精性肝损伤。

1. 一种鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)CCFM1107, 该菌菌株已于 2011 年 11 月 29 日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, 其保藏号为 CGMCC5496。

2. 根据权利要求 1 所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在使用鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂制备乳制品中的用途。

3. 根据权利要求 2 所述的用途, 其特征在于所述的乳制品是含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳、乳粉、乳胶囊制品或发酵乳。

4. 根据权利要求 2 所述的用途, 其特征在于所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂是按照下述制备方法制备的:

将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 菌种按照以脱脂乳重量计 12% 接种于在温度 110℃ 下灭菌 10min 的脱脂乳中, 然后在温度 37℃ 的条件下培养 14-16h 至凝乳, 连续在相同的条件下培养活化两代, 得到的发酵脱脂乳作为母发酵剂;

将所述的母发酵剂按照以灭菌脱脂乳体积计 3-5% 接种于在温度 110℃ 下灭菌 10min 的脱脂乳中, 然后在温度 37℃ 的条件下培养 14-16h 至凝乳, 得到所述的工作发酵剂, 该工作发酵剂的活菌浓度是  $1-3 \times 10^9$  cfu/mL。

5. 根据权利要求 2 所述的用途, 其特征在于所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂是按照下述制备方法制备的:

将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 菌种按照以 MRS 液体培养基重量计 1-5% 接种于 MRS 液体培养基中, 在温度 37℃ 条件下培养 12-16h 进行活化, 连续在相同的条件下培养活化两代, 然后将活化培养物按照以 MRS 液体培养基体积计 2-4% 接种于 MRS 培养基中, 然后在温度 37℃ 的条件下培养 16-18h, 再在温度 4℃ 条件下以 4000r/min 离心 15min, 去除上清液, 得到的细胞沉淀用无菌脱脂乳悬浮, 得到所述的工作发酵剂, 该工作发酵剂的活菌浓度是  $1-3 \times 10^9$  cfu/mL。

6. 根据权利要求 3 所述的用途, 其特征在于含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳是按照下述步骤制备得到的:

原料乳在温度 95℃ 下加热杀菌 20min 或在温度 140℃ 下高温热杀菌 2s, 然后冷却到温度 4℃, 再加入根据权利要求 4 或 5 所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂, 使其浓度达到  $10^6$  cfu/mL 以上, 在 4℃ 冷藏保存, 得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳。

7. 根据权利要求 3 所述的用途, 其特征在于含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳粉或乳胶囊制品是按照下述步骤制备得到的:

原料乳在温度 95℃ 下加热杀菌 20min 或在 140℃ 下高温热杀菌 2s, 得到的灭菌原料乳再冷却到 37℃, 再按照以原料乳体积计 4% 接种根据权利要求 4 或 5 所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂, 然后在温度 37℃ 的条件下发酵 16h, 得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳; 接着, 含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳按照其与上述灭菌原料乳的体积比 1 : 3 加到所述灭菌原料乳中, 进行均质, 真空浓缩、喷雾干燥得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳粉;

把所述的含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳粉装入胶囊, 制成乳胶囊制品。

8. 根据权利要求 3 所述的用途, 其特征在于含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳是按照下述步骤制备得到的:

原料乳在温度 95℃ 下加热杀菌 20min 或在 140℃ 下高温热杀菌 2s, 得到的灭菌原料乳再冷却到 37℃, 再加入以原料乳体积计 3-5% 根据权利要求 4 或 5 所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂与 3-5% 可制备发酵乳的商品发酵剂, 混匀后在温度 37℃ 的条件下混菌发酵至滴定酸度以乳酸计 0.6-0.7%, 然后冷却至温度 4℃, 再进行冷藏保存, 得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳。

9. 根据权利要求 8 所述的用途, 其特征在于所述的商品发酵剂是保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌。

10. 根据权利要求 6、7 或 8 中任一项权利要求所述的用途, 其特征在于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, 所述的奶是牛奶、羊奶或马奶。

## 一种能够缓解慢性酒精性肝损伤的鼠李糖乳杆菌及其用途

### 【技术领域】

[0001] 本发明属于微生物技术领域。更具体地,本发明涉及一种能够缓解慢性酒精性肝损伤的鼠李糖乳杆菌,本发明还涉及所述鼠李糖乳杆菌的用途。

### 【背景技术】

[0002] 酒精滥用和酒精依赖已成为当今世界日益严重的公共卫生问题,在我国酒精所致的肝损伤呈逐年上升趋势,酒精已成为继病毒性肝炎后导致肝损伤的第二大病因。酒精对肝脏的损伤主要包括酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化。酒精性肝损伤还会导致其它危害,例如致使肝脏无法完全过滤血液,会引发高血脂、心脑血管病;肝脏分解代谢能力降低,并发糖尿病、胆石症、肾病;引发急性妊娠性脂肪肝以及对机体消化系统的损伤等。因此,探寻酒精性肝病的发病机制和防治干预措施将具有十分重要的意义。

[0003] 目前人们认为,酒精性肝损伤的主要原因是乙醇在肝细胞内代谢时产生的毒性代谢产物以及由此引起的代谢紊乱。酒精性肝损伤原因具体地是:1、乙醛的毒性作用:乙醛通过与半胱氨酸、谷胱甘肽及维生素E的相互作用促进脂质过氧化;乙醛与肝脏内多种蛋白结合,作为抗原,刺激机体产生抗体,引起相应的免疫应答,导致肝细胞损伤;乙醛还可以与酶的重要功能基团结合,导致酶的活性改变,从而影响酶的功能。2、自由基的损害作用:乙醇在代谢过程中可以产生大量的自由基和活性氧,自由基能够直接损伤肝细胞,还会通过增加肝细胞对脂质过氧化的敏感性,引起肝细胞损伤。3、内毒素的诱导作用:乙醇的摄入使得肠道菌群紊乱,同时,破坏肠道粘膜结构和功能的完整性,增加肠粘膜的渗透性,引起血液中内毒素含量增加,而内毒素则会诱导多种细胞因子的产生,通过炎症因子造成对肝细胞的损伤。目前针对酒精性肝损伤的成因主要治疗方法有戒酒、营养治疗、药物治疗、基因治疗,与酒精性肝病相关疾病的治疗等方法。目前最常用的方法为药物治疗,它虽有一定的疗效但也存在着很多不足,例如许多药物可能驱使血脂更集中于肝脏代谢,这样反而促使脂质蓄积并损害肝功能;并且这些药物均在肝脏中代谢,有可能进一步加重肝脏的负担;还有一些药物见效慢、不良反应严重,甚至会产生耐药性和毒副作用。所以,研究人员正在积极探索酒精性肝病的新型治疗与干预方案,而益生菌由于不会产生耐药性和毒副作用,并且已广泛应用于改善人类健康,尤其是对酒精性肝病的防治具有一定针对性(见附图5所示),于是逐渐引起了人们的关注。

[0004] 益生菌是指在其摄入一定数量后,能够促进动物或人体原生微生物菌群生长而对宿主产生有益影响的活性微生物。所述的益生菌主要包括乳杆菌,双歧杆菌和部分链球菌等;它们一般具备特殊的生理活性和保健功能,例如调节宿主的肠道菌群,治疗由抗生素引起的腹泻,降低血脂胆固醇水平,抑制大肠杆菌、幽门螺杆菌等有害菌的感染等。此外,益生菌能够有效清除自由基,提高机体的抗氧化活性;能够调节肠道菌群,降低内毒素含量;同时,益生菌还能够调节机体的免疫系统。益生菌的这些功能为人们提示,其对于缓解酒精性肝损伤能够发挥一定的作用。而目前有关益生菌保肝护肝方面的报道相对较少,因此,探索

利用益生菌作为食疗性的保健食品来缓解酒精性肝损伤具有重要的研究意义,随着人们对酒精性肝损伤的日益重视以及益生菌的不断推广应用,利用益生菌及其产品对酒精性肝病进行膳食干预将具有极为广阔的市场前景。

[0005] 在目前已公开的专利申请中,针对酒精性肝损伤的预防和治疗主要集中于中药组合物。例如 CN 101224232A 公开了从中药葛根的根中提取得到葛根总黄酮,能够抑制小肠通透性的增加,降低血液中酒精浓度,减轻酒精吸收以及由酒精引起的肝脏损害。CN 101961367A 公开了一种预防酒精性肝损伤的中药组合物,由真菌多糖成分与水飞蓟水提取物组成,其溶解性好,在胃肠道中崩解快,吸收好,可增强免疫力并对酒精性肝损伤起辅助保护的作用。还有 CN 102058632A 和 CN 102160637A 等也分别公开了中草药及其提取物对酒精性肝损伤的保护作用。涉及到乳制品,例如 CN101623032A 公开了一种对酒精性肝损伤有辅助保护作用的牛奶,其中添加了水溶性膳食纤维、卵磷脂和大豆多肽等,这种牛奶可以增强肝脏机能,加快酒精代谢,缓解酒精性肝损伤。CN 101328469A 公开了一种具有酒精性肝损伤保护功能的嗜热链球菌 grx02,并证明了其对急性酒精性肝损伤可以发挥不同程度的保护特性。但是,这些专利没有完全涉及一种可以调节肠道菌群、缓解慢性酒精性肝损伤的益生乳杆菌。

[0006] 因此,目前还需要有一种能够调节肠道菌群、缓解慢性酒精性肝损伤的益生菌及其相关食品。

## 【发明内容】

[0007] [要解决的技术问题]

[0008] 本发明的目的是提供一种能够抗氧化、缓解慢性酒精性肝损伤的鼠李糖乳杆菌。

[0009] 本发明的另一个目的是提供所述的鼠李糖乳杆菌的用途。

[0010] [技术方案]

[0011] 本发明是通过下述技术方案实现的。

[0012] 本发明涉及一种鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) CCFM1107,该菌株已于 2011 年 11 月 29 日在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,其保藏号为 CGMCC No. 5496。

[0013] 本发明还涉及所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在使用所述鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂制备乳制品中的用途。

[0014] 根据本发明,所述的乳制品是含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳、乳粉、乳胶囊制品或发酵乳。

[0015] 根据本发明的一种优选实施方式,所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂是按照下述制备方法制备的:

[0016] 将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 菌种按照以脱脂乳重量计 12%接种于在温度 110℃下灭菌 10min 的脱脂乳中,然后在温度 37℃的条件下培养 14-16h 至凝乳,连续在相同的条件下培养活化两代,得到的发酵脱脂乳作为母发酵剂;

[0017] 将所述的母发酵剂按照以灭菌脱脂乳体积计 3-5%接种于在温度 110℃下灭菌 10min 的脱脂乳中,然后在温度 37℃的条件下培养 14-16h 至凝乳,得到所述的工作发酵

剂,该工作发酵剂的活菌数浓度是  $1-3 \times 10^9$ cfu/mL。

[0018] 根据本发明的另一种优选实施方式,所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂是按照下述制备方法制备的:

[0019] 将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 菌种按照以 MRS 液体培养基重量计 1-5% 接种于 MRS 液体培养基中,在温度 37℃ 条件下培养 12-16h 进行活化,连续在相同的条件下培养活化两代,然后将活化培养物按照以 MRS 液体培养基体积计 2-4% 接种于 MRS 培养基中,在温度 37℃ 条件下培养 16-18h,再在温度 4℃ 条件下以 4000r/min 离心 15min,去除上清液,得到的细胞沉淀用无菌脱脂乳悬浮,得到所述的工作发酵剂,该工作发酵剂的活菌浓度是  $1-3 \times 10^9$ cfu/mL。

[0020] 根据本发明的另一种优选实施方式,含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳是按照下述步骤制备得到的:

[0021] 原料乳在温度 95℃ 下加热杀菌 20min 或在温度 140℃ 下高温热杀菌 2s,然后冷却到温度 4℃,再加入所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂,使其浓度达到  $10^6$ cfu/mL 以上,在 4℃ 冷藏保存,得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳。

[0022] 根据本发明的另一种优选实施方式,含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳粉或乳胶囊制品是按照下述步骤制备得到的:

[0023] 原料乳在温度 95℃ 下加热杀菌 20min 或在 140℃ 下高温热杀菌 2s,得到的灭菌原料乳再冷却到 37℃,再按照以原料乳体积计 4% 接种所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂,然后在温度 37℃ 的条件下发酵 16h,得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳;接着,含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳按照其与上述灭菌原料乳的体积比 1:3 加到所述灭菌原料乳中,进行均质,真空浓缩、喷雾干燥得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳粉;

[0024] 把所述的含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳粉装入胶囊,制成乳胶囊制品。

[0025] 根据本发明的另一种优选实施方式,含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳是按照下述步骤制备得到的:

[0026] 原料乳在温度 95℃ 下加热杀菌 20min 或在 140℃ 下高温热杀菌 2s,得到的灭菌原料乳再冷却到 37℃,再加入以原料乳体积计 3-5% 所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂与 3-5% 可制备发酵乳的商品发酵剂,混匀后在温度 37℃ 的条件下混菌发酵至滴定酸度以乳酸计 0.6-0.7%,然后冷却至温度 4℃,再进行冷藏保存得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳。

[0027] 根据本发明的另一种优选实施方式,所述的商品发酵剂是保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌。

[0028] 根据本发明的另一种优选实施方式,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,所述的奶是牛奶、羊奶或马奶。

[0029] 下面将更详细地描述本发明。

[0030] 本发明涉及一种鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) CCFM1107,该菌株已于 2011 年 11 月 29 日在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,其保藏号为 CGMCC No. 5496。

[0031] 本发明人从实验室分离保藏的菌种中筛选出一株益生菌 CCFM1107,利用形态特征、培养性状等微生物学特性,以及 16S rDNA 序列测定的分子鉴定手段对该益生菌

CCFM1107 鉴定为鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) CCFM1107。该菌株已于 2011 年 11 月 29 日在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,其保藏号为 CGMCC No. 5496。

[0032] 所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的形态学特征如下:

[0033] 菌落特征:在 MRS 培养基上形成明显的菌落,直径在 0.5-1.0mm 之间,圆形,边缘整齐,乳白色,透明,表面湿润光滑,不产生色素,参见附图 1。

[0034] 菌体特征:呈革兰氏染色阳性,细胞杆状,菌体成单、成对或者成链,不形成芽孢,两端圆形,参见附图 2。

[0035] 本发明鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的培养特征如下:

[0036] 本发明鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 延滞期相对较短,在 4h 就进入对数生长期,在 14h ~ 16h 达到稳定期,在 24h 后逐渐衰亡,细胞数目开始降低。

[0037] 本发明鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的液体培养特征:

[0038] 鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在 MRS 液体培养基中生长良好,在培养约 4h,其培养液开始混浊,在培养约 8h 开始有菌体细胞沉淀,轻轻摇动没有气泡产生,在培养 12h 后有大量菌体沉淀,培养 20h 后乳白色菌体沉淀明显增加,且菌体较为牢固地聚集在培养底部,上层培养液非常澄清,pH 值由最初的 6.2 降到 3.8。

[0039] 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 BD Difco 公司以商品名 **Bacto®** Lactobacilli MRS Broth 销售的用于乳杆菌培养的培养基,也可以是国内有关公司生产的相同的商品化培养基。

[0040] 本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 来源于传统发酵食品,根据卫生部可食用菌种名单属公认安全 (Generally Recognized As Safe, GRAS) 菌种,可用于发酵食品中。

[0041] 本发明还涉及所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在使用所述鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂制备乳制品中的用途。

[0042] 所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂是按照下述制备方法制备的:

[0043] 一般地,首先需要对鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 纯培养物进行反复接种,以恢复其菌株的活力。取少量纯培养物接种至在温度 110°C 下灭菌 10min 的脱脂乳中,在温度 37°C 的条件下进行培养。最初数小时慢慢地加以振荡,使菌种与脱脂乳混合均匀,然后静置培养直至凝固。凝固后,用灭菌吸管从底部吸取 1-2mL 凝乳培养物,在无菌条件下加到灭菌脱脂乳中进行培养至凝乳。按照这种方法反复进行数次,使菌种充分活化,这样用于制备母发酵剂。

[0044] 然后,将经过如此复壮的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 菌种按照以脱脂乳重量计 12% 接种于在温度 110°C 下灭菌 10min 的脱脂乳中,然后在温度 37°C 的条件下培养 14-16h 至凝乳,连续在相同的条件下培养活化两代,得到的发酵脱脂乳作为母发酵剂。

[0045] 所述的加热杀菌是例如使用英国斯必克 APV 公司销售的 145C 型杀菌机进行的。

[0046] 脱脂乳是一种本技术领域里人们熟知的乳品。将原料乳经过验收、过滤后,预热至 38°C 左右,利用离心分离机,例如瑞典阿法-拉伐 (Alfa-Laval) 公司制造的封闭式离心分离机便可以将原料乳分成稀奶油和脱脂乳两部分,通过这种方法便可以得到所述的脱脂乳。

[0047] 将所述的母发酵剂按照以灭菌乳体积计 3-5% 接种于在温度 110°C 下灭菌 10min 的脱脂乳中,然后在温度 37°C 的条件下培养 14-16h 至凝乳,得到所述的工作发酵剂,该工

作发酵剂的活菌浓度是  $1-3 \times 10^9$  cfu/mL。

[0048] 工作发酵剂质量优劣直接影响所生产的发酵乳制品的质量。因此,需要对工作发酵剂进行感官检查,判断工作发酵剂是否凝固均匀,组织细腻、致密,是否有弹性,是否有酸味和芳香味,无异味,无气泡;还需要进行化学检查,测定其酸度,其滴定酸度一般是  $90-110^\circ \text{T}$ ;采用本技术领域里的常规方法(参见 GB 4789.2-2010,食品安全国家标准,中华人民共和国卫生部)测定细菌总菌数,测定鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 活菌浓度应该达到  $1-3 \times 10^9$  cfu/mL。

[0049] 或者,所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂是按照下述制备方法制备的:

[0050] 将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 菌种按照以 MRS 液体培养基重量计 1-5% 接种于 MRS 液体培养基中,然后在温度  $37^\circ \text{C}$  的条件下培养 12-16h 进行活化,连续在相同的条件下培养活化两代,然后将活化培养物按照以 MRS 液体培养基体积计 2-4% 接种于 MRS 培养基中,然后在温度  $37^\circ \text{C}$  的条件下培养 16-18h,再在温度  $4^\circ \text{C}$  条件下以 4000r/min 离心 15min,去除上清液,得到的细胞沉淀用无菌脱脂乳悬浮,得到所述的工作发酵剂,该工作发酵剂的活菌浓度是  $1-3 \times 10^9$  cfu/mL。

[0051] 在本发明中,所述的乳制品是含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳、乳粉、胶囊制品或发酵乳。

[0052] 根据本发明,含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳是按照下述步骤制备得到的:

[0053] 原料乳在温度  $95^\circ \text{C}$  下加热杀菌 20min 或在温度  $140^\circ \text{C}$  下高温热杀菌 2s,然后冷却到温度  $4^\circ \text{C}$ ,再加入所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂,使其浓度达到  $10^6$  cfu/mL 以上,在  $4^\circ \text{C}$  冷藏保存即得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳。

[0054] 在本发明中,加热杀菌设备是本技术领域里通常使用的市场上广泛销售的设备。所述的加热杀菌是例如使用英国斯必克 APV 公司销售的 145C 型杀菌机进行的。

[0055] 所述的高温热杀菌是例如使用日本 Powerpoint International 有限公司销售的 PT-20C-R 型管板式组合式超高温杀菌机进行的。

[0056] 含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳还可以在其中添加在本技术领域里通常使用的砂糖、稳定剂、香精、色素、果汁等辅料。

[0057] 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,所述的奶是牛奶、羊奶或马奶。例如脱脂奶是脱脂牛奶、脱脂羊奶或脱脂马奶;鲜奶是鲜牛奶、鲜羊奶或鲜马奶。所述的复原奶应该理解是一种用浓缩全脂乳或 / 和全脂乳粉与水勾兑而成的原料乳。

[0058] 根据本发明,含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的的乳粉或胶囊制品是按照下述步骤制备得到的:

[0059] 原料乳在温度  $95^\circ \text{C}$  下加热杀菌 20min 或在  $140^\circ \text{C}$  下高温热杀菌 2s,得到的灭菌原料乳再冷却到  $37^\circ \text{C}$ ,再按照以原料乳体积计 4% 接种上述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂,然后在温度  $37^\circ \text{C}$  的条件下发酵 16h,得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳;接着,含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳按照其与上述灭菌原料乳的体积比 1:3 加到所述灭菌原料乳中,进行均质,真空浓缩、喷雾干燥得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳粉。

[0060] 所述的均质是一项在食品生产中经常采用的技术。食品加工中的均质就是指物料的料液在挤压、强冲击与失压膨胀三重作用下使物料细化,从而使物料能更均匀的相互混



合,比如奶制品加工中使用均质机使牛奶中的脂肪球破碎更细小,从而使整个产品体系更加稳定。均质主要通过均质机来进行的。均质机是食品、乳品行业的重要加工设备,本发明使用的均质机是目前市场上销售的产品,例如上海东华高压均质机厂销售的 GYB40-10S 型高压均质机。

[0061] 根据本发明,所述的真空浓缩是食品生产中经常采用的技术,本技术领域里的技术人员根据物料性质选择其浓缩温度与真空度是不存在任何困难的。本发明使用的真空浓缩设备是目前市场上销售的产品,例如扬州市食品机械厂销售的真空浓缩锅。

[0062] 根据本发明,所述的喷雾干燥是食品生产中经常采用的技术,本技术领域里的技术人员根据物料性质选择其干燥温度与干燥时间是不存在任何困难的。本发明使用的喷雾干燥设备是目前市场上销售的产品,例如上海沃迪科技有限公司销售的实验型喷雾干燥机。

[0063] 根据本发明,把含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的所述乳粉装入胶囊,制成胶囊制品。

[0064] 根据本发明,所述的胶囊是目前医药、食品市场上销售的产品。

[0065] 根据本发明,含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳是按照下述步骤制备得到的:

[0066] 原料乳在温度 95℃ 下加热杀菌 20min 或在 140℃ 下高温热杀菌 2s,得到的灭菌原料乳再冷却到 37℃,再加入以原料乳体积计 3-5% 所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂与 3-5% 可制备发酵乳的商品发酵剂,混匀后在温度 37℃ 的条件下混菌发酵至滴定酸度以乳酸计 0.6-0.7%,然后冷却至温度 4℃,再进行冷藏保存得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳。

[0067] 所述的商品发酵剂是保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌,例如美国丹尼斯克公司或丹麦科汉森公司的产品。

[0068] 保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 目前被广泛地应用在发酵乳制作的过程当中,在分类上属于乳酸杆菌属,因其菌种产地、微生物特性、效能优异等特点,被微生物学家命名为德氏乳杆菌保加利亚亚种(简称保加利亚乳杆菌)。

[0069] 嗜热链球菌是制作发酵乳的重要发酵剂,广泛用于生产发酵乳制品,其中包括酸奶和奶酪。嗜热链球菌也具有一些功能活性,例如产生胞外多糖、细菌素和维生素。

[0070] 通过动物实验表明,本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 能改善酒精性肝损伤小鼠的肝功能、抗氧化指标、缓解内毒素血症及调节肠道菌群分布,可以有效地缓解酒精性肝病,其作用效果与市场上常用的黑龙江葵花药业股份有限公司生产的葵花护肝片相当,甚至更好。

[0071] [有益效果]

[0072] 本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 具有很高的抗氧化能力;细胞浓度为  $10^{10}$  cfu/mL 的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 完整细胞和无细胞提取物对二苯基苦基苯肼 (DPPH) 自由基的清除率分别为 93.51% 和 89.66%;细胞浓度为  $10^{10}$  cfu/mL 的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 完整细胞和无细胞提取物对羟自由基的清除率分别为 94.16% 和 93.87%;鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 完整细胞和无细胞提取物均具有一定的还原能力,浓度为  $10^{10}$  cfu/mL 的完整细胞和无细胞提取物的还原能力分别相当于 392.07  $\mu$  mol/L 和 373.91  $\mu$  mol/L 浓度的半胱氨酸盐酸盐;鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 还具有抑制脂质过氧化的能力,浓度为  $10^{10}$  cfu/mL 的完

整细胞和无细胞提取物对脂质过氧化的抑制率分别达到 84.52%和 81.18%。鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 能够耐受胆盐的浓度为 0.35%，能够耐受的氯化钠浓度为 8%，耐受的 pH 值为 3.0。

[0073] 动物实验结果表明，本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 能改善酒精性肝损伤小鼠的肝功能、抗氧化指标、缓解内毒素血症及调节肠道菌群分布，可以有效地缓解酒精性肝病，其作用效果与市场上常用的黑龙江葵花药业股份有限公司生产的葵花护肝片相当，甚至更好。

[0074] 鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) CCFM1107 菌株已于 2011 年 11 月 29 日在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，其保藏号为 CGMCCNo. 5496。

#### 【附图说明】

[0075] 图 1 表示鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的菌落形态；

[0076] 图 2 表示鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 革兰氏染色的菌体形态 (1000×)；

[0077] 图 3 表示鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在 MRS 液体培养基中在温度 37℃ 与厌氧培养条件下的生长曲线；

[0078] 图 4 表示各组小鼠肝脏病理切片 HE 染色的形态观察 (200×)

[0079] A 为空白组, B 为模型组, C 为药物组, D 为灌胃 CCFM1107 的干预组, E 为灌胃植物乳杆菌 N-9 组, 作为阴性对照组；

[0080] 图 5 表示酒精性肝损伤发病原因与益生菌健康功效的关系。

#### 【具体实施方式】

[0081] 通过下述实施例将更好地理解本发明。除非特别指出，下面这些实施例使用的设备、测定方法等都是本说明书中指出的那些设备和方法，实施例不再赘述。

[0082] 实施例 1：本发明鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的 16S rDNA 序列鉴定

[0083] 将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 接种于 MRS 液体培养基中，在温度 37℃ 的条件下培养 18h，取 1mL 培养菌液采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒，按其说明进行操作。以基因组 DNA 作为模板，以文献 (Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74 (8) :2461-2470) 公布的细菌鉴定通用引物为引物，采用 50 μL 反应体系进行 PCR 扩增、然后对扩增产物进行纯化、回收和测序。

[0084] 目的基因 PCR 扩增产物的测序是由上海生物工程技术服务有限公司完成的，将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的 16S rDNA 的测序结果利用 NCBI 核酸数据库进行比对，最终结果表明：本发明的 CCFM1107 与鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* strain HT2, *Lactobacillus rhamnosus* strain 20300 以及 *Lactobacillus rhamnosus* strain NM94-5 等多种鼠李糖乳杆菌的同源性均高达 99%，因此，将本发明的 CCFM1107 菌株鉴定为鼠李糖乳杆菌，命名为 *Lactobacillus rhamnosus* CCFM1107，于 2011 年 11 月 29 日在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，其保藏号为 CGMCC No. 5496。

[0085] 实施例 2：鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的微生物学性质测定

[0086] 鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 按照以 MRS 液体培养基体积计 5% 接种量接入 MRS 液体培养基中,分别在 0h、1h、2h、3h、4h、6h、8h、10h、12h、14h、16h、18h、20h、22h 和 24h 这些时间点用 pH 计测定培养液的 pH 值,并用分光光度计测定在 600nm 处的 OD<sub>600</sub> 值。本发明使用的 pH 计是梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司销售的 320-S pH 计,使用的分光光度计是尤尼柯(上海)仪器有限公司销售的 UV-2100 紫外可见分光光度计。

[0087] 以 OD<sub>600</sub> 值和 pH 值对培养时间绘图,可以得到鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在 MRS 培养基中的生长曲线,其结果如图 3 所示。在 MRS 培养基中,鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的延滞期相对较短,在 4h 时进入对数生长期,在 14~16h 时进入稳定期。随着培养时间的延长,pH 不断下降。进入稳定期后,pH 基本保持不变。培养 24h 后,pH 由最初的 6.13 降至 3.86。24h 培养液中鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 活菌浓度为  $6.8 \times 10^8$  cfu/mL。

[0088] 实施例 3、鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的抗氧化能力

[0089] 首先,制备鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的完整细胞及无细胞提取物。

[0090] 将本发明鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 活化培养后接种于 MRS 液体培养基中,在温度 37°C 的条件下培养 24h,经在 6000r/min 与温度 4°C 的条件下离心 10min,得到培养上清液和菌体沉淀,菌体沉淀经无菌生理盐水洗涤两次后,在无菌生理盐水重悬,调整细胞浓度约为  $10^9$  cfu/mL。所得菌细胞悬液分为两组,一组为完整细胞组(IC),另一组用于无细胞提取物(CFE)的制备。将细胞悬浮液用超声波破碎仪(Sonics&Materials 公司,VCX500 型)在 200W 与温度 4°C 的条件下进行超声破碎,每个处理进行 5s、每个处理间隔 5s,超声粉碎 30min,再在显微镜下检查没有完整菌体,然后以温度 4°C 与 6000r/min 的条件下离心 10min,收集上清液,即为无细胞提取物。

[0091] 然后,进行鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 各项抗氧化能力的测定,其中包括对 DPPH 自由基、羟自由基的清除率,还原活性以及脂质过氧化的抑制率,这些结果列于表 1 中。

[0092] (1) 清除 DPPH 自由基的能力

[0093] DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼,1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) 自由基是一种常见的筛选和评价抗氧化剂的有效方法,它是一种稳定的有机自由基,有单个电子,在醇溶液中呈现紫色,在 517nm 处有较强吸收,当加入对 DPPH 自由基有清除作用的物质后,其吸收会减弱,可通过这一变化检查测试物质的抗氧化性能。本实施例按照改进的 MEEI-YN LIN 和 FEN-JUAN CHANG 的方法(Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356. Digestive Diseases and Sciences, 2000, 45(8):1617-1622),测定出 CCFM1107 完整细胞与无细胞提取物对 DPPH 自由基的清除率。DPPH 自由基清除率是根据该文献给出的计算方法计算得到的。

[0094] (2) 清除羟自由基的能力

[0095] 羟自由基是活泼性最强,氧化性最大的自由基,对 DNA、蛋白质和脂类有较强的结合能力,是引起体内氧化损伤的主要因素。本实施例通过 Fenton 反应产生羟自由基 HO·,以邻菲罗啉-Fe<sup>2+</sup> 作为该反应的氧化还原指示剂,加入 HO· 的清除剂,则 HO· 减少,同时 Fe<sup>2+</sup> 增多,溶液颜色变红。具体方法参照 John M. C. GUTTERIDGE, Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA, Biochemical Journal. 1987,

243 :709-714。羟自由基清除能力是用羟自由基清除率表示的,羟自由基清除率是根据该文献给出的计算方法计算得到的。

#### [0096] (3) 还原活性的测定

[0097] 还原活性主要指一些酶(如过氧化氢酶、NADH 氧化酶、NADH 过氧化物酶)和非酶复合物(维生素 C、维生素 E、谷胱甘肽)具有减少氧自由基和螯合  $Fe^{2+}$  的能力,进而减少氧化反应的发生。本实施例按照改进的 Meei-Yn Lin 和 Chyuan-Liang Yen 的方法(Antioxidative ability of lactic acidbacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47 :1460-1466)测定出 CCFM1107 完整细胞与无细胞提取物的还原活性。还原活性是用还原力表示的,它相当于半胱氨酸盐酸盐浓度,还原力是根据该文献给出的计算方法计算得到的。

#### [0098] (4) 抑制脂质过氧化的能力

[0099] 脂质过氧化反应主要是指在生物膜不饱和脂肪酸中在氧自由基诱导下发生的一系列自由基反应。脂质过氧化反应的最终产物有丙二醛(MDA),MDA 可破坏蛋白质、核酸等生物大分子,造成机体老化和多种疾病的发生。因此,测定 MDA 的含量,在一定程度上可反映脂质过氧化损伤的程度,是目前公认的反映脂质过氧化的指标。本实施例按照改进的 M. Y. LIN 和 C. L. YEN 的方法(Reactive oxygen species and lipid peroxidationproduct-scavenging ability of yogurt organisms. Journal of Dairy Science, 1999, 82 :1629-1634)测定出 CCFM1107 完整细胞与无细胞提取物抑制脂质过氧化的能力,其抑制脂质过氧化能力是以脂质过氧化抑制率表示的,脂质过氧化抑制率是根据该文献给出的计算方法计算得到的。

[0100] 上述 CCFM1107 完整细胞与无细胞提取物的 DPPH 清除率、羟自由基清除率、还原力与脂质过氧化抑制率的结果汇集于表 1 中。

[0101] 表 1 鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的抗氧化能力

[0102]

抗氧化指标	DPPH 清除率/%	羟自由基清除率/%	还原力/相当于半胱氨酸盐酸盐的浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	脂质过氧化抑制率/%
完整细胞	93.51 $\pm$ 3.57	94.16 $\pm$ 5.64	392.07 $\pm$ 7.15	84.52 $\pm$ 3.69
无细胞提取液	89.66 $\pm$ 4.02	93.87 $\pm$ 2.38	373.91 $\pm$ 6.36	81.18 $\pm$ 4.85

[0103] 由上表可知:鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在清除自由基、抑制脂质过氧化以及还原力方面均表现出较高的活性。综上所述,CCFM1107 在所筛的菌株中具有较高的抗氧化活性。

[0104] 实施例 4:鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 对胆盐的耐受性试验

[0105] 在 MRS 液体培养基中加入牛胆汁盐,牛胆汁盐浓度达到以其 MRS 液体培养基量计分别为 0.0%、0.10%、0.20%、0.30%、0.35%、0.40% 和 0.45%,灭菌后以 MRS 液体培养基体积计 5%接种量接种本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 菌种,在温度 37 $^{\circ}\text{C}$  的条件下培养 24h 后观察各组培养液菌体的生长情况,并测定其在 600nm 下的 OD<sub>600</sub> 值,本发明鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在不同胆盐浓度的 MRS 培养基中的生长情况见下表 2。人们知道,胆盐对这种菌株的抑制作用取决于胆盐浓度和菌株本身的特性,人肠道中胆盐的含量为

0.03% - 0.30%，能够在正常生理胆盐浓度中生长和代谢的菌株才可能在肠道中存活。由表 2 的结果可以看出：本发明鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在胆汁盐浓度最高为 0.35% 的培养基中还能生长。因此鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 具有良好的耐胆盐能力。

[0106] 表 2 在不同胆盐浓度的培养基中鼠李糖乳杆菌

[0107] CCFM1107 的生长情况

[0108]

[0109]

胆盐浓度 (%)	生长情况
0.00	++
0.10	++
0.20	+
0.30	+
0.35	+
0.40	-
0.45	-

[0110] 注：++ 表示生长很好，即菌液非常浑浊，可以看到明显的菌体沉淀

[0111] + 表示略有生长，即菌液稍有浑浊，肉眼可见少许菌体沉淀

[0112] - 表示不生长，即没有菌体沉淀，发酵液澄清透明。

[0113] 实施例 5、鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 对 NaCl 的耐受性试验

[0114] 在 MRS 液体培养基中加入 NaCl，使 NaCl 浓度达到以其 MRS 液体培养基质量计分别为 0%、2%、4%、6%、7%、8%、9%，灭菌后以 MRS 液体培养基体积计 5% 的接种量接种本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 菌种，在温度 37℃ 的条件下培养 24h 后观察各组培养液菌体的生长情况，并测定其在 600nm 下的 OD<sub>600</sub> 值，这些结果列于表 3 中。

[0115] 由表 3 的结果可以看出，本发明鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在 7% 的 NaCl 浓度下生长良好，在 NaCl 浓度 8% 的条件下生长缓慢，在 NaCl 浓度 9% 以上则不生长，说明 CCFM1107 能够耐受 NaCl 的浓度为 8%。

[0116] 表 3 不同 NaCl 浓度的培养基中鼠李糖乳杆菌

[0117] CCFM1107 的生长情况

[0118]

NaCl (%)	生长情况
0	++
2	++
4	++
6	++
7	++
8	+
9	-

[0119] 注：++ 表示生长很好，即菌液非常浑浊，可以看到明显的菌体沉淀

[0120] + 表示略有生长，即菌液稍有浑浊，肉眼可见少许菌体沉淀

[0121] - 表示不生长，即没有菌体沉淀，发酵液澄清透明

[0122] 实施例 6：鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 对不同 pH 的耐受性试验

[0123] 在 MRS 液体培养基中加入 1M 盐酸溶液，使其 pH 值分别达到 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、6.2，灭菌后以 MRS 液体培养基体积计 5% 的接种量接种本发明的鼠李糖乳杆菌

CCFM1107 菌种,在温度 37℃的条件下培养 24h 后观察各组培养液菌体的生长情况,并测定其在 600nm 下的 OD<sub>600</sub> 值,这些结果列于表 4 中。

[0124] 人胃液的正常 pH 值是 1.5-4.5,其 pH 值大小因个人的饮食结构不同而波动,通常胃液的 pH 值为 3.0 左右。菌株要到达并定植于肠道就必须具有一定的耐酸性。由表 4 分析结果可得,鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在 pH 为 3.0 时可以生长,说明其在低 pH 情况下仍具有较强的生存和生长能力。

[0125] 表 4 在不同 pH 值的培养基中鼠李糖

[0126] 乳杆菌 CCFM1107 的生长情况

[0127]

pH 值	生长情况
1.5	-
2.0	-
2.5	-
3.0	+
3.5	++
4.0	++
6.2	++

[0128] 注 :++ 表示生长很好,即菌液非常浑浊,可以看到明显的菌体沉淀

[0129] + 表示略有生长,即菌液稍有浑浊,肉眼可见少许菌体沉淀

[0130] - 表示不生长,即没有菌体沉淀,发酵液澄清透明

[0131] 实施例 7、鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 缓解慢性酒精性肝损伤的动物实验

[0132] 根据 F.Sun 和 M.L.Xie 等人的方法 (Inhibitory effect of osthole on alcohol-induced fatty liver in mice. Digestive and Liver Disease, 2009, 41: 127-133),建立小鼠的慢性酒精性肝损伤模型,灌胃益生菌,以分析本发明鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 菌株的缓解酒精性肝损伤的功效。

[0133] 昆明种清洁级小鼠 50 只,雄性,体重 18±2g,购自上海市斯莱克实验动物有限公司;许可证号码:SCXK(沪)2007-0005。

[0134] 采用标准配方杆状饲料喂养,自由进水,小鼠饲养于江南大学医药学院清洁级实验动物房,温度:20-23℃;湿度:50%-60%。

[0135] 经 3 天的适应性饲养后,随机分成 5 组,分组情况见表 5。每组 10 只,饲喂方式如下表 5 所示。采取一天两次灌胃方式:上午灌胃酒精,下午灌胃药物或本发明的益生菌液。

[0136] 表 5 鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 缓解小鼠

[0137] 慢性酒精性肝损伤的动物实验

[0138]

组别	饲喂方式
空白组	脱脂乳 (am)+ 脱脂乳 (pm)
模型组	酒精 (am)+ 脱脂乳 (pm)
药物组	酒精 (am)+ 护肝片 (pm)
干预组	酒精 (am)+CCFM1107 (pm)
对照组	酒精 (am)+N-9 (pm)

[0139] 注 :am 表示上午, pm 表示下午, CCFM1107 为抗氧化能力较高的本发明鼠李糖乳杆菌 CCFM1107, N-9 为一株抗氧化能力相对较低、作为阴性对照的植物乳杆菌。

[0140] 灌胃酒精浓度按照 20% -25% -30% -35% -40% 顺序逐渐增加,在两周内增至

40% (v/v) 后维持此浓度至实验结束；

[0141] 阳性对照灌胃药物为葵花牌护肝片（黑龙江葵花药业股份有限公司），根据剂量换算至小鼠相应浓度；本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 益生菌制成浓缩冻干粉，每次灌胃前在 37℃ 水浴中复苏 30min 后使用，浓度约为  $10^9$  cfu/mL。所有样品均按照 10mL/kgBW 进行灌胃，实验时间为 3 个月。末次灌胃后禁食 24h，迅速摘眼球采集血液，解剖取肝脏及肠道粪便等样品并分别测定 AST（谷草转氨酶）、ALT（谷丙转氨酶）、TG（甘油三酯）与 TC（总胆固醇）各项指标。

[0142] AST、ALT、TG 与 TC 的测定试剂盒由长春汇力生物技术有限公司提供，MDA（丙二醛）、GSH（谷胱甘肽）、SOD（超氧化物歧化酶）与 GSH-PX（谷胱甘肽过氧化物酶）的试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。这些测定结果列于表 6 至表 13。所有数据均用统计软件 SPSS16.0 进行统计学处理，各项指标结果以  $x \pm s$  表示，以 One-way ANOVA 进行显著性检验。

[0143] 肝指数是肝重与体重的比值，它在一定程度上反映了肝脏的健康水平，发生病变时往往会引起器官萎缩或肿胀，从而导致肝指数也随之发生变化。本实施例五个组小鼠的肝指数如表 6 所示；模型组的肝指数大于空白组且差异显著，经治疗后，药物组与鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 干预组均使肝指数有所下降，其中药物组与模型组差异显著。

[0144] 表 6 鼠李糖乳杆菌 CCFM1107

[0145] 对小鼠肝指数的影响 ( $x \pm s$ ,  $n = 10$ )

[0146]

组别	肝指数 (%)
空白组	$2.98 \pm 0.47$
模型组	$3.74 \pm 0.52^a$
药物组	$3.11 \pm 0.39^b$
干预组	$3.31 \pm 0.47$
对照组	$3.59 \pm 0.36^a$

[0147] 注：与空白组相比： $^a P < 0.05$ ；与模型组相比： $^b P < 0.05$

[0148] 谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 主要存在于肝细胞胞浆内，当肝脏受损时，细胞内转氨酶可进入血液，引起血中 ALT 和 AST 的升高。而 AST 还分布于线粒体内，当肝严重受损时，线粒体内 AST 释放进入血液，使血清 AST 升高。故血清中 ALT、AST 活性是乙醇所致肝损伤最敏感的生物标志物。

[0149] 由表 7 显示，酒精的刺激使得血清中 ALT 和 AST 含量显著升高，药物组与鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 干预组则可以将其水平降低至空白组水平。

[0150] 表 7 鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 对小鼠血清

[0151] 转氨酶活性的影响 ( $x \pm s$ ,  $n = 10$ )

[0152]

组别	AST(U/L)	ALT(U/L)
空白组	$41.65 \pm 10.02$	$27.49 \pm 6.45$
模型组	$73.99 \pm 7.89^a$	$36.03 \pm 7.36^a$

[0153]

药物组	43.92±9.32 <sup>b</sup>	25.25±3.01 <sup>b</sup>
干预组	47.88±8.24 <sup>b</sup>	26.49±5.29 <sup>b</sup>
对照组	74.80±11.14 <sup>a</sup>	37.51±8.84 <sup>a</sup>

[0154] 注：与空白组相比：<sup>a</sup>P < 0.05；与模型组相比：<sup>b</sup>P < 0.05

[0155] 酒精对肝脏的损伤还体现在脂肪变性并产生脂泡上，因此可以测定血液中相应脂肪的含量。这些结果列于下表 8 中。与空白组相比，模型组小鼠的血脂水平显著升高，而药物组和鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 干预组则可以使其降低至正常水平。

[0156] 表 8 鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 对小鼠血脂的影响 ( $x \pm s$ , n = 10)

[0157]

组别	甘油三酯 (mmol/L)	胆固醇 (mmol/L)
空白组	2.24±0.49	2.33±0.51
模型组	3.74±0.65 <sup>a</sup>	3.83±0.61 <sup>a</sup>
药物组	2.17±0.45 <sup>b</sup>	2.49±0.65 <sup>b</sup>
干预组	2.32±0.63 <sup>b</sup>	2.80±0.59 <sup>b</sup>
对照组	3.37±0.72 <sup>a</sup>	3.80±0.72 <sup>a</sup>

[0158] 注：与空白组相比：<sup>a</sup>P < 0.05；与模型组相比：<sup>b</sup>P < 0.05

[0159] 自由基及其诱导的脂质过氧化是造成肝组织损伤的重要原因之一，丙二醛 (MDA) 为脂质过氧化的产物，其含量可反映机体内脂质过氧化的程度，间接反映出肝细胞受损伤的程度。而谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 以谷胱甘肽 (GSH) 为底物和超氧化物歧化酶 (SOD) 共同清除机体活性氧，减轻和阻止活性氧的氧化作用。分析表 9 和 10 可知：酒精的摄入诱导 GSH、GSH-PX 和 SOD 含量大大下降，而 MDA 浓度则相应升高；而药物组和鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 干预组则可以提高 GSH、GSH-PX 和 SOD 的含量，降低 MDA 的浓度，其中鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的作用效果甚至好于药物组，它使 GSH 的浓度高于正常水平，谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 两种酶指标也得到明显的改善 (P < 0.05)。

[0160] 表 9 鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 对小鼠

[0161] 肝匀浆 MDA 及 GSH 的影响 ( $x \pm s$ , n = 10)

[0162]

组别	MDA(nmol/mg 蛋白质)	GSH(mg/g 蛋白质)
空白组	6.01±1.74	9.06±2.41
模型组	12.92±2.91 <sup>a</sup>	5.75±1.67 <sup>a</sup>
药物组	7.33±2.05 <sup>b</sup>	6.99±1.92
干预组	6.48±2.28 <sup>b</sup>	9.85±2.17 <sup>b</sup>
对照组	11.16±2.77 <sup>a</sup>	6.11±2.41 <sup>a</sup>

[0163]

[0164] 注：与空白组相比：<sup>a</sup>P < 0.05；与模型组相比：<sup>b</sup>P < 0.05

[0165] 表 10 鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 对小鼠

[0166] 肝匀浆 SOD 及 GSH-PX 的影响 ( $x \pm s$ , n = 10)

[0167]

组别	SOD(U/mgprot)	GSH-PX(活力单位)
空白组	105.22±20.97	214.37±23.79
模型组	71.88±12.43 <sup>a</sup>	176.32±19.24 <sup>a</sup>



药物组	92.66±14.52 <sup>b</sup>	179.01±16.03 <sup>a</sup>
干预组	97.22±13.84 <sup>b</sup>	203.14±24.36
对照组	68.58±15.17 <sup>a</sup>	205.55±18.17 <sup>b</sup>

[0168] 注：与空白组相比：<sup>a</sup>P < 0.05；与模型组相比：<sup>b</sup>P < 0.05

[0169] 由下表 11 可以看出：酒精的摄入不仅引起了血脂水平的升高，而且也增加了其在肝脏中的浓度，而相应地，药物组与鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 组的干预使得肝匀浆中甘油三酯与胆固醇的含量显著下降，其中，鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 组对甘油三酯的降低效果明显，而药物组则能够更好地降低胆固醇的含量。

[0170] 表 11 鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 对小鼠肝匀浆

[0171] 甘油三酯和胆固醇的影响 ( $x \pm s$ , n = 10)

[0172]

组别	甘油三酯 (mmol/L)	胆固醇 (mmol/L)
空白组	0.83±0.09	1.34±0.12
模型组	1.28±0.23 <sup>a</sup>	2.26±0.27 <sup>a</sup>
药物组	0.99±0.13 <sup>b</sup>	1.53±0.21 <sup>b</sup>
干预组	0.88±0.13 <sup>b</sup>	1.80±0.26 <sup>a,b</sup>
对照组	1.23±0.17 <sup>a</sup>	2.25±0.33 <sup>a</sup>

[0173] 注：与空白组相比：<sup>a</sup>P < 0.05；与模型组相比：<sup>b</sup>P < 0.05

[0174] 益生菌的主要生理功能之一是调节肠道菌群，当发生肝损伤后必然会引起肠道菌群的变化，而益生菌的摄入则对保持肠道微生态环境的平衡和稳定发挥着极为重要的作用。取自小鼠肠道的粪便收集在无菌管中，称重后用适量无菌缓冲液（1L PBS 缓冲液中含有 0.5g 盐酸半胱氨酸，0.5mL 吐温 80 和 0.5g 琼脂，调 pH 值为 7.4-7.6）进行 10 倍连续梯度稀释，选取适当倍数的稀释液 100  $\mu$ L 分别涂布于乳酸杆菌选择性培养基改良 MC 培养基（青岛海博生物技术有限公司）、双歧杆菌选择性培养基 TPY（青岛海博生物技术有限公司）、肠杆菌培养基 VRBDA（青岛海博生物技术有限公司）和肠球菌培养基 EC（青岛海博生物技术有限公司）等选择性培养基上进行乳酸杆菌、双歧杆菌、肠杆菌和肠球菌的计数。其中，乳酸杆菌和双歧杆菌在温度 37℃ 的条件下厌氧培养，肠杆菌在温度 37℃ 的条件下好氧培养，肠球菌在温度 42℃ 的条件下好氧培养，在 48 小时后，计数 1g 粪便样品的菌落形成单位数 (colony forming unit, cfu)，结果表示为 log<sub>10</sub>(cfu/g 肠道粪便)。血清内毒素采用酶联免疫分析法，按照 ELISA 试剂盒（Cusabio 公司）进行操作。这些试验结果列于表 12 和表 13 中。

[0175] 表 12 鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 对小鼠

[0176] 肠道菌群的影响 ( $x \pm s$ , n = 10)

[0177]

组别	肠球菌	肠杆菌	乳杆菌	双歧杆菌
空白组	6.10±0.17	6.13±0.17	8.53±0.20	9.35±0.15
模型组	6.51±0.23	7.59±0.20 <sup>a</sup>	7.90±0.21	8.14±0.26 <sup>a</sup>
药物组	6.30±0.19	7.03±0.24 <sup>a,b</sup>	8.06±0.27	8.32±0.17 <sup>a</sup>
干预组	4.48±0.26 <sup>a,b</sup>	4.52±0.20 <sup>a,b</sup>	8.99±0.28 <sup>b</sup>	9.89±0.16 <sup>a,b</sup>
对照组	5.54±0.20 <sup>b</sup>	5.32±0.13 <sup>a,b</sup>	8.72±0.22 <sup>b</sup>	9.17±0.21 <sup>b</sup>

[0178] 注：与空白组相比：<sup>a</sup>P < 0.05；与模型组相比：<sup>b</sup>P < 0.05

[0179] 表 13 鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 对小鼠

[0180] 血清内毒素水平的影响 ( $x \pm s$ , n = 10)

[0181]

组别	血清内毒素含量 (pg/mL)
空白组	28.29±6.48
模型组	66.14±12.47 <sup>a</sup>
药物组	54.35±13.24 <sup>a</sup>
干预组	27.93±12.77 <sup>b</sup>
对照组	36.28±13.12 <sup>b</sup>

[0182] 注:与空白组相比:<sup>a</sup>P < 0.05;与模型组相比:<sup>b</sup>P < 0.05

[0183] 分析表 12 和 13 列出的结果表明,与空白组相比,酒精组的肠杆菌数量明显增加,乳杆菌和双歧杆菌则大大减少。在益生菌组,无论是干预组还是对照组,乳杆菌和双歧杆菌的数量都远远高于酒精组,鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 组甚至高于正常水平,而肠球菌和肠杆菌的数量则显著降低。但药物组对肠道菌群没有什么影响,几乎与模型组处于相当的水平上。相应地,模型组和药物组的血清内毒素含量高于空白组,差异性非常显著 (P < 0.05),益生菌组的摄入使得内毒素的水平大大下降,鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 组血清的内毒素略低于空白组。

[0184] 取各组小鼠同一位置的肝脏评价益生菌在体内对酒精性肝损伤的缓解作用,小鼠 HE (苏木精 - 伊红) 染色的病理切片如图 4 所示。空白组 (图 4A):肝细胞索结构完整,呈放射状,肝小叶结构清晰,肝细胞有明显的界线且胞浆均匀,无脂肪空洞和炎性浸润;模型组 (图 4B):脂肪变性明显,有大片的脂肪空洞,肝细胞肿胀变形、胞质浑浊,有网状结构,少数核固缩,出现炎性细胞浸润;药物组 (图 4C):较模型组有所改善,几乎看不到脂肪泡,轻度炎症细胞浸润,核固缩轻微;CCFM1107 干预组 (图 4D):肝小叶界限清晰,肝细胞板排列整齐,基本正常;阴性对照组植物乳杆菌 N-9 菌株组 (图 4E):脂肪空洞较多,肝细胞肿胀,有网状结构和轻度炎性浸润。

[0185] 综上所述,鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 在慢性酒精性肝损伤的小鼠模型中,能够降低血清转氨酶的活性和血脂的含量,提高小鼠的抗氧化能力,抑制自由基的生成,调节肠道的菌群分布,降低血清内毒素含量,预防小鼠肝脏的脂肪变性。从血清和肝脏各项指标可以看出,本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 具有良好的缓解慢性酒精性肝损伤的生理功效,可进一步用于功能性食品或者相关药物的开发。

[0186] 应用实施例 1:利用鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 制造含 CCFM1107 的牛乳

[0187] 首先,制备鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂:

[0188] 将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 原始菌种接种于按照以脱脂乳重量计 12 重量%在使用英国斯必克 APV 公司销售的 145C 型杀菌机于 110℃ 灭菌 10min 的脱脂乳中,然后在温度 37℃ 的条件下培养 14h 至凝乳,连续在相同的条件下培养活化两代,得到的发酵脱脂乳作为母发酵剂;

[0189] 将所述的母发酵剂按照以灭菌乳体积计 5% 接种于在该 145C 型杀菌机于 110℃ 灭菌 10min 的脱脂乳中,然后在温度 37℃ 的条件下培养 14h 至凝乳,得到所述的工作发酵剂,该工作发酵剂的活菌浓度是  $3 \times 10^9$  cfu/mL。

[0190] 然后,将原料牛乳在使用上述杀菌机于 95℃ 热杀菌 20min,然后冷却至温度 4℃,再加入所述的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂,使其浓度达到  $10^6$  cfu/mL 以上,在温度 4℃ 下冷藏保存即得到含鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 活菌的牛乳。

[0191] 应用实施例 2:利用鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 制造乳粉

[0192] 首先,制备鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂:

[0193] 将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 菌种按照以 MRS 液体培养基重量计 5% 接种于 MRS 液体培养基中,在温度 37℃ 条件下培养 12h 进行活化,连续在相同的条件下培养活化两代。

[0194] 将活化培养物按照以 MRS 液体培养基体积计 4% 接种于 MRS 培养基中,在温度 37℃ 条件下培养 16h,再在温度 4℃ 条件下以 4000r/min 离心 15min,去除上清液,得到的细胞沉淀用无菌脱脂乳悬浮,得到所述的工作发酵剂,该工作发酵剂的活菌浓度是  $1 \times 10^9$  cfu/mL。

[0195] 然后,将原料乳使用日本 Powerpoint International 有限公司销售的 PT-20C-R 型管板组合式超高温杀菌机在 140℃ 高温热杀菌 2s,然后冷却至 37℃,按照以原料乳体积计 4% 接种量接种本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂,在温度 37℃ 的条件下发酵 16h,得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳。将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 发酵乳以其与原料乳的体积比 1 : 3 加入灭菌原料乳中,使用上海东华高压均质机厂销售的 GYB40-10S 型高压均质机进行均质,然后使用扬州市食品机械厂销售的真空浓缩锅进行真空浓缩,再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喷雾干燥处理,这样得到所述的含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的乳粉。

[0196] 应用实施例 3 :利用鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 制造胶囊制品

[0197] 首先,制备鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂:

[0198] 将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 原始菌种接种于按照以 MRS 液体培养基重量计 3% MRS 液体培养基中,在温度 37℃ 条件下培养 16h 进行活化,连续在相同的条件下培养活化两代。

[0199] 将活化培养物按照以 MRS 液体培养基体积计 2% 接种于 MRS 培养基中,在温度 37℃ 条件下培养 18h,再在温度 4℃ 条件下以 4000r/min 离心 15min,去除上清液,得到的细胞沉淀用无菌脱脂乳悬浮,得到所述的工作发酵剂,该工作发酵剂的活菌浓度是  $2 \times 10^9$  cfu/mL。

[0200] 然后,将原料乳使用日本 Powerpoint International 有限公司销售的 PT-20C-R 型管板组合式超高温杀菌机在 140℃ 高温热杀菌 2s,然后冷却至 37℃,以原料乳体积的 4% 接种量接种本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂,在温度 37℃ 的条件下发酵 16h,得到含有鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 的发酵乳。将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 发酵乳以其与原料乳的体积比 1 : 3 加入灭菌原料乳中,使用上海东华高压均质机厂销售的 GYB40-10S 型高压均质机进行均质,然后使用扬州市食品机械厂销售的真空浓缩锅进行真空浓缩,再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喷雾干燥处理,这样得到一种乳粉,将得到的乳粉装到胶囊中制成胶囊制品。

[0201] 应用实施例 4 :利用鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 制备发酵乳

[0202] 首先,制备鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂:将鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 原始菌种按照以脱脂乳重量计 12 重量% 接种于经在使用英国斯必克 APV 公司销售的 145C 型杀菌机于 110℃ 灭菌 10min 的脱脂乳中,然后在温度 37℃ 的条件下培养 16h 至凝乳,连续在相同的条件下培养活化两代,得到的发酵脱脂乳作为母发酵剂;

[0203] 将所述的母发酵剂按照以灭菌乳体积计 3% 接种于在该 145C 型杀菌机于 110℃ 灭菌 10min 的脱脂乳中,然后在温度 37℃ 的条件下培养 16h 至凝乳,得到所述的工作发酵剂,该工作发酵剂的活菌浓度是  $1 \times 10^9$  cfu/mL。

[0204] 将原料乳在使用英国斯必克 APV 公司销售的 145C 型杀菌机于温度 95℃ 下热杀菌 20min, 然后冷却至 37℃, 以所述原料乳体积计 4% 加入本发明的鼠李糖乳杆菌 CCFM1107 工作发酵剂, 以及加入 4% 可制备发酵乳的商业发酵剂保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌, 在温度 37℃ 的条件下混菌发酵至滴定酸度为 0.6% (以乳酸计), 冷却至温度 4℃ 并冷藏保存即得到发酵乳。

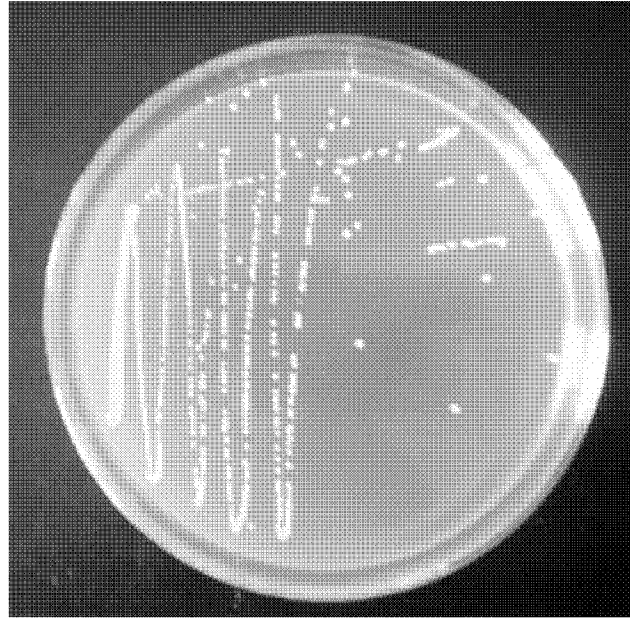


图 1

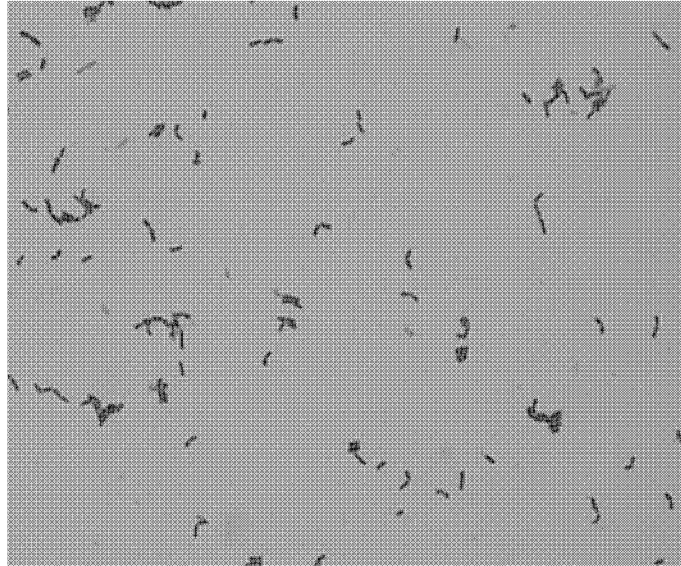


图 2

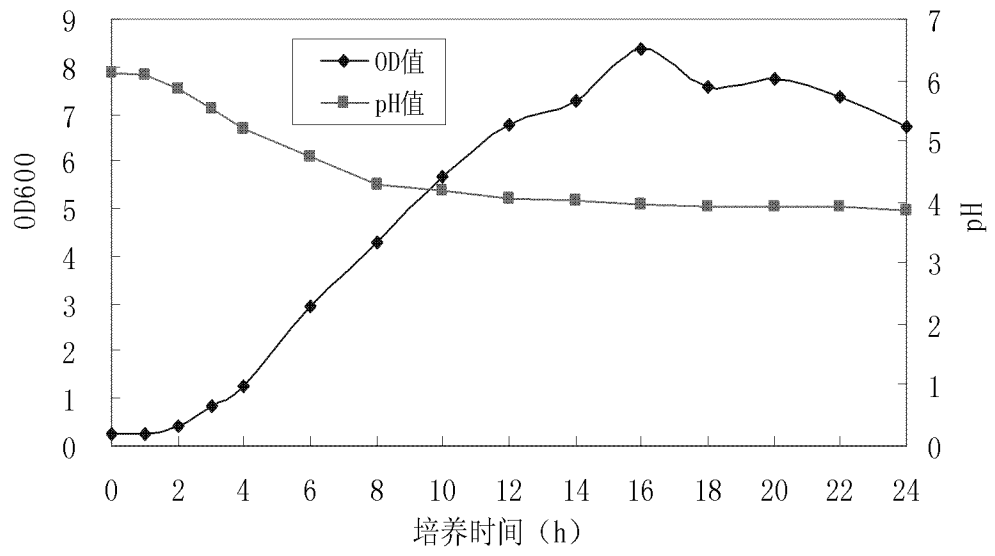


图 3

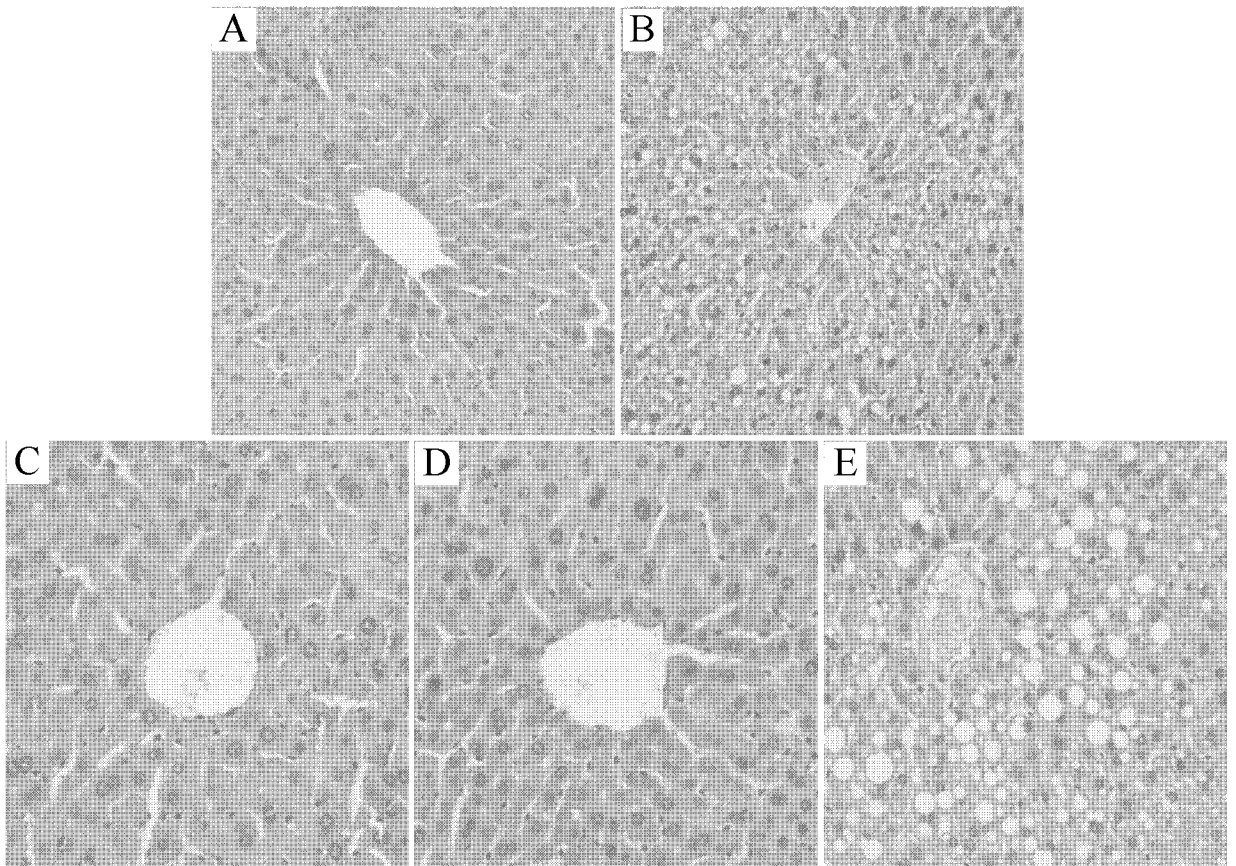


图 4

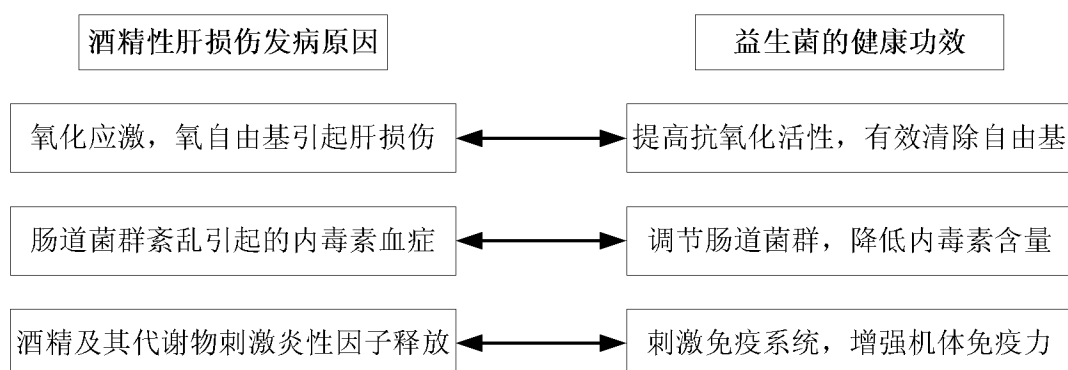


图 5