



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116042477 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 30

(21) 申请号 202310013365.7

(22) 申请日 2023.01.05

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 116042477 A

(43) 申请公布日 2023.05.02

(83) 生物保藏信息  
GDMCC NO:62988 2022.11.21

(73) 专利权人 东北农业大学  
地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区长江路600号  
专利权人 湖北均瑶大健康饮品股份有限公司

(72) 发明人 姜毓君 王均豪 满朝新 王晨晨  
张宇 田露露

(74) 专利代理机构 南京群迈知识产权代理有限公司 32690  
专利代理师 安士影

(51) Int. Cl.  
C12N 1/20 (2006.01)  
C12P 19/04 (2006.01)  
A61K 35/747 (2015.01)

A61K 31/715 (2006.01)  
A61P 3/04 (2006.01)  
A61P 3/10 (2006.01)  
A61P 1/16 (2006.01)  
A23L 33/135 (2016.01)  
A23L 29/30 (2016.01)  
C12R 1/25 (2006.01)  
C12R 1/225 (2006.01)

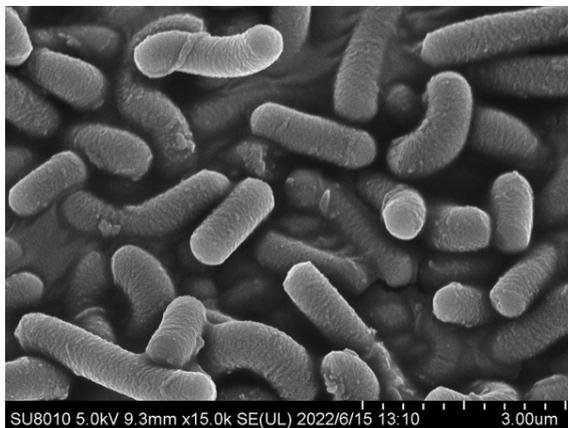
(56) 对比文件  
CN 114507619 A, 2022.05.17  
CN 114717146 A, 2022.07.08  
IT MI20130795 A1, 2014.11.15  
CN 104430851 A, 2015.03.25  
CN 115300531 A, 2022.11.08  
CN 115161364 A, 2022.10.11  
CN 112458028 A, 2021.03.09  
CN 115120683 A, 2022.09.30  
CN 112662791 A, 2021.04.16  
CN 115011532 A, 2022.09.06  
CN 113598374 A, 2021.11.05 (续)  
审查员 全弘扬

权利要求书1页 说明书15页 附图8页

(54) 发明名称  
植物乳杆菌J26组合物、制法和在减肥产品中的应用

(57) 摘要  
本发明公开了一种植物乳杆菌J26组合物、制法和在减肥产品中的应用,组合物包括按照质量比例1:1复配的植物乳杆菌J26与副干酪乳杆菌JY56胞外多糖。副干酪乳杆菌JY56保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏日期为2022年11月21日,保藏编号为GDMCC NO:62988。本发明减低由高脂饮食诱导的肥胖小鼠的体重,显著降低肥胖小鼠血清和肝脏中TC、TG、LDL-C和IGLU的含量,降低肥胖小鼠血清中的ALT、AST、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 和IFN- $\gamma$ 含量。减轻肥胖小鼠肝脏脂肪变性情况,缓解炎症细胞浸润和纤维组织增生现象。

象。



CN 116042477 B

[接上页]

**(56) 对比文件**

张宇等. 一株高产胞外多糖降血糖副干酪乳杆菌JY062(TD062)的粘附性与耐受性评价. 中国乳品工业. 2022, 第50卷(第4期), 全文.

郑亚平等. 植物乳杆菌J26组合物对高脂饮食诱导肥胖小鼠的减肥作用研究. 中国乳品工业. 2023, 全文.

张宇. 副干酪乳杆菌胞外多糖降血糖作用机制的研究. 中国博士学位论文全文数据库. 2022,

全文.

Li Hongxuan等. Lactobacillus plantarum J26 Alleviating Alcohol-Induced Liver Inflammation by Maintaining the Intestinal Barrier and Regulating MAPK Signaling Pathways. Nutrients. 2022, 第15卷(第1期), 全文.

王今雨等. 植物乳杆菌NDC 75017的降胆固醇作用. 食品科学. 2013, 第34卷(第3期), 全文.

1. 一种植物乳杆菌J26组合物,其特征在于,包括植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) J26和副干酪乳杆菌 (*Lacticaseibacillus paracasei*) JY56胞外多糖,副干酪乳杆菌JY56保藏于广东省微生物菌种保藏中心,广州,保藏日期为2022年11月21日,保藏编号为GDMCC NO:62988;植物乳杆菌J26保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC NO.5448;胞外多糖的制备方法为:在pH为6.0的条件下,接种5%的副干酪乳杆菌JY56至MRS培养基上,在30℃温度条件下发酵26h。

2. 根据权利要求1所述的一种植物乳杆菌J26组合物,其特征在于,植物乳杆菌J26菌泥与副干酪乳杆菌JY56胞外多糖的质量比例为1:1。

3. 根据权利要求1所述的一种植物乳杆菌J26组合物,其特征在于,植物乳杆菌J26的浓度为 $10^9$ CFU/mL;胞外多糖的浓度为0.3mg/mL。

4. 根据权利要求1~3任意一项所述的一种植物乳杆菌J26组合物的制法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一,植物乳杆菌J26的菌泥的制备:取活化后的植物乳杆菌J26菌株,以5~7%的接种量接种于200mL脱脂乳粉培养基,37℃扩大培养14h后,以5%的接种量进行4L高密度发酵,发酵14h,离心得到植物乳杆菌J26菌泥;

步骤二,将步骤一获得的植物乳杆菌J26菌泥与0.3mg/mL的副干酪乳杆菌JY56胞外多糖按照质量比例1:1进行复配,获得组合物,均质后冷冻干燥,得到含有植物乳杆菌J26菌粉的组合物。

5. 根据权利要求4所述的制法,其特征在于,高密度发酵的液体发酵环境为:温度35~37℃,湿度65~70%,pH值<7,通氧气量0.7~1.5vvm,搅拌机功率1.5~2kwh/m<sup>3</sup>。

6. 根据权利要求1~3任意一项所述的一种植物乳杆菌J26组合物在制备减肥药品或减肥食品中的应用。

7. 根据权利要求1~3任意一项所述的一种植物乳杆菌J26组合物在制备降血糖药品中的应用。

8. 根据权利要求1~3任意一项所述的一种植物乳杆菌J26组合物在制备治疗肝损伤药物中的应用。

## 植物乳杆菌J26组合物、制法和在减肥产品中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物乳杆菌J26组合物及其制法和应用,具体涉及一种植物乳杆菌J26与0.3mg/mL的副干酪乳杆菌JY56胞外多糖复合配方粉剂及其制备方法及在缓解高脂饮食诱导肥胖小鼠中的减肥功能应用。属于微生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 饮食是影响宿主营养吸收和代谢的主要因素。随着人们生活水平的提高,营养过剩的问题日渐严重,高脂饮食的摄入量不断增加,严重危害着人们的身体健康。过去几十年里,在发达国家和一些发展中国家,一些由高脂饮食为主要诱因而引起的代谢疾病(如肥胖、糖尿病以及非酒精性脂肪肝等),已经成为重要的社会问题。肥胖是一种长期处于能量摄入超过能量消耗状态而引起的慢性疾病。在这种情况下,脂肪组织将多余的能量储存为甘油三酯,脂质溢出进入循环系统增加对非脂肪组织(例如肝脏和骨骼肌)的脂质供应,并增加促炎因子的含量。这些肥胖相关的组织和器官代谢功能紊乱还会导致胰岛素抵抗、糖尿病和非酒精性脂肪肝的发生和发展。

[0003] 肥胖的发生多伴随着脏器损伤现象与机体内免疫因子含量的变化。现有的乳杆菌减肥作用研究一般单一乳杆菌复配,多数依赖于乳杆菌本身的功能特性并进行制备处理,虽然也具有一定的减肥作用,但效果一般。虽然在现有技术中的报道中,很多已知菌或组合物的也具有一定的减肥效果。如中国专利CN114344344 A中公开了罗伊氏乳杆菌在缓解高脂饮食诱导小鼠肥胖功能中的应用及含有罗伊氏乳杆菌的复合物,其中公开了组合物由罗伊氏乳杆菌和胞外多糖组成,胞外多糖的制备方法如下:37℃培养条件下,副干酪乳杆菌JY062菌株在MRS肉汤培养基中培养24h,在容量为1.0L的三角瓶子中进行分批发酵,接种物的初始密度为 $1.5 \times 10^9$ CFU/mL,接种物浓度为5.0%,胞外多糖按照水提醇沉法进行提取,采用三氯乙酸去除蛋白的方法进行纯化,将去除蛋白的胞外多糖重悬于去离子水中,透析72h,分子截流量为:12000-14000Da,然后将上清液冻干,获得胞外多糖。胞外多糖的浓度为0.5mg/mL。但是,上述专利存在胞外多糖需要经过水提醇沉-去除蛋白-透析等纯化操作,每步操作均会损失部分胞外多糖,故该专利中的多糖的产量必然会很低,另外,该专利对胞外多糖的分子量有严格要求,只有分子量在12000-14000Da的范围内的胞外多糖与罗伊氏乳杆菌复配后,另外还要求“罗伊氏乳杆菌及罗伊氏乳杆菌 $1 \times 10^{10}$ cfu/mL与胞外多0.5mg/mL混合组均有一定的降胆固醇能力”,才可以起到强化功效作用的效果。由此可见,上述专利在菌浓度和糖浓度均较高,且对糖的分子量具有特定要求的情况下,才能起到较好的减肥效果。故亟需一种胞外多糖产量和纯度均较高、对胞外多糖的分子量无要求,起效浓度低、便于制备、可实现工业化生产的具有减肥作用的组合物及其制法和应用。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供植物乳杆菌J26与0.3mg/mL的副干酪乳杆菌JY56胞外多糖复配的微生物制剂在缓解高脂饮食诱导肥胖小鼠的减肥功能应用。减低由高脂饮食诱导的

肥胖小鼠的体重,显著降低肥胖小鼠血清和肝脏中TC、TG、LDL-C和GLU的含量,降低肥胖小鼠血清中的ALT、AST、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 和IFN- $\gamma$ 含量。减轻肥胖小鼠肝脏脂肪变性情况,缓解炎症细胞浸润和纤维组织增生现象。

[0005] 同时,本发明提供了一种植物乳杆菌J26与副干酪乳杆菌JY56胞外多糖复配的粉剂制法。

[0006] 同时,本发明提供一种含有植物乳杆菌J26组合物的粉剂。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:

[0008] 一种植物乳杆菌J26组合物,包括副干酪乳杆菌(*Lactocaseibacillus paracasei*) JY56胞外多糖,副干酪乳杆菌JY56保藏于广东省微生物菌种保藏中心,广州,保藏日期为2022年11月21日,保藏编号为GDMCC NO:62988。

[0009] 一种植物乳杆菌J26组合物,还包括植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) J26,其中植物乳杆菌J26菌泥与副干酪乳杆菌JY56胞外多糖的质量比例为1:1。

[0010] 植物乳杆菌J26的浓度为 $10^9$ CFU/mL;胞外多糖的浓度为0.3mg/mL。

[0011] 一种植物乳杆菌J26组合物的制法,包括以下步骤:

[0012] 步骤一,植物乳杆菌J26的菌泥的制备:取活化后的植物乳杆菌J26菌株,以5~7%的接种量接种于200mL脱脂乳粉培养基,37 $^{\circ}$ C扩大培养14h后,以5%的接种量进行4L高密度发酵,发酵14h,离心得到植物乳杆菌J26菌泥;

[0013] 步骤二,将步骤一获得的植物乳杆菌J26菌泥与0.3mg/mL的副干酪乳杆菌JY56胞外多糖按照质量比例1:1进行复配,获得组合物,均质后冷冻干燥,得到含有植物乳杆菌J26菌粉的组合物。

[0014] 高密度发酵的液体发酵环境为:温度35~37 $^{\circ}$ C,湿度65~70%,pH值<7,通氧气流0.7~1.5vvm,搅拌机功率1.5~2kwh/m<sup>3</sup>。

[0015] 胞外多糖的制备方法为:在pH为6.0的条件下,接种5%的副干酪乳杆菌JY56至MRS培养基上,在30 $^{\circ}$ C温度条件下发酵26h,胞外多糖的产量达5.88 mg/mL,且胞外多糖的纯度为98.791 $\mu$ g/mL。

[0016] 一种植物乳杆菌J26组合物在制备减肥药品或减肥食品中的应用。

[0017] 一种植物乳杆菌J26组合物在制备降血糖药品中的应用。

[0018] 一种植物乳杆菌J26组合物在制备治疗肝损伤药物中的应用。

[0019] 本发明的组合物含有药学上可接受的辅料。

[0020] 组合物用于功能性食品或保健品中的成分。

[0021] 组合物在制备降低体重、缓解脂质积蓄水平升高的减肥产品中的应用。

[0022] 组合物在制备降低体重、缓解脂质积蓄水平升高的缓解肥胖造成的脏器损伤产品中的应用。

[0023] 本发明具有以下有益效果:

[0024] 本发明提供了一种安全有效的植物乳杆菌J26与副干酪乳杆菌JY56胞外多糖复配的微生物制剂在缓解高脂饮食诱导肥胖小鼠的减肥功能应用及一种含有减肥成分的植物乳杆菌J26与副干酪乳杆菌JY56胞外多糖复配粉剂的制法,可降低由高脂饮食诱导的肥胖小鼠的体重,显著降低肥胖小鼠血清和肝脏中TC、TG、LDL-C和GLU的含量,降低肥胖小鼠血清中的ALT、AST、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 和IFN- $\gamma$ 含量。减轻肥胖小鼠肝脏脂肪变性情况,缓解

炎症细胞浸润和纤维组织增生现象。且本发明的制法使得制备的粉末中含有 $10^9$ CFU/mL植物乳杆菌J26菌粉减肥成分,再通过添加一定比例的具有减肥作用的副干酪乳杆菌JY56胞外多糖与之复配,可显著提升组合物粉剂的减肥作用,并且能够保护植物乳杆菌J26的活性;可见本发明的植物乳杆菌J26与副干酪乳杆菌JY56胞外多糖复配的组合在制备减肥产品中具有巨大的应用前景。

[0025] 本发明公开了一种含有植物乳杆菌J26(植物乳杆菌NDC75017的分类命名为植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum*,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),北京,保藏日期为2011年11月08日,保藏编号为CGMCC NO.5448;植物乳杆菌J26简称*L. plantarum*J26、LJ26或J26;植物乳杆菌TD109简称TD109;植物乳杆菌J26和植物乳杆菌TD109均为植物乳杆菌NDC75017的其他命名,植物乳杆菌J26和植物乳杆菌TD109经序列鉴定与中国发明专利201210552498.3记载的保藏编号为CGMCC No.5448的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)NDC75017系同一株菌,申请人在相关证明文件中提交了植物乳杆菌J26和植物乳杆菌TD109即为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)NDC75017的证明文件,故本发明用植物乳杆菌J26来代表植物乳杆菌NDC75017)的组合物,采用响应面法优化副干酪乳杆菌JY56胞外多糖(EPS)的提取工艺,同时考察了EPS对植物乳杆菌J26体外生长情况的影响,明确了按照质量比例1:1加入0.3mg/mL的副干酪乳杆菌JY56胞外多糖。本发明的组合物能对植物乳杆菌J26体外生长情况具有一定的促进作用。当EPS作为唯一碳源时,0.3mg/mL的EPS能够促进植物乳杆菌J26生长,此时活菌数高达 $3.92 \times 10^9$ CFU/mL。经扫描电镜观察,当EPS作为唯一碳源培养时,植物乳杆菌J26表观形状丰满,边缘清晰,组合物对功能性益生菌植物乳杆菌J26具有促进生长和保护活性的作用。本发明还公开了一种含有植物乳杆菌J26的组合物在减肥产品中的应用。本发明可显著提升植物乳杆菌J26的减肥作用;在制备减肥的产品中具有巨大的应用前景。

## 附图说明

[0026] 图1为葡萄糖标准曲线图;

[0027] 图2为发酵条件对副干酪乳杆菌JY56胞外多糖EPS产量的影响,其中,(a)为发酵温度对EPS产量的影响,(b)为发酵时间对EPS产量的影响,(c)为初始pH对EPS产量的影响;

[0028] 图3为发酵温度、时间和pH的响应面和等高线结果图,其中,(a)为发酵温度和时间对EPS产量的影响,(b)为发酵时间和初始pH对EPS产量的影响,(c)为发酵温度和初始pH对EPS产量的影响;

[0029] 图4 为不同培养基中植物乳杆菌J26的生长曲线;

[0030] 图5为不同培养基培养植物乳杆菌J26的扫描电镜图片,其中,(a):10000倍MRS培养基;(b):20000倍MRS培养基;(c):10000倍EPS替换葡萄糖;(d):20000倍EPS替换葡萄糖;

[0031] 图6为EPS、植物乳杆菌J26和菌糖复合组对高脂饮食小鼠体重、肝重和肝脏系数的影响图,其中,(a):体重;(b):体重增量;(c):肝重;(d):肝脏系数;

[0032] 图7为EPS、植物乳杆菌J26和菌糖复合组对高脂饮食小鼠血脂水平的影响图,其中,(a):TC;(b):TG;(c):LDL-C;(d):GLU;

[0033] 图8为EPS、植物乳杆菌J26和菌糖复合组对高脂饮食小鼠肝脏中转氨酶活性的影响图,其中,(a):ALT;(b):AST;

[0034] 图9为EPS、植物乳杆菌J26和菌糖复合组对高脂饮食小鼠炎性细胞因子的影响图,其中,(a):TNF- $\alpha$ ; (b):IL-6; (c):IL-1 $\beta$ ; (d):IFN- $\gamma$ ;

[0035] 图10为不同饮食条件下小鼠肝脏的照片,其中,(a):NC组;(b):HFD组;(c):J26组;(d):EPS组;(e):JEC组;

[0036] 图11为不同饮食条件下小鼠肝脏的H&E染色图,其中,(a):NC组;(b):HFD组;(c):J26组;(d):EPS组;(e):JEC组;

[0037] 图12为不同饮食条件下小鼠肝脏的油红O染色图,其中,(a):NC组;(b):HFD组;(c):J26组;(d):EPS组;(e):JEC组;

[0038] 图13 为副干酪乳杆菌JY56的菌株形态图。

## 具体实施方式

[0039] 下面结合附图对本发明作更进一步的说明。

[0040] 本发明中,植物乳杆菌J26的拉丁名为*Lactobacillus plantarum*J26,分离自内蒙古通辽地区牧民自制发酵酸奶,本发明中的植物乳杆菌J26的现有技术来源为:202110967660.7,一株具有降胆固醇功能的植物乳杆菌的应用,申请公布日:2021.11.05,申请公布号:CN113598375 A。

[0041] 副干酪乳杆菌JY56的拉丁名为*Lacticaseibacillus paracasei* JY56,保藏于广东省微生物菌种保藏中心保藏,保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼广东省科学院微生物研究所,保藏编号为GDMCC NO:62988。

[0042] 实施例1

[0043] 一种植物乳杆菌J26组合物,所述组合物为微生物粉剂,所述微生物粉剂为植物乳杆菌J26菌粉与副干酪乳杆菌JY56胞外多糖的组合物。

[0044] 采集方法:副干酪乳杆菌JY56分离自西藏传统发酵乳制品,采集液体发酵乳时,先将乳样搅匀,用无菌移液器吸取1.5mL样本放入灭菌的冻存管中(含有灭菌中和剂,淀粉:碳酸钙为50:1),混匀后封口,对样品进行标记。当采集固体发酵乳样品(如奶渣)时,取5.0g左右样品放入灭菌的冻存管中,对样品进行标记。将采集的发酵乳样品立即放入4℃冷藏保温。

[0045] 副干酪乳杆菌JY56分离自西藏传统发酵乳制品,菌株形态:如图13所示,副干酪乳杆菌JY56菌体呈杆状、单个或成对排列,菌株的菌落和菌体形态符合副干酪乳杆菌特征。

[0046] 植物乳杆菌J26可作为功能性食品、药品或保健品成分。

[0047] 植物乳杆菌J26的菌泥的制法中,发酵罐中设置有脱脂乳粉培养基。

[0048] 脱脂乳粉培养基按重量百分比计组分配制而成:0.25%麦芽糖、0.02%氯化钠、0.8%醋酸钠、2~3%蛋白胨、2~3%牛肉膏、2~3%酵母膏、8%葡萄糖、0.35%柠檬酸二铵、0.15%磷酸氢二钾、0.08%硫酸镁、0.03%硫酸锰、0.03%硫酸亚铁、10%为脱脂奶粉和余量的水。

[0049] 植物乳杆菌J26的菌泥的制法中,液体发酵环境为:温度35~37℃,湿度65~70%,pH值<7,通氧气体量0.7~1.5vvm,搅拌机功率1.5~2kwh/m<sup>3</sup>。

[0050] 具有减肥作用的植物乳杆菌J26组合物的制法如下:取活化后的植物乳杆菌J26菌株,以5%或7%的接种量接种于200mL脱脂乳粉培养基,37℃扩大培养14h后,以5%或7%的接种量在容积为4L的发酵罐进行高密度发酵。高密度发酵为在液体培养中的细胞密度超过常规

培养10 倍以上的发酵14h,得到含有 $10^9$ CFU/mL活菌数的菌泥,通过与0.3mg/mL的副干酪乳杆菌JY56胞外多糖(纯度为 $98.791\mu\text{g}/\text{mL}$ )按照比例1:1进行复配,均质后冷冻干燥,从而获得植物乳杆菌J26与副干酪乳杆菌JY56胞外多糖的组合物。

[0051] 胞外多糖纯度检测方法:

[0052] 制作葡萄糖标准曲线:首先精确称量无水葡萄糖50mg,加入适量去离子水制成0.1mg/mL的葡萄糖溶液,分别吸取0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL标准溶液于试管中,各加蒸馏水定容至100mL,同时加1.0mL蒸馏水置于另一试管中,做空白对照。以上试管分别添加新制6%苯酚溶液1mL,震荡混匀,然后添加浓硫酸5mL,混匀,在室温条件下静置30min,再测定其 $A_{490}$ 。以葡萄糖含量作为横坐标,纵坐标设定为 $A_{490}$ ,如图1所示,绘制出葡萄糖标准曲线。

[0053] 称取1mg胞外多糖样品,溶解在10mL蒸馏水中,吸取样品液1.0mL,替换以上方案中的葡萄糖溶液,用苯酚-硫酸法测定 $A_{490}$ ,再根据标准曲线计算糖含量。纯度=糖含量/样品量 $\times 100\%$ 。

[0054] 副干酪乳杆菌JY56胞外多糖的制备方法:在pH为6.0的条件下,接种5%的副干酪乳杆菌JY56至MRS培养基上,在 $30^\circ\text{C}$ 温度条件下发酵26h,胞外多糖的产量达 $5.88\text{mg}/\text{mL}$ ,且胞外多糖的纯度为 $98.791\mu\text{g}/\text{mL}$ 。上述制备方法的优化工艺如下:

[0055] 副干酪乳杆菌JY56胞外多糖发酵条件的优化:包括如下的发酵温度的优化,发酵时间的优化和发酵pH的优化。

[0056] 副干酪乳杆菌JY56胞外多糖的最佳发酵温度:

[0057] 设定初始pH为6.0,接种5%的副干酪乳杆菌JY56,分别在20、25、30、35、 $40^\circ\text{C}$ 温度条件下发酵24h,测定胞外多糖EPS生成量,明确制备胞外多糖EPS的最佳发酵温度。

[0058] 副干酪乳杆菌JY56胞外多糖的最佳发酵时间:

[0059] 采用上述最适发酵温度的试验结果,设定培养基初始pH为6.0,接种5%的副干酪乳杆菌JY56,分别发酵5h、15h、25h、35h和45h,测定其胞外多糖EPS生成量,明确制备胞外多糖EPS的最佳发酵时间。

[0060] 副干酪乳杆菌JY56胞外多糖的发酵pH:

[0061] 采用上述最适发酵温度、发酵时间的试验结果,分别设定培养基的初始pH为4.0、5.0、6.0、7.0及8.0,接种5%的副干酪乳杆菌JY56,测定其胞外多糖EPS生成量,明确制备胞外多糖EPS的最佳发酵pH。

[0062] Box-Behnken试验设计优化发酵条件:

[0063] 结合单因素试验的结果,采用Box-Behnken试验优化影响胞外多糖EPS的环境条件。选取发酵温度、发酵时间、pH为自变量,分别设为A,B,C,设置低、中、高水平(-1、0、+1),响应值设为发酵得到的胞外多糖EPS的浓度,设定三次平行,取平均值分析,Box-Behnken试验设计见表1。

[0064] 表1 Box-Behnken试验设计表

	水平	因素		
		A (发酵温度, °C)	B(发酵时间, h)	C (pH)
[0065]	-1	25	15	5.0
	0	30	25	6.0
	+1	35	35	7.0

[0066] 二、实验结果

[0067] 发酵条件的优化:

[0068] 如图2(a)所示,当发酵温度为30°C时,胞外多糖EPS的产量达到最大值,为4.82mg/mL。表明发酵温度为30°C时为较为理想的发酵温度。但是不同温度下EPS产量的变化趋势没有统计学意义,仍然需要通过试验来探索胞外多糖EPS生物合成的其他制备条件。

[0069] 发酵时间对胞外多糖EPS产量的影响结果如图2(b)所示,分别在发酵5、15、25、35及45h时测定胞外多糖EPS的产量,在发酵25h时,胞外多糖EPS产量达到最大值,在发酵前25h内,胞外多糖EPS的合成量不断累积,表明胞外多糖EPS还在合成产出初期,发酵时间较短时,胞外多糖EPS作为代谢产物处于累积期。在发酵25h时,胞外多糖EPS的合成逐渐稳定且维持最大合成量,胞外多糖EPS产量5.17mg/mL。在发酵时间为25-45h期间,随着发酵时间的延长导致胞外多糖EPS产量不断减少,这可能是由于胞外多糖EPS的水解。当发酵时间较长时,菌株进入衰亡期并分解部分胞外多糖EPS,导致胞外多糖EPS产量降低。

[0070] 发酵初始pH可以通过影响微生物合成胞外多糖EPS的相关酶活性来影响胞外多糖EPS的产量,发酵pH对胞外多糖EPS产量的影响结果如图2(c)所示,从图中可以看到 pH值在增加胞外多糖EPS产量方面也可能起重要的调节作用。在pH为6.0时,胞外多糖EPS的产量达到最高值5.53mg/mL。发现菌株适宜产生胞外多糖EPS的环境为偏酸性的环境条件,偏高的初始发酵pH条件下不适合副干酪乳杆菌JY56的生长繁殖,并对其代谢产物积累产生不利影响。

[0071] 响应面试验优化胞外多糖制备条件:

[0072] 回归方程的参数分析:

[0073] Box-Behnken试验结果见表2,其中A、B、C分别代表发酵温度、发酵时间、pH,响应值为胞外多糖EPS的产量。

[0074] 表2 Box-Behnken试验结果表

试验号	编码因素值			响应值 (mg/mL)
	A (°C)	B (h)	C	
1	-1	-1	0	0.89
2	0	-1	-1	1.54
3	-1	0	-1	0.68
4	1	0	1	1.12
5	-1	1	0	1.11
6	1	-1	0	1.13
7	1	1	0	1.12
[0075] 8	0	0	0	5.16
9	0	-1	1	2.32
10	0	0	0	5.82
11	0	0	0	5.57
12	1	0	-1	2.32
13	0	1	1	1.16
14	0	1	-1	2.15
15	-1	0	1	2.90
16	0	0	0	5.49
17	0	0	0	5.37

[0076] 应用Design-Expert 10.0,对结果进行处理分析,从而得到关于胞外多糖EPS产量的回归方程模型。经整理,得到方差分析与可信度检验结果如下表3。

[0077] 表3 响应面模型方差分析结果

Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	55.39	9	6.14	66.15	< 0.0001	significant
A-发酵温度	0.031	1	0.024	0.26	0.6108	
B-发酵时间	0.58	1	0.63	6.48	0.0383	
C-pH	0.12	1	0.13	1.11	0.3212	
AB	0.15	1	0.16	1.90	0.2235	
AC	0.21	1	0.18	2.16	0.1839	
BC	4.890E-003	1	4.900E-003	0.055	0.8262	

[0078]

A <sup>2</sup>	15.52	1	15.37	165.56	< 0.0001	
B <sup>2</sup>	16.87	1	16.81	179.68	< 0.0001	
C <sup>2</sup>	16.59	1	16.39	176.10	< 0.0001	
Residual	0.69	7	0.089			
Lack of Fit	0.38	3	0.15	2.13	0.2437	not significant
Pure Error	0.24	4	0.065			
Cor Total	56.19	16				

[0079] 方差分析表明,该模型高度显著,失拟项P值为0.2437,大于0.05,表现为不显著,因此模型选择正确。在试验设计水平范围内,二次项对胞外多糖EPS产量的影响极其显著,B项的影响达到显著水平,而A、C与交互项对胞外多糖EPS产量的影响不显著。一次项因素显著性排序依次为:发酵时间>初始pH>发酵温度。

[0080] 根据单因素实验,使用Box-Behnken设计的RSM筛选了三个影响因素进行评估,包括A(发酵温度),B(发酵时间)和C(初始pH)。结果显示胞外多糖EPS的产量在0.68至5.82mg/mL之间变化。通过使用Design-Expert 10.0分析数据,建立了二阶多项式:

[0081]  $Y=10.74+0.057A+0.28B+0.12C-0.21AB+0.22AC-0.035BC-1.92A^2-2B^2-1.98C^2$ 。

[0082] 该模型的 $R^2=0.9884$ ,校正后的 $R^2_{ADJ}=0.9734$ ,说明该模型拟合效果较好,可用其预测菌株副干酪乳杆菌JY56产生胞外多糖EPS的实际发酵过程,根据方差分析(ANOVA),检查了模型的统计显著性。由于 $P_{model}>F$ 低于0.0001,P为0.2437。模型与实际试验之间有很好的的一致性。在模型的三个变量中,变量之间及其自身的所有相互作用在统计上都非常显著。另外,B(发酵时间)对胞外多糖EPS产量有显著影响,发酵时间是影响胞外多糖EPS产量的主要因素,初始pH和发酵温度是影响胞外多糖EPS产量的次要因素。

[0083] 胞外多糖产量的响应面分析:

[0084] 根据响应面3D图及等高线形状可判断变量间相互作用是否明显,三维响应面和相应的等高线图显示了三个变量之间的相互作用及其对胞外多糖EPS产量的影响,各因素对菌株胞外多糖EPS产量的影响程度如图3所示。如图3(a)所示,胞外多糖EPS的产量在一定发酵温度和发酵时间范围内得到提高。根据图3(b)所示,胞外多糖EPS的产量随着初始pH值和发酵时间的增加而增大,并分别在初始pH为6.0和发酵时间为25h后开始减少。在图3(c)中也看到了类似的趋势,发酵时间存在的显著影响(当分析其中两个因素时,另一个因素被设置为中心值)。通过以上分析,编码变量的最佳值为 $A=0.013$ , $B=0.068$ 和 $C=0.029$ 。因此,在 $30.04^{\circ}\text{C}$ ,pH 6.01的条件下发酵25.82h可获得胞外多糖EPS的最大产量,预测胞外多糖EPS的产量为 $5.91\text{mg/mL}$ 。将这些值调整为发酵温度 $30^{\circ}\text{C}$ ,发酵时间26h和pH 6.0,以满足实际的胞外多糖EPS产生情况。在这些条件下,进行了验证模型试验,胞外多糖EPS的实际产量为 $5.88\text{mg/mL}$ ,与理论产量差值为0.5%,说明该模型能够较好地模拟发酵培养过程中副干酪乳杆菌JY56的胞外多糖EPS产量变化。结果表明该制备条件模型可刺激胞外多糖EPS的合成过程,提高胞外多糖EPS的产量。此外,通过优化培养基碳源、发酵时间、发酵温度、初始pH,胞外多糖EPS的产量从 $0.68\text{mg/mL}$ 提高到 $5.88\text{mg/mL}$ ,增加了7.64倍,且胞外多糖EPS的纯度由 $80.415\mu\text{g/mL}$ 提升到 $98.791\mu\text{g/mL}$ 。

#### [0085] 实施例2

[0086] 具有减肥作用的植物乳杆菌J26组合物的制法:取活化后的植物乳杆菌J26菌株,以5%的接种量接种于200mL脱脂乳粉培养基, $37^{\circ}\text{C}$ 扩大培养14h后,以5%的接种量进行4L高密度发酵,发酵14h,离心得到含有 $10^9\text{CFU/mL}$ 活菌数的菌泥,通过与副干酪乳杆菌JY56胞外多糖(纯度 $98.791\mu\text{g/mL}$ ;浓度 $0.3\text{mg/mL}$ )按照比例1:1进行复配,均质后冷冻干燥,获得植物乳杆菌J26与副干酪乳杆菌JY56胞外多糖的组合物。

[0087] 副干酪乳杆菌JY56胞外多糖对植物乳杆菌J26生长情况的影响:

[0088] 以不同浓度胞外多糖EPS为单一碳源,替换MRS培养基(MRS培养基成分为:蛋白胨1%、牛肉膏1%、酵母膏0.5%、柠檬酸氢二铵0.2%、葡萄糖2%、吐温80 0.1%、乙酸钠0.5%、磷酸氢二钾0.2%、硫酸镁0.05%、硫酸锰0.025%、琼脂1.5%和蒸馏水92.925%)里面的葡萄糖,对植物乳杆菌J26进行体外培养。以MRS培养基和副干酪乳杆菌JY56胞外多糖(EPS)为单一碳源的MRS培养基作为对照。通过对不同培养基中植物乳杆菌J26的生长曲线进行测定(图4),无糖MRS培养基中(0.0% EPS,即无EPS)因为没有碳源,植物乳杆菌J26几乎不生长。而在含有 $0.1\text{mg/mL}$ 的EPS培养基中,由于糖的含量较低,植物乳杆菌J26的生长速度比较缓慢,且在18h后不再生长。随着糖含量的增加(由 $0.2\text{mg/mL}$ 增长至 $0.3\text{mg/mL}$ 时),植物乳杆菌J26长势越来越好,菌株在24h生长到对数期。当培养基中EPS浓度为 $0.3\text{mg/mL}$ 时,植物乳杆菌J26的生长量最好。

[0089] 如表4所示,植物乳杆菌J26在含有不同浓度的EPS的培养基中,活菌数有显著差异,且体外培养时, $0.3\text{mg/mL}$ 含量的EPS浓度最适合植物乳杆菌J26生长。在体外纯培养的条件下,EPS浓度不宜过高,可能是EPS浓度超过 $0.3\text{mg/mL}$ 以上会造成培养基内渗透压过高则不利于菌体生长。 $0.3\text{mg/mL}$ 含量的EPS作为唯一碳源培养植物乳杆菌J26时活菌数高达 $3.92 \times 10^9\text{CFU/mL}$ ,高于MRS培养基中的活菌数 $2.69 \times 10^8\text{CFU/mL}$ 。说明EPS能够被益生菌利用,且具有潜在的益生元特性。

[0090] 表4不同培养基中植物乳杆菌J26的活菌数

组别	菌落数 (CFU/mL)
MRS	$2.69 \times 10^8$
无 EPS	$2.06 \times 10^3$
[0091] 0.1mg/mL EPS	$6.82 \times 10^5$
0.2mg/mL EPS	$1.07 \times 10^6$
0.3mg/mL EPS	$3.92 \times 10^9$
0.4mg/mL EPS	$2.49 \times 10^7$
0.5mg/mL EPS	$1.47 \times 10^7$

[0092] 副干酪乳杆菌JY56胞外多糖对植物乳杆菌J26形态的影响:

[0093] 通过扫描电镜分别观察以葡萄糖和EPS作为唯一碳源培养时,植物乳杆菌J26的表观形态(图5)。可以观察到MRS培养基和EPS培养基对菌体表面形态几乎没有影响。植物乳杆菌J26形状丰满,边缘清晰。然而,在图5中,可以看到一些不规则的细小碎片附着在植物乳杆菌J26的表面(红色箭头标记处),这可能是由于EPS没有完全分解代谢并附着在植物乳杆菌J26的表面上,可对植物乳杆菌J26具有一定的保护作用。这表明EPS对植物乳杆菌J26的菌体形态无负面影响,EPS可用作潜在的益生元。

[0094] 实施例3:

[0095] 利用以下实验验证实验效果:

[0096] 小鼠的饲养与分组:

[0097] 选用50只雄性C57BL/6J小鼠( $20 \pm 2$  g,4周龄)。小鼠的生长条件为温度 $22 \pm 2$  °C、相对湿度 $55 \pm 10\%$ 和12 h光/暗循环。适应喂养1周后,随机分为以下5组:正常组(NC组)、高脂饮食组(HFD组)、植物乳杆菌J26灌胃组(J26组)、副干酪乳杆菌JY56胞外多糖灌胃组(EPS组)、菌糖复合灌胃组(JEC组),每组10只。NC组喂正常饲料,其他组喂高脂饲料。正常饮食和高脂饮食购自北京科奥协利有限公司。正常饲料配方:玉米,豆粕,鱼粉,面粉,酵母粉,植物油,食盐,多种维生素和矿物元素。高脂饲料配方:38%正常饮食+20%猪油+10%大豆油+10%蔗糖+10%麦芽糖糊精+10%蛋黄粉+1.8%胆固醇+0.2%胆盐。

[0098] 植物乳杆菌J26灌胃剂量和EPS灌胃剂量见表5。在为期10周的干预实验中,小鼠可以自由进食和饮水。具体灌胃方法见表5。实验过程中,每周称一次小鼠体重并记录。记录小鼠平均进食量。

[0099] 灌胃10周后,小鼠禁食12 h,然后眼球取血,颈椎脱臼致死。立刻取出小鼠的肝脏,用生理盐水冲洗肝脏表面血水,用滤纸吸干表面后称重。小鼠血液在3000 r/min,4 °C条件下离心10min,上清液即为血清。盲肠内容物、血清和肝脏在液氮中速冻5 min,然后储存在-80 °C条件下直至实验。肝脏系数即为肝重与体重之比。

[0100] 表5 高脂饮食小鼠的分组和灌胃方法

组别	组名	每日灌胃方法
正常饮食	NC	0.2 mL PBS
高脂饮食	HFD	0.2 mL PBS
[0101] 植物乳杆菌 J26 干预组	J26	0.2 mL PBS+ $1 \times 10^9$ cfu/mL的植物乳杆菌 J26
副干酪乳杆菌 JY56 胞外多糖干预组	EPS	0.2 mL PBS+300 mg/kg.bw EPS
菌糖复合干预组	JEC	0.2 mL PBS+ $1 \times 10^9$ cfu/mL的植物乳杆菌 J26+300 mg/kg.bw EPS

[0102] 小鼠血清生化指标的测定:

[0103] 采集的小鼠血液在室温下放置2h,然后在4℃、3000r/min条件下离心10min,收集血清。根据试剂盒说明检测小鼠的血脂水平,检测的指标包括总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、血糖(GLU)、谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)的含量。确定高脂饮食小鼠的血脂、血糖水平以及肝损伤情况。

[0104] 小鼠肝脏生化指标的测定:

[0105] 按照肝脏重量(g):体积(mL)=1:9(m:v)的比例加入PBS缓冲液(0.1mol/L,pH=7.4),在冰水浴的条件下匀浆,然后4℃、2500r/min条件下离心10min,取上清液,根据试剂盒说明检测小鼠肝脏中TC、TG、GLU、ALT和AST的含量,确定小鼠肝脏中脂质蓄积情况以及肝脏损伤情况。

[0106] 炎性细胞因子的测定:

[0107] 通过酶联免疫分析试剂盒测定小鼠血清中的TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 和IFN- $\gamma$ 的含量。小鼠血清采集后要尽快进行实验,避免反复冻融影响测定结果。操作步骤和上样量按照试剂盒说明书操作。准备各个试剂盒中的试剂,标准品和小鼠血清。在酶标板中加入标准品和小鼠血清,封板膜封板,并于37℃温育30min,每孔用洗涤液洗板30s,洗涤5次并拍干。加入酶标试剂,重复上述温育30min和洗板5次的过程。加入显色液,37℃显色10min,加入终止液,在15min之内测定OD值,并计算小鼠血清中的炎性细胞因子水平。

[0108] 小鼠肝脏病理学观察:

[0109] 大体观察:

[0110] 小鼠宰杀后,对小鼠肝脏进行表面颜色、光泽观察,并通过触摸初步判断肝脏质地。

[0111] H&E染色:

[0112] 苏木精-伊红法(H&E染色):首先将样品修整至 $0.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{cm}^3$ 大小,将肝组织切片固定在10%中性甲醛溶液中,并用不同浓度的乙醇对肝脏组织进行脱水、石蜡包埋,用切片机切片,染色前,脱去切片中的石蜡,再用不同浓度乙醇冲洗,最后一遍冲洗用蒸馏水。

通过光学显微镜观察肝细胞的脂质沉积和炎性浸润的情况。

[0113] 油红O染色:

[0114] 将足量油红O溶于100mL异丙醇配置成油红O饱和溶液,油红O饱和液和蒸馏水按照1:2混合,过滤备用。将肝脏切片用甲醛-钙固定10min,蒸馏水冲洗,然后60%异丙醇浸洗后用油红O染液染色10min,60%异丙醇洗至背景无色,再用蒸馏水冲洗,Mayer苏木精复染,蒸馏水洗净后甘油明胶封片。组织细胞中脂滴呈橘红色,核呈蓝色。

[0115] 7、数据处理及统计学分析:

[0116] 所有实验数据均使用SPSS软件进行单因素方差分析,使用GraphPad Prism 8.02进行绘图分析。实验结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示, $P<0.05$ 代表差异显著。

[0117] 二、实验结果

[0118] 1. 小鼠体内降脂作用:

[0119] 小鼠体重、肝重和肝脏系数的变化:

[0120] 为了研究EPS、植物乳杆菌J26和菌糖复合对高脂饮食的小鼠生理状况的影响,在喂养期间每周监测小鼠的体重。结果表明,所有小鼠均处于生长期,体重一直在增加。从图6中可以观察到,正常组(NC组)小鼠在实验的第1周~第6周体重增加比较快,第7周~第10周体重增加缓慢。高脂饮食组(HFD组)的小鼠体重始终高于NC组。由于摄入高脂饮食,第1周~第3周植物乳杆菌J26干预组(J26组)、副干酪乳杆菌JY56胞外多糖干预组(EPS组)、菌糖复合干预组(JEC组)小鼠体重增加较快,但是第4周以后,三个干预组的小鼠体重明显低于HFD组,表明EPS、植物乳杆菌J26和菌糖复合干预逐渐生效,抑制了体重的增加。如图6(b)所示,经饮食干预10周后,与初始体重相比,NC组小鼠的体重增加 $4.87 \pm 1.52\text{g}$ ,HFD组体重增加 $7.81 \pm 1.32\text{g}$ ,这说明高脂饮食可以导致小鼠体重显著增加( $P<0.05$ )。J26组、EPS组和JEC组的体重增加分别为 $7.55 \pm 0.79\text{g}$ 、 $7.69 \pm 1.81\text{g}$ 和 $6.55 \pm 0.71\text{g}$ 。结果表明,植物乳杆菌J26、EPS和菌糖复合的膳食干预能不同程度地减缓体重增加,其中菌糖复合组效果更显著。

[0121] 肝重在一定程度上反映了肝脏中脂肪的堆积情况,肝脏过于肿大会影响小鼠正常的肝脏功能。因此,小鼠宰杀后,立马取出肝脏进行称重。如图6(c)所示,NC组、HFD组、J26组、EPS组和JEC组的肝重分别为 $1.0 \pm 0.06\text{g}$ 、 $1.5 \pm 0.89\text{g}$ 、 $1.2 \pm 0.056\text{g}$ 、 $1.3 \pm 0.072\text{g}$ 和 $1.09 \pm 0.091\text{g}$ 。JEC组的肝重显著低于HFD组( $P<0.05$ )。说明JEC组能够缓解由于长期摄入高脂饮食造成的肝脏脂肪堆积,并且基本可以恢复到正常水平。

[0122] 肝脏系数是肝重与体重的比值,肝脏系数大说明肝组织可能有水肿或者增生肥大的现象。如图6(d)所示,NC组小鼠的肝脏系数为 $4.59 \pm 0.22\%$ ,HFD组为 $5.52 \pm 0.19\%$ ,J26组为 $5.19 \pm 0.22\%$ ,EPS组为 $5.17 \pm 0.23\%$ ,JEC组为 $4.79 \pm 0.31\%$ ,说明与HFD组相比,植物乳杆菌J26和EPS能够不同程度地降低肝脏系数,但是JEC组效果最好( $P<0.05$ )。

[0123] 小鼠进食量的变化:

[0124] 各组小鼠在饲养期间的进食量如表6所示。各组之间小鼠的进食量没有显著差异,说明EPS、植物乳杆菌J26和菌糖复合对小鼠食欲没有负面影响。结合在饲养小鼠期间,每日观察小鼠的生理状况来看,所有小鼠状态正常,比较活跃,未发现萎靡不振、消瘦、腹泻、呕吐、死亡等异常状况。说明EPS、植物乳杆菌J26和菌糖复合对小鼠没有毒害作用。

[0125] 表6 EPS和植物乳杆菌J26对高脂饮食小鼠进食量的影响

时间/周	NC组 (g/天)	HFD组 (g/天)	J26组 (g/天)	EPS组 (g/天)	JEC组 (g/天)
0	3.88±0.37	4.37±0.79	4.31±0.49	3.89±0.89	3.91±1.09
1	3.57±0.15	4.61±0.38	4.42±0.39	4.48±0.89	3.79±0.82
2	4.20±0.19	4.33±0.65	4.09±0.23	3.49±0.12	3.51±0.25
3	3.39±0.21	3.59±0.39	4.57±0.39	4.33±0.28	4.11±0.18
[0126] 4	3.76±0.18	3.45±0.27	4.11±0.21	4.4±0.39	3.52±0.32
5	3.63±0.22	3.87±0.39	3.79±0.23	3.55±0.13	3.86±0.32
6	4.29±0.28	4.75±0.66	4.19±0.18	4.48±0.42	3.71±0.18
7	3.69±0.19	3.59±0.26	3.69±0.32	4.27±0.41	4.18±0.28
8	4.40±0.34	4.51±0.29	3.92±0.14	4.51±0.2	4.41±0.62
9	3.68±0.25	3.91±0.15	4.31±0.22	4.16±0.18	4.28±0.15
10	4.51±0.14	4.25±0.48	4.18±0.32	3.82±0.28	3.66±0.26

[0127] 注:各组小鼠的进食量在实验期间没有显著差异。

[0128] 小鼠血清生化指标的变化:

[0129] 如图7所示,HFD组小鼠血清TC( $4.57 \pm 0.16$  mmol/L)、TG( $1.75 \pm 0.09$  mmol/L)、LDL-C( $0.98 \pm 0.21$  mmol/L)浓度显著高于NC组( $P < 0.05$ )。说明长期饲喂高脂饮食会导致小鼠血脂升高。与HFD组相比,J26组的小鼠血清TC( $3.11 \pm 0.12$  mmol/L)、TG( $1.48 \pm 0.12$  mmol/L)和LDL-C( $0.69 \pm 0.14$  mmol/L)浓度显著降低( $P < 0.05$ )。与HFD组相比,EPS组的小鼠血清TC( $3.09 \pm 0.07$  mmol/L)、TG( $1.37 \pm 0.08$  mmol/L)和LDL-C( $0.80 \pm 0.15$  mmol/L)浓度显著降低( $P < 0.05$ )。说明单独EPS或者植物乳杆菌J26干预对高脂饮食的小鼠也具有降血脂的效果。与HFD组,J26组和EPS组相比,JEC组小鼠血清的TC( $2.37 \pm 0.12$  mmol/L)、TG( $1.21 \pm 0.11$  mmol/L)、LDL-C( $0.44 \pm 0.08$  mmol/L)浓度显著降低( $P < 0.05$ ),说明二者复合的效果更好。结果证明,高脂饮食会引起小鼠的血脂异常,但J26组、EPS组和JEC组小鼠血清中TC,TG,LDL-C的含量与HFD组相比都有不同程度的降低,其中JEC组效果最好。说明EPS和植物乳杆菌J26复合可以防止血脂过高,具有减缓脂质蓄积的作用。

[0130] 此外,长期摄入高脂饮食,小鼠的血糖也可能会产生异常。因此,对各组小鼠的血糖含量进行测定,结果发现HFD组( $4.49 \pm 0.23$  mmol/L)的小鼠血糖也显著高于NC组( $3.21 \pm 0.25$  mmol/L)。但是JEC组( $3.28 \pm 0.19$  mmol/L)的小鼠血糖显著低于HFD组。说明菌糖复合能够降低高脂饮食小鼠的血糖。

[0131] 小鼠肝脏生化指标的变化:

[0132] EPS和植物乳杆菌J26对高脂饮食小鼠肝脏生化指标的影响如图8所示,与NC组的ALT( $56.73 \pm 2.33$  U/L)和AST( $178.31 \pm 5.51$  U/L)含量相比,HFD组的ALT( $158.05 \pm 3.19$  U/L)和AST( $278.35 \pm 6.16$  U/L)含量显著增加( $P < 0.05$ ),HFD组小鼠肝脏中的TC、TG和GLU含量显著高于NC组,说明脂质蓄积会对肝脏产生损伤。JEC组小鼠肝脏中ALT和AST含量分别为

109.14±4.23 U/L和235.25±6.11 U/L,说明菌糖复合对肝脏中脂质蓄积具有一定的改善效果。肝脏生化指标的变化趋势与血清指标的变化趋势相同,从而进一步印证了不同饮食干预,会对小鼠的肝脏损伤情况产生不同的影响,EPS和植物乳杆菌J26复合可能是一种较好的缓解脂质蓄积的手段。

[0133] 小鼠炎性细胞因子的变化:

[0134] 为进一步探究不同饮食干预对高脂饮食小鼠的影响,通过ELISA试剂盒的方法测定各组小鼠血清中的关键炎性细胞因子的含量。脂质蓄积可能会造成机体炎性细胞因子水平升高,如图9所示,HFD组的TNF- $\alpha$  (387.46±5.46 ng/L)、IL-6 (278.82±8.54 ng/L)、IL-1 $\beta$  (31.01±4.37 ng/L)和IFN- $\gamma$  (272.05±9.91 ng/L)含量显著高于NC组 ( $P<0.05$ ),可能是由于脂质过氧化会引起氧化应激并增加了炎性细胞因子的产生。EPS或植物乳杆菌J26的单独干预显著降低了高脂饮食喂养小鼠的炎性细胞因子 ( $P<0.05$ )。更值得关注的是,JEC组小鼠血清中的TNF- $\alpha$  (301.77±9.87 ng/L)、IL-6 (225.39±10.09 ng/L)、IL-1 $\beta$  (21.92±1.58 ng/L)和IFN- $\gamma$  (180.90±8.52 ng/L)含量也明显低于HFD组 ( $P<0.05$ )。且JEC组小鼠血清中的TNF- $\alpha$ 和IL-6含量显著低于J26组和EPS组,说明菌糖复合能有效抑制因脂肪摄入过多引起的炎症,可以减少TNF- $\alpha$ 和IL-6的产生。与EPS或植物乳杆菌J26单独干预相比,菌糖复合干预对高脂饮食喂养小鼠的血清炎性细胞因子产生了更显著的抑制作用。

[0135] 小鼠肝脏病理学观察:

[0136] 高脂饮食小鼠肝脏的表观形态:

[0137] 小鼠宰杀后,立刻取出各组小鼠的肝脏进行表观形态的观察并拍照。如图10所示,发现各组小鼠肝脏表观形态存在明显的差异。NC组的正常小鼠的肝脏呈深红色,肝脏表面比较光滑有光泽,质地比较韧。HFD组小鼠的肝脏呈红棕色,比NC组小鼠肝脏肿大,肝脏表面比较黏腻,可能是由于脂肪含量较高所致。经饮食干预后的J26组、EPS组和JEC组小鼠的肝脏看起来没有HFD组小鼠的肝脏肿大,且质地偏软,黏腻感减轻。JEC组的小鼠肝脏外观颜色与NC组最接近,都是深红色,肝脏表面不再黏腻。肉眼观察的情况下,JEC组小鼠的肝脏外观的改善作用最为明显。具体情况还需要通过H&E染色和油红O染色进行进一步病理分析。

[0138] 高脂饮食小鼠肝脏的H&E染色:

[0139] 通过H&E染色在显微镜下观察肝组织。如图11所示,NC组小鼠的肝细胞排列整齐,肝细胞结构清晰完整,在细胞中未观察到脂肪变性,未观察到炎性细胞浸润的现象。HFD组小鼠的肝脏切片呈网状结构,肝细胞肿胀,可观察到脂肪变性,大量大小不一的脂滴空泡存在(部分脂滴空泡用红色箭头标出),并有炎性细胞浸润的情况。与HFD组相比,J26组的肝细胞肿胀、脂肪变性和炎症情况有所减轻,但仍存在少量脂滴空泡。EPS组的肝细胞脂滴空泡明显减少,炎症减轻。JEC组的肝细胞中未观察到明显的脂滴空泡和坏死细胞,也未观察到炎性细胞浸润现象,基本恢复到正常水平。

[0140] 不同组别的干预对高脂饮食小鼠的肝细胞有不同程度的修复作用,但是JEC组的作用效果最为明显。这与各组小鼠之间血脂和炎性细胞因子水平的变化趋势相符合。

[0141] 高脂饮食小鼠肝脏的油红O染色:

[0142] 通过油红O染色法可以直观地观察到小鼠肝脏中脂质蓄积的情况。如图12所示,NC组的小鼠肝脏基本观察不到红色脂滴。HFD组小鼠由于摄入过多脂质,肝脏中充满红色脂滴,红色脂滴大面积弥漫,聚集堆积到一起。与HFD组相比,J26组和EPS组小鼠肝脏的红色脂

滴面积明显减少,红色部分分散开来。JEC组小鼠肝脏中红色脂滴最少,且红色脂滴呈小颗粒状不规则分布,但并没有完全恢复到正常水平。通过油红O染色观察可知,J26组、EPS组和JEC组的小鼠肝脏中脂质有不同程度的减少,JEC组肝脏中脂质最少,与上述实验小鼠肝脏中TC、TG含量的变化趋势相同。

[0143] 任何利用、使用、销售、许诺销售、生产、制备、培养、扩繁、发酵、加工、组配、混合上述组合物的行为均落入本发明的保护范围。

[0144] 本领域技术人员根据本发明的教导和启发,出于实际生产需要,结合微生物工艺领域常用技术手段选择合适的辅料加以调配,将本发明的上述组合物制成各种符合工艺生产要求的剂型产品,例如,粉剂、片剂、液体剂;还可制成食品,例如,发酵乳制品、发酵豆制品、发酵果蔬制品、发酵肉制品、发酵饮料、益生菌发酵剂、益生菌固体饮料等。所述发酵乳制品包括常温酸奶、低温酸奶、搅拌型酸奶、凝固型酸奶、饮用性酸奶、乳酪、乳酸菌饮料等。

[0145] 根据本发明的内容,出于实际生产应用中的不同需求,再结合药物制备或食品生产加工工艺领域的常规技术手段(例如,《食品生产概论》、《食品与食品生产百科全书》、《食品加工技术》、《制剂技术百科全书》、《药物制剂技术》等),本领域技术人员可对上述药用辅料或食用辅料进行选择 and 调配,并将本发明的上述组合物制成不同的剂型,例如粉剂、片剂、注射剂、口服液等。

[0146] 在更具体的实施例中,所述药用辅料选自:溶剂、抛射剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、着色剂、黏合剂、崩解剂、填充剂、润滑剂、润湿剂、渗透压调节剂、稳定剂、助流剂、矫味剂、防腐剂、助悬剂、包衣材料、芳香剂、抗黏合剂、整合剂、渗透促进剂、pH值调节剂、缓冲剂、增塑剂、表面活性剂、发泡剂、消泡剂、增稠剂、包合剂、保湿剂、吸收剂、稀释剂、絮凝剂、反絮凝剂、助滤剂、释放阻滞剂等。

[0147] 在另一些实施例中,所述食用辅料选自:漂白剂、防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂、酸味剂、增味剂、护色剂等。

[0148] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出:对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

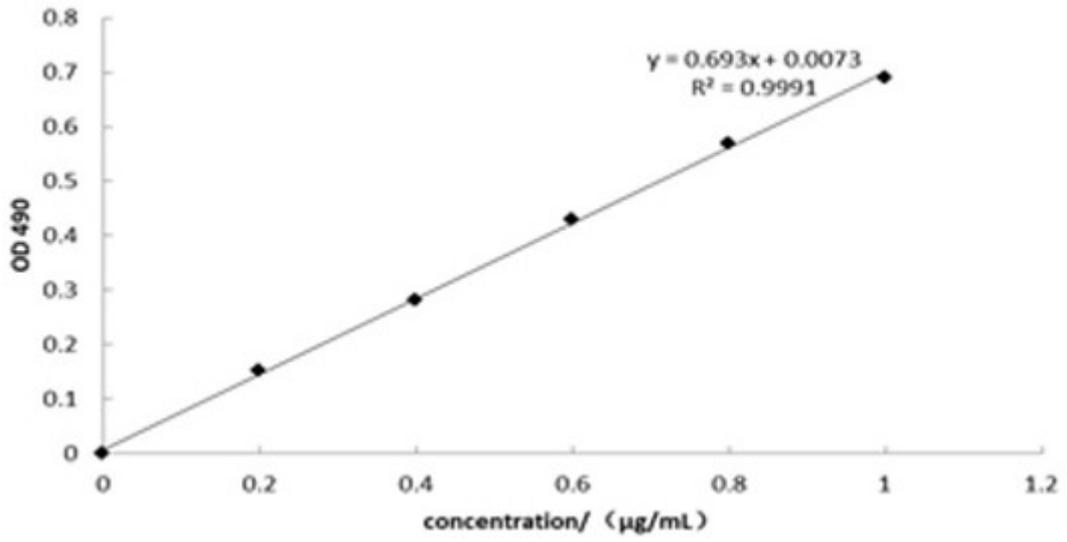


图1

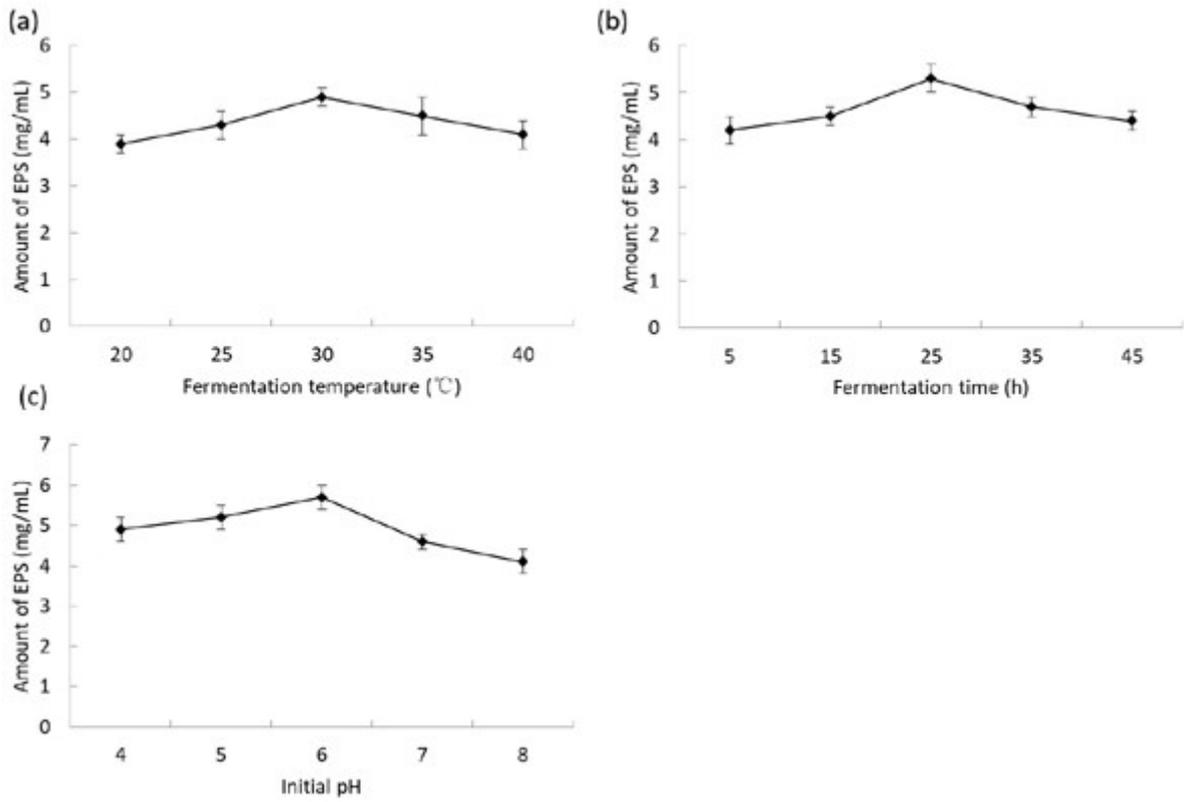


图2

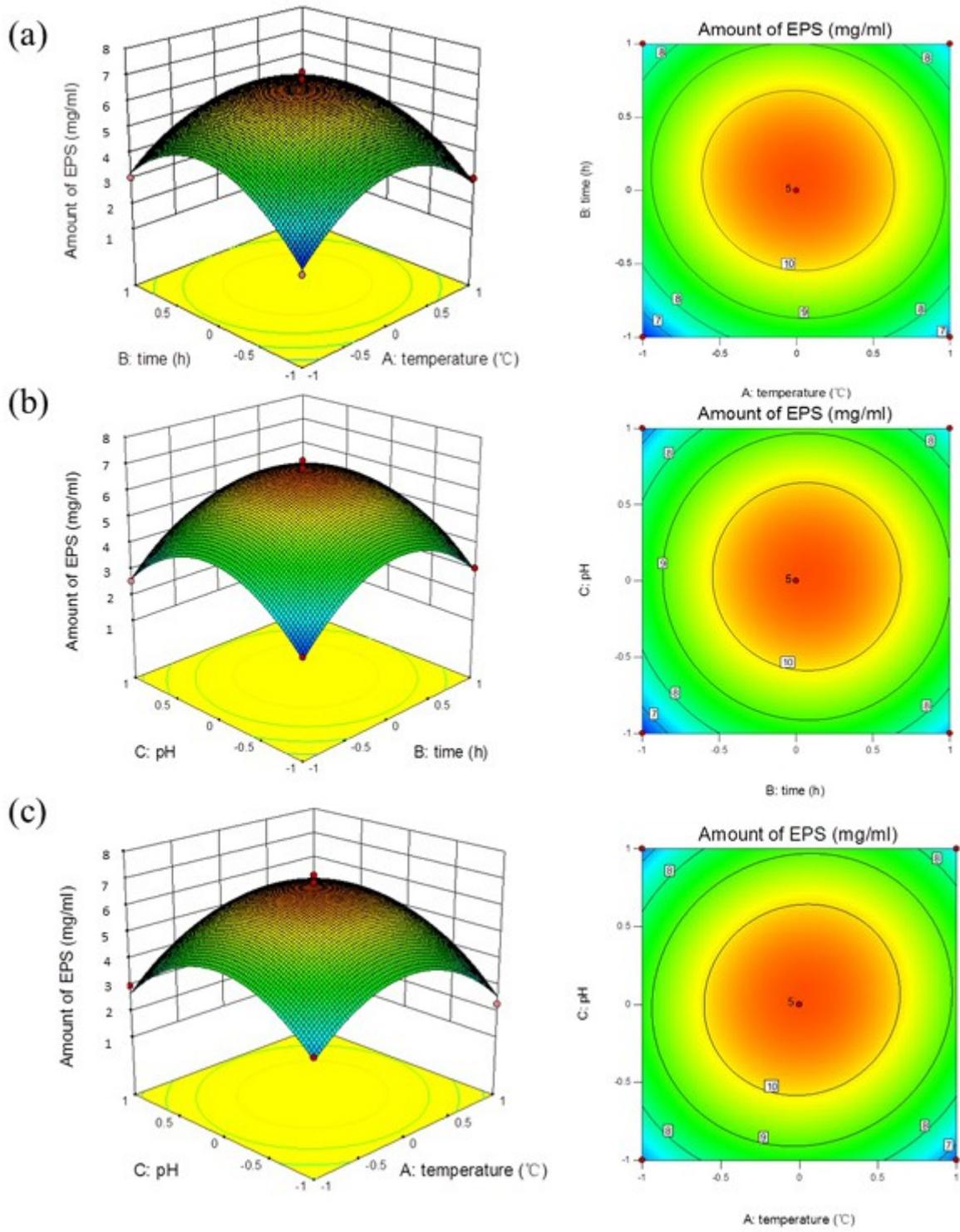


图3

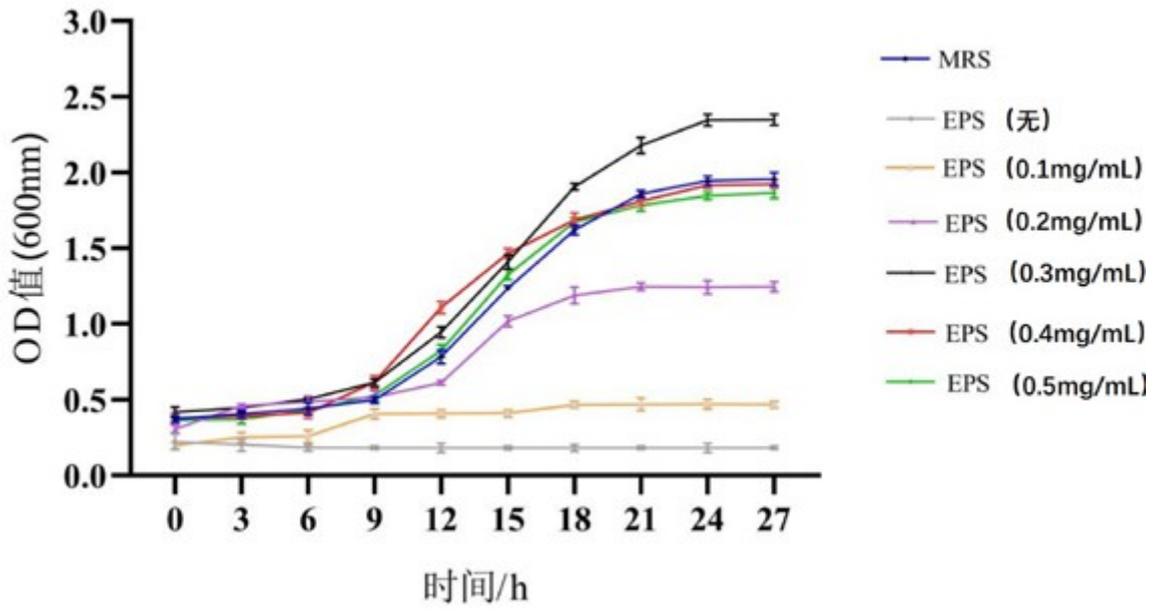


图4

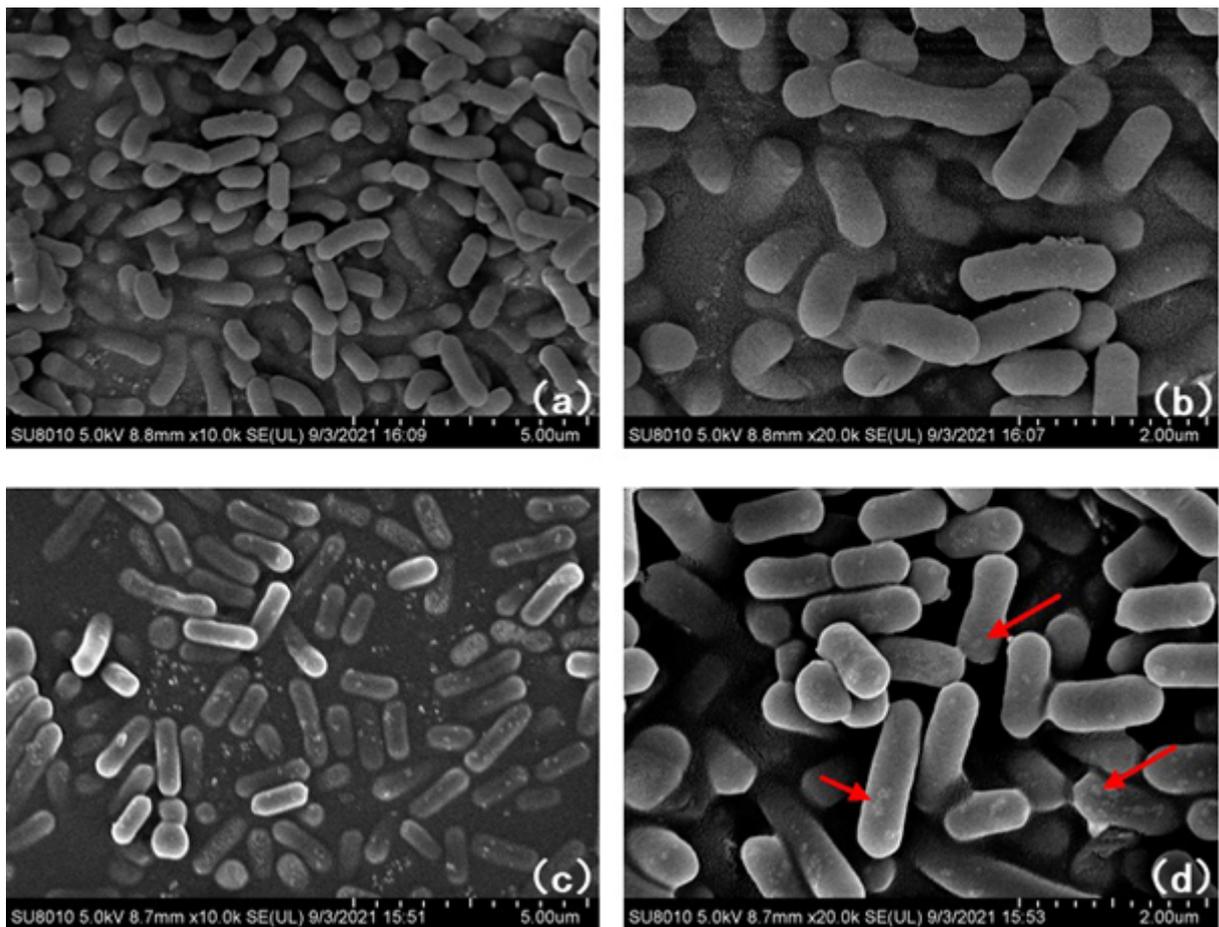


图5

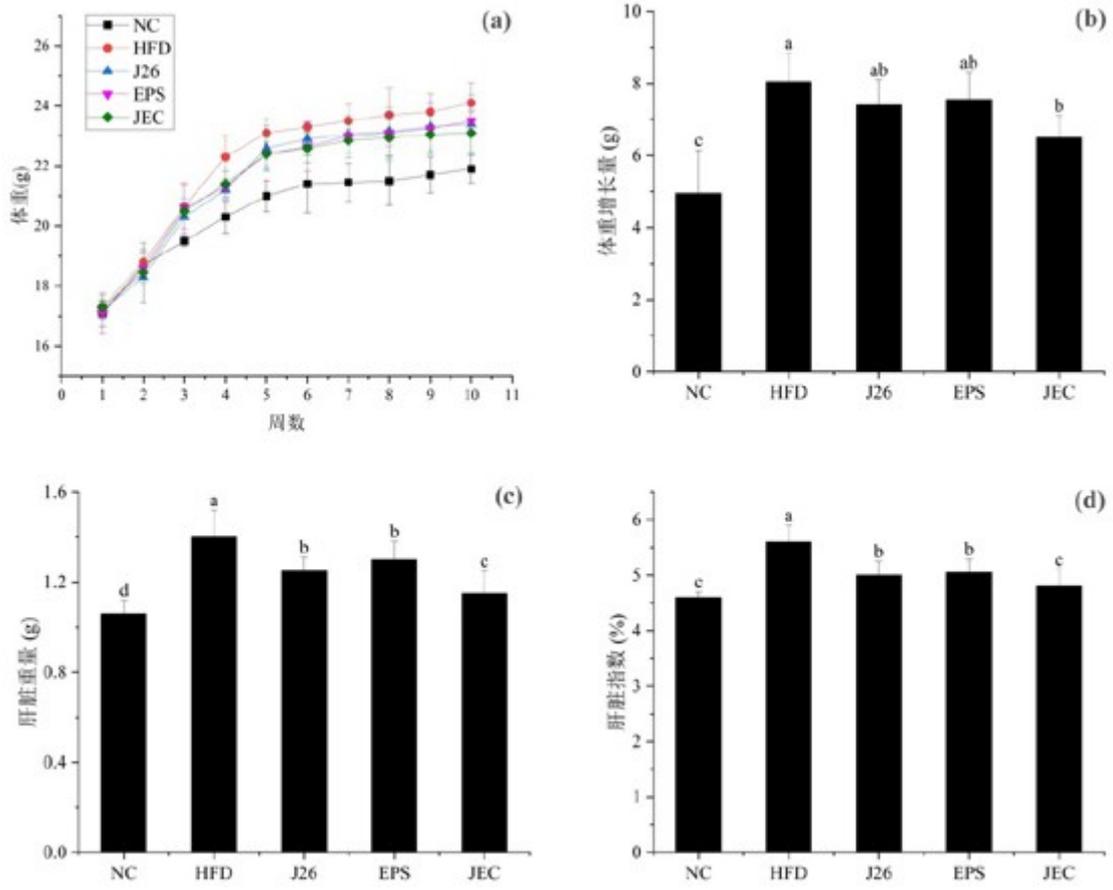


图6

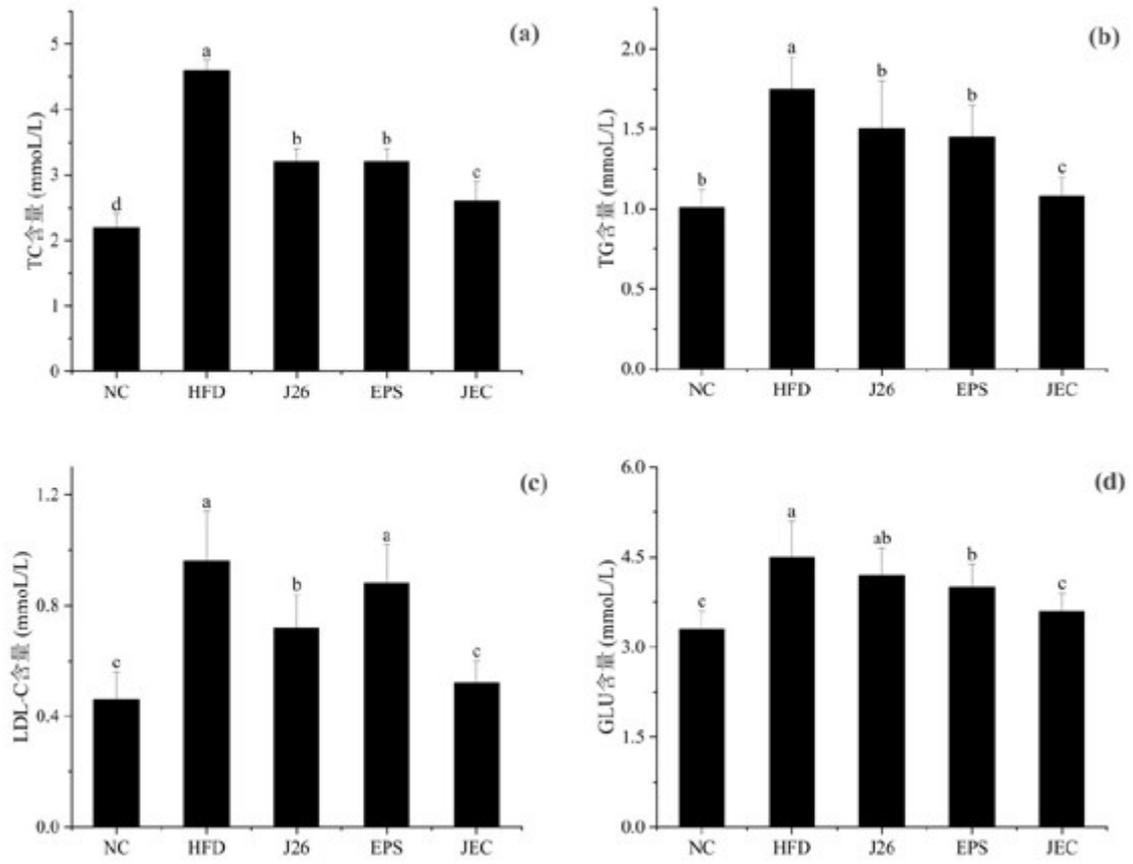


图7

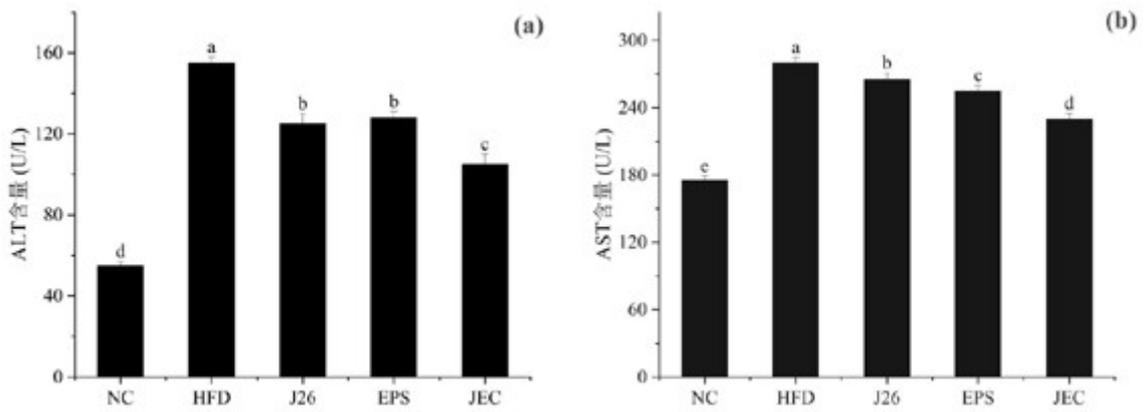


图8

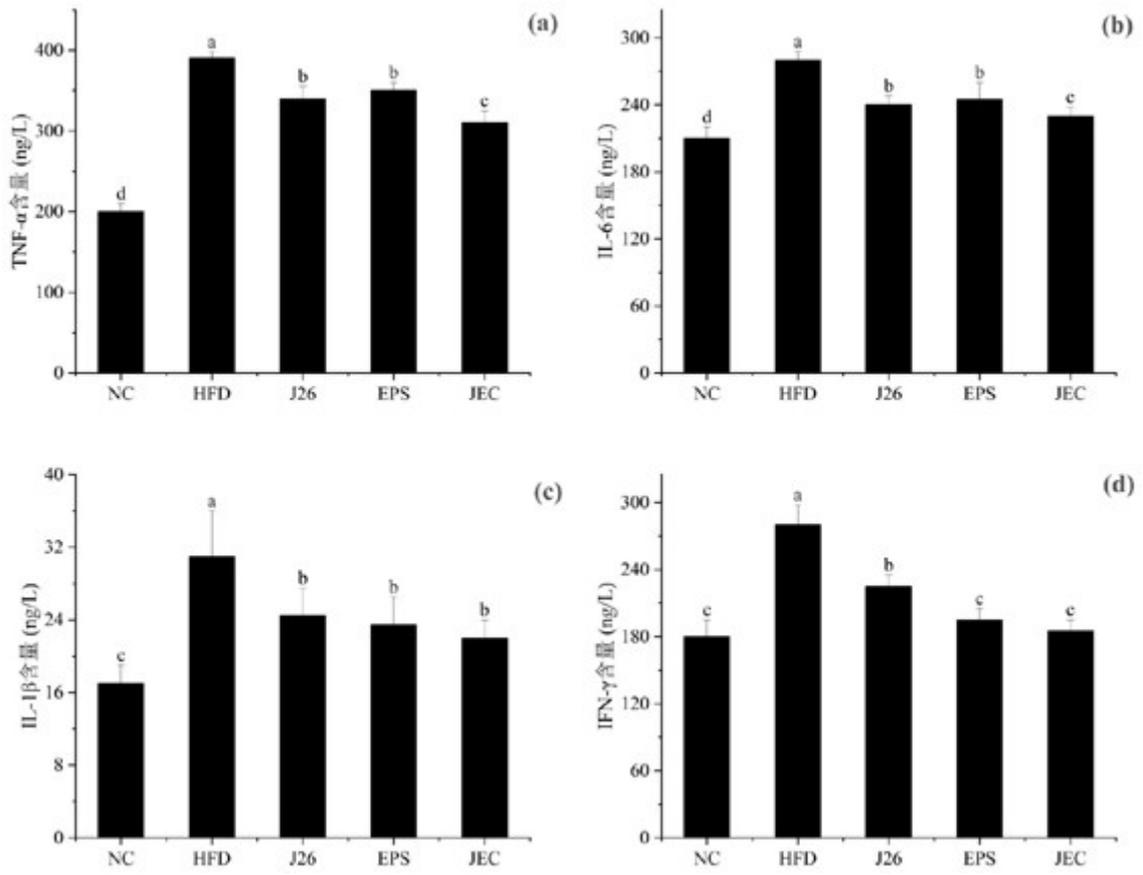


图9



图10

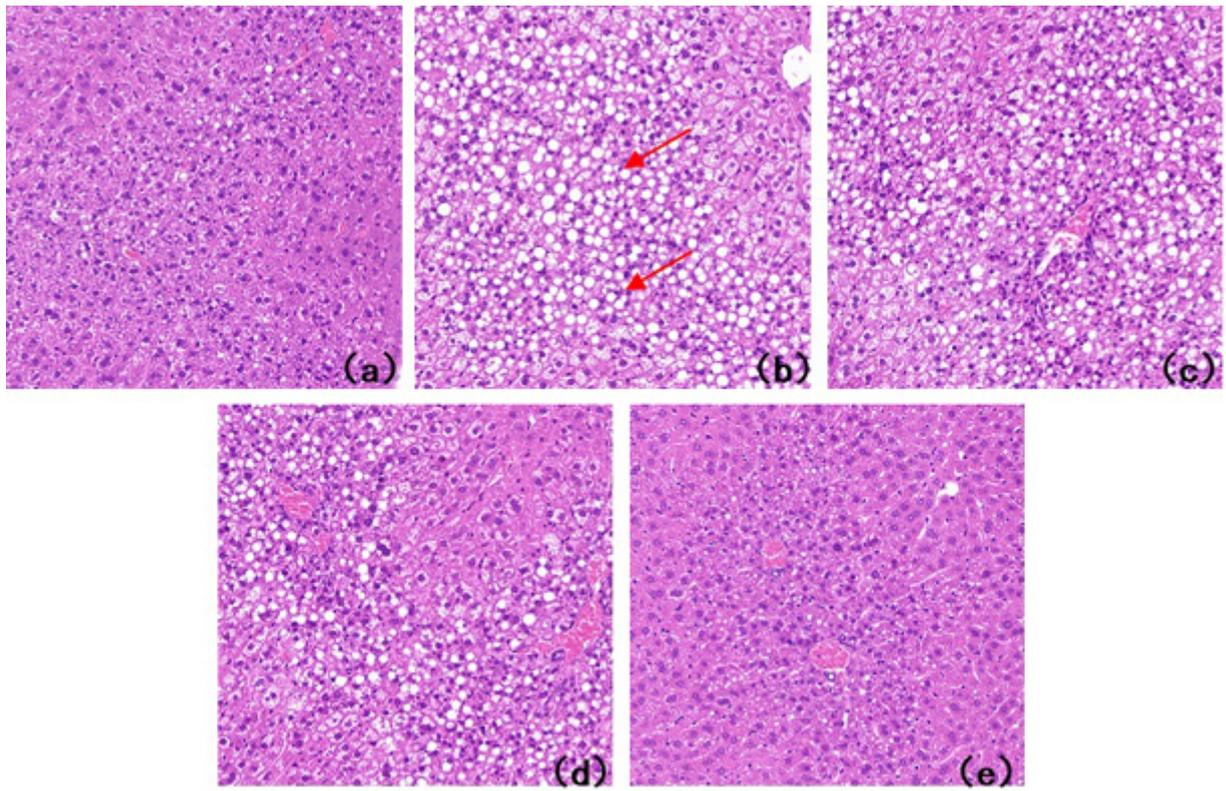


图11

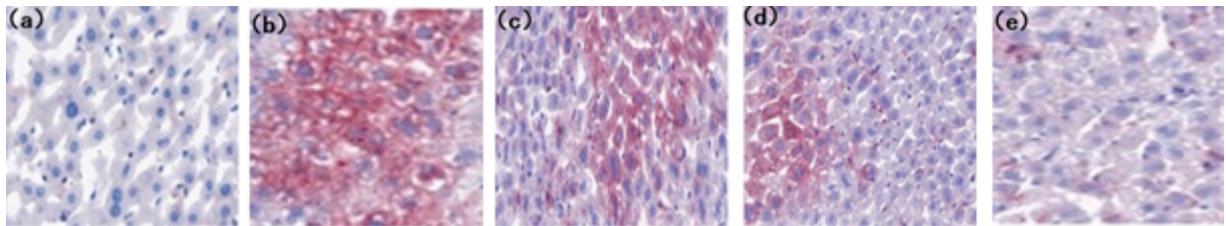


图12

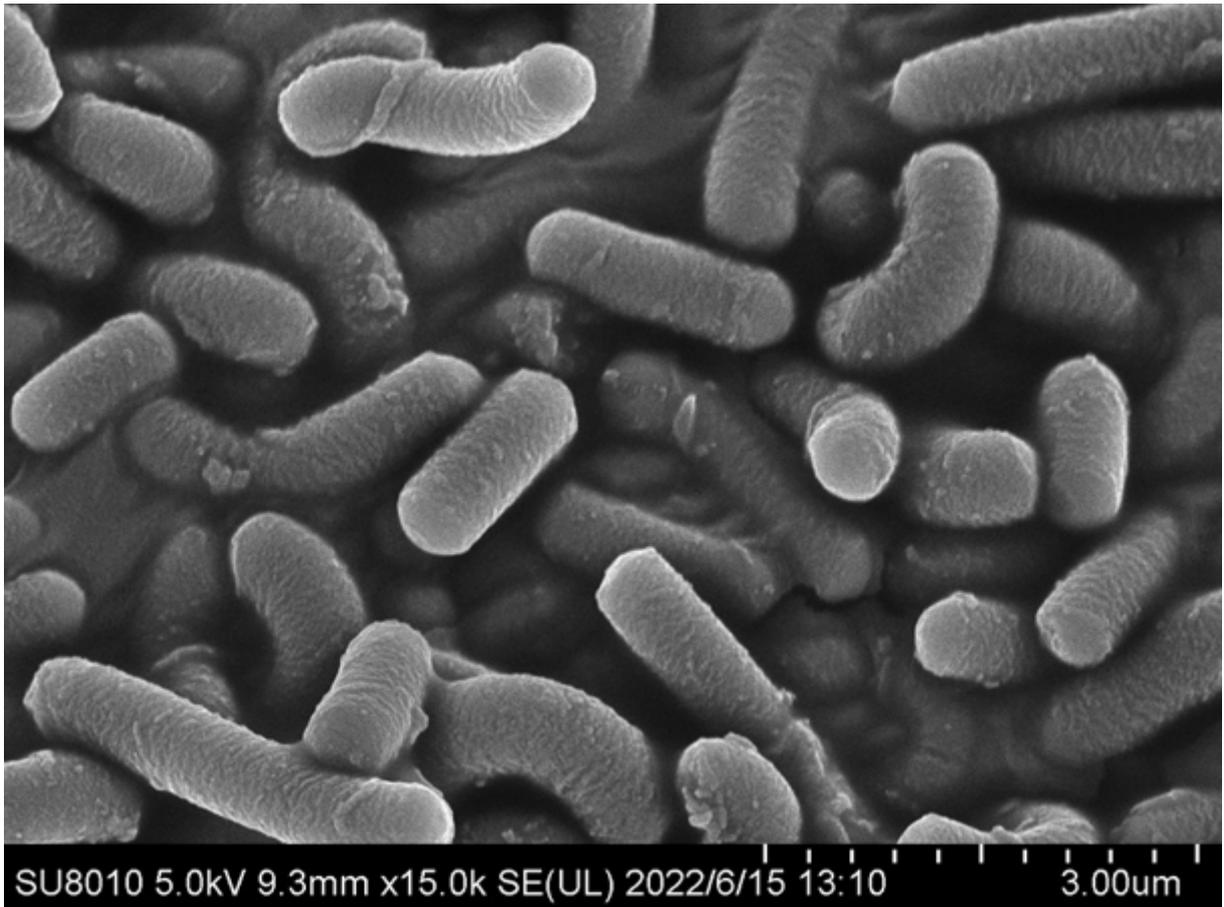


图13