(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106937745 A
(43)申请公布日 2017.07.11

(21)申请号 201610764311.4

(22)申请日 2016.08.31

(71)申请人 快醒生物科技(北京)有限公司
地址 100125 北京市朝阳区东三环农展馆北路甲5号永安宾馆1407号

(72)发明人 李发荣 张宝善 刘建军

(51)Int.Cl.
*A23L 33/135*(2016.01)
*C12N 1/20*(2006.01)
*C12R 1/01*(2006.01)
*C12R 1/02*(2006.01)

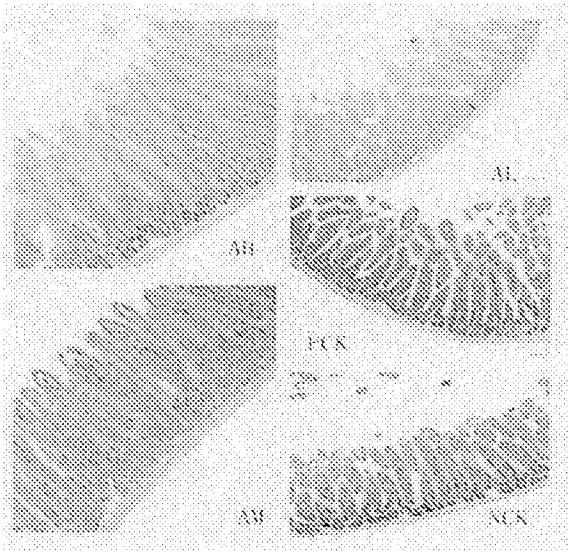
权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

一种具有改善肠道功能的保健品及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种具有改善肠道功能的保健品及其制备方法。该保健品以活性醋酸菌为主料，以奶粉、乳清蛋白粉等营养物为辅料，制剂中醋酸菌的数量不少于$1\times10^{4}$个～$1\times10^{10}$个/克，经冷冻干燥，制作成粉剂、胶囊剂、片剂等剂型。本发明之保健用品，可以促进人体小肠肠绒毛表面积的增长，改变肠道菌群的组成，增加胃肠道益生菌的相对含量；降低胃肠道内有害菌的相对含量，促进营养物质的吸收；从而达到养身健体的良好效果。



CN 106937745 A

1.一种具有改善肠道功能的保健品，其特征在于：其主料为活性醋酸菌，其余为营养物辅料；

所述活性醋酸菌，主要指醋酸菌类微生物，可以为醋酸杆菌属、葡糖杆菌属和酸单胞菌属的单一种类或者多种醋酸菌类微生物的混合物；制剂中醋酸菌的数量不少于$1\times10^{4}$个～$1\times10^{10}$个/克。

2.根据权利要求1所述具有改善肠道功能的保健品，其特征在于：所述营养物辅料，是指含有蛋白质、氨基酸、糖类、脂类、维生素的物质，可以是其中的一种、两种或多种营养物质的混合物。

3.一种具有改善肠道功能的保健品的制做方法，其特征在于，依下述方法步骤进行：

a.按照常规方法培养的醋酸菌，收集菌体；

b.在所收集菌体中加入2-5倍量pH＝6.5的0.05M磷酸缓冲液，同时加入营养物，搅拌均匀，

c.将上述溶液倒入培养皿，使菌液厚度为3-6mm左右，-20℃预冻2h，冷冻干燥，得到菌体冻干粉；

d.将上述菌体冻干粉通过常规制剂加工工艺，添加相应的赋形剂或填充剂，拌和均匀，即可制成相应的胶囊剂、片剂或者冲剂。

# 一种具有改善肠道功能的保健品及其制备方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及一种保健品及其制备方法，具体地说是一种具有改善肠道功能的保健用品及其制备方法。

## 背景技术

[0002] 醋酸菌属于好氧型革兰氏阴性菌，系指：能以氧气为终端电子受体，氧化糖类、糖醇类和醇类生成相应的糖醇、酮和有机酸的一类革兰氏阴性菌的总称。醋酸菌主要包括醋酸杆菌属(Acetobacter,A.)，葡糖杆菌属(Gluconobacter,G.)和酸单胞菌属(Acidomonas,Ac.)。随着对微生物认识的逐步深化，不断发现了一些新的醋酸菌类微生物，截至2014年初，已报道的醋酸圈共有16个属，84 个种。

[0003] 醋酸菌是重要的工业微生物，主要用于食醋与果醋饮料的生产。随着对醋酸菌了解的深入，对于醋酸菌的利用也逐渐增多。除了传统的利用醋酸菌发酵制造各种食醋及果醋饮料之外，由于醋酸菌在进化中形成的独特的代谢途径，人们也在利用醋酸菌的生物转化功能，生产出了一些特殊的产品：如，可可豆，经醋酸菌等微生物发酵后，可拥有独特的口感、香味和颜色；又如，利用醋酸菌，合成出透光度好、抗拉强度高，又有很强的亲水性和优良的生物适应性的高性能纤维素；醋酸菌也被用于塔格糖、莽草酸、Vc、米格列醇等药物及其前体的生产。同时，人们也逐渐认识到醋酸菌体的一些成分或者代谢产物，对人体健康会产生有益的效应，如，利用醋酸菌里含有氧化乙醇而产生醋酸的相关酶类的特点，可以服用醋酸菌达到解酒的效果。

## 发明内容

[0004] 有资料报道：肠道益生菌可以发酵碳水化合物，产生多种挥发性脂肪酸，如甲酸、乙酸、丙酸和丁酸。这些小分子酸对仔猪肠道的健康产生良好的作用：当饲粮中益生菌含量升高时，肠道中挥发性脂肪酸的含量显著增加，同时p H显著降低。由于醋酸菌类微生物可以产生有机酸，同时也富含维持代谢所需的各种维生素类物质，可能对改善肠道功能有一定的作用；另外，在人类食用醋的漫长历史中，由于过滤方法的限制，食醋中不自觉地摄入了少量的醋酸菌菌体，而该食醋并没有对人体造成损伤，可见醋酸菌对人体没有副作用。

[0005] 本案发明人通过用醋酸菌制剂进行的动物实验揭示：服用醋酸菌制剂后，可以促进实验动物小肠肠绒毛表面积的增加，降低肠道pH，改变肠道菌群的组成，增加肠道益生菌的相对含量；降低肠道内有害菌的相对含量，促进营养物质的吸收；从而达到促进健康的效果。

[0006] 本发明的目的在于，以醋酸菌为主要原料，采取特定工艺，制成具有改善肠道功能的保健品。

[0007] 本发明是这样实现的：

[0008] 该促进肠道功能的保健品，主料为活性醋酸菌，其余为辅料。该保健品制剂：以1克计，其醋酸菌所含数量为$1\times10^{4}$个～$1\times10^{10}$个/克；其余为营养物辅料。所述营养物辅料为

常见的食物营养素，如奶粉、乳清蛋白粉，葡萄糖粉，淀粉等营养物。

[0009] 所述活性醋酸菌，指醋酸菌类微生物，为：醋酸杆菌属(Acetobacter，A.)，葡糖杆菌属(Gluconobacter，G.)和酸单胞菌属(Acidomonas，Ac.)的单一种类或者多种醋酸菌类微生物的混合物。醋酸菌及其代谢产物在保健品制剂中有利于强化肠道功能，促进一些种类的益生菌生长，并抑制另一些有害菌类的生长。

[0010] 所述营养物，可以是奶粉、乳清蛋白、粉淀粉、葡萄糖等中的一种、两种或多种混合物。该营养物在保健品中可维持醋酸菌的活性，并为产品提供一定的营养及风味物质。

[0011] 该醋酸菌保健品的制备方法和步骤是：

[0012] a.按照常规方法培养醋酸菌，收集菌体；

[0013] b.在所收集菌体中加入2-5倍量pH＝6.5的0.05M磷酸缓冲液，同时加入营养物，搅拌均匀，

[0014] c.将上述溶液倒入培养皿，使菌液厚度为3-6mm左右，-20℃预冻2h，冷冻干燥，得到菌体冻干粉；

[0015] d.将上述菌体冻干粉通过常规制剂加工工艺，添加相应的赋形剂或填充剂，拌和均匀，即可制成相应的胶囊剂、片剂或者冲剂。

[0016] 本发明之保健用品，可以促进人体小肠肠绒毛表面积的增长，改变肠道菌群的组成，增加胃肠道益生菌的相对含量；降低胃肠道内有害菌的相对含量，促进营养物质的吸收；从而达到养身健体的良好效果。

## 附图说明

[0017] 图1.醋酸菌冻干粉对小鼠肠粘膜形态的的影响

[0018] 图2. 16S rRNA序列高通量测序稀释曲线图

[0019] 图3.不同处理组肠道菌群落结构门水平组成示意图

[0020] 图4.不同处理组肠道菌群落结构门水平组成示意图

## 具体实施方式

[0021] 下面结合几个实施例，对本发明做进一步说明，但本发明不限于这些实施例。

[0022] 实施例1一种改善肠道功能的保健品及其制备胶囊剂的方法

[0023] 先将巴氏醋酸杆菌亚种(Acetobacter pasteurianus subsp. Pasteurianus，AS1.1550)接种于固体培养基(培养基组成为葡萄糖100g、酵母膏 10g、碳酸钙20g、琼脂18～20g、蒸馏水1L，pH＝6.8，95％乙醇20毫升)，30℃培养，培养48小时后，加入2倍量pH＝6.5的0.05M磷酸缓冲液，同时加入脱脂奶粉(0.2克/mL)，匀浆器中5000rpm匀浆5分钟后，倒入培养皿，菌液厚度 3mm，-20℃预冻，然后冷冻干燥得到菌体冻干粉。冻干粉直接装胶囊：每粒重0.3g，每粒含醋酸菌冻干粉300mg，醋酸菌数量为$1\times10^4$个～$1\times10^6$个/克。

[0024] 用法用量：口服，每次3-5粒，一日两次，温水服用。

[0025] 实施例2一种改善肠道功能的保健品及其制备胶囊剂的方法

[0026] 先将酸单胞菌(Acidomonas，Ac.)接种于固体培养基(培养基组成为葡萄糖 100g、酵母膏10g、碳酸钙20g、琼脂18～20g、蒸馏水1L，pH＝6.8，95％乙醇20毫升)，30℃培养，培养48小时后，加入5倍量pH＝6.5的0.05M磷酸缓冲液，同时加入脱脂奶粉(0.2克/mL)，匀浆

器中5000rpm匀浆5分钟后，倒入培养皿，菌液厚度6mm，-20℃预冻，然后冷冻干燥得到菌体冻干粉。冻干粉直接装胶囊：每粒重0.3g，每粒含醋酸菌冻干粉300mg，醋酸菌数量为$1\times10^{7}$个～$1\times10^{10}$个/克。

[0027] 用法用量：口服，每次3-5粒，一日两次，温水服用。

[0028] 实施例3一种改善肠道功能的保健品及其制备多功能胶冲剂方法

[0029] 氧化葡糖杆菌(Gluconobacter oxydans)，接种于固体培养基(培养基组成为葡萄糖100g、酵母膏10g、碳酸钙20g、琼脂18～20g、蒸馏水1L，pH＝6.8，95％乙醇20毫升)，30℃培养，培养72小时后，加入3倍量pH＝6.5的0.05M磷酸缓冲液，同时加入乳清蛋白粉(0.2克/mL)，匀浆器中5000rpm匀浆5分钟后，倒入培养皿，菌液厚度6mm，-20℃预冻，然后冷冻干燥得到菌体冻干粉。冻干粉与双歧杆菌冻干粉按照1：1的比例混合，搅拌均匀后直接制成冲剂。。冻干粉直接装袋密封：每袋重0.6g，每袋含醋酸菌冻干粉300mg，醋酸菌数量为$1\times10^{7}$个～$1\times10^{10}$个/克。

[0030] 用法用量：口服，每次2-3袋，一日两次，温水服用。

[0031] 实施例4一种改善肠道功能的保健品及其制备片剂的方法

[0032] 巴氏醋酸杆菌亚种(Acetobacter pasteurianus subsp. Pasteurianus，AS1.1550)，接种于固体培养基(培养基组成为葡萄糖100g、酵母膏10g、碳酸钙20g、琼脂18～20g、蒸馏水1L，pH＝6.8，95％乙醇20毫升)，30℃培养，培养48-72小时后，加入3倍量pH＝6.5的0.05M磷酸缓冲液，同时加入脱脂奶粉(0.2克/mL)，匀浆器中5000rpm匀浆5分钟后，倒入培养皿，菌液厚度6mm，-20℃预冻，然后冷冻干燥得到菌体冻干粉。冻干粉300克加入糊精92克，羧甲基纤维素钠8克，充分混匀后，干法压片，每片重0.4克，每片含醋酸菌冻干粉300mg，醋酸菌数量为$1\times10^{7}$个～$1\times10^{10}$个/克。

[0033] 用法用量：口服，每次3-5粒，一日两次，温水服用。

[0034] 实施例4一种改善肠道功能的保健品及其制备多功能胶囊剂1000粒的方法

[0035] 以制备本发明产品多功能胶囊剂1000粒为例：巴氏醋酸杆菌亚种 (Acetobacter pasteurianus subsp.Pasteurianus，AS1.1550)，接种于固体培养基(培养基组成为葡萄糖100g、酵母膏10g、碳酸钙20g、琼脂18～20g、蒸馏水1L，pH＝6.8，95％乙醇20毫升)，30℃培养，培养48-72小时后，加入3倍量pH＝6.5的0.05M磷酸缓冲液，同时加入脱脂奶粉(0.2克/mL)，匀浆器中 5000rpm匀浆5分钟后，倒入培养皿，菌液厚度6mm，-20℃预冻，然后冷冻干燥得到菌体冻干粉。冻干粉与枯草芽孢杆菌干粉按照10：1的比例混合，搅拌均匀后直接装胶囊，每粒重0.33g，每粒含醋酸菌冻干粉300mg，醋酸菌数量为$1\times10^{7}$个～$1\times10^{10}$个/克。。

[0036] 用法用量：口服，每次3-5粒，一日两次，温水服用。

[0037] 实施例5一种改善肠道功能的保健品及其制备胶囊剂方法

[0038] 纹膜醋酸杆菌(Acetobacter aceti)，接种于固体培养基(培养基组成为葡萄糖100g、酵母膏10g、碳酸钙20g、琼脂18～20g、蒸馏水1L，pH＝6.8，95％乙醇 20毫升)，30℃培养，培养48-72小时后，加入4倍量pH＝6.5的0.05M磷酸缓冲液，同时加入脱脂奶粉(0.2克/mL)，匀浆器中5000rpm匀浆5分钟后，倒入培养皿，菌液厚度6mm，-20℃预冻，然后冷冻干燥得到菌体冻干粉。冻干粉直接装胶囊，每粒重0.3g，每粒含醋酸菌冻干粉300mg，醋酸菌数量为$1\times10^{7}$个～$1\times10^{10}$个/克。。

[0039] 用法用量：口服，每次3-5粒，一日两次，温水服用。

[0040] 实施例6一种改善肠道功能的保健品及其制备胶囊剂1000粒为例方

[0041] 以纹膜醋酸杆菌(Acetobacter aceti)和巴氏醋酸杆菌亚种(Acetobacter pasteurianus subsp.Pasteurianus,AS1.1550)混合接种于固体培养基(培养基组成为葡萄糖100g、酵母膏10g、碳酸钙20g、琼脂18～20g、蒸馏水1L,pH＝6.8，95％乙醇20毫升),30℃培养,培养48-72小时后,加入5倍量pH＝6.5的0.05M 磷酸缓冲液,同时加入脱脂奶粉(0.2克/mL),匀浆器中5000rpm匀浆5分钟后,倒入培养皿,菌液厚度6mm,-20℃预冻,然后冷冻干燥得到菌体冻干粉。冻干粉直接装胶囊,每粒重0.3g,每粒含醋酸菌冻干粉300mg,醋酸菌数量为$1\times10^{7}$个～$1\times10^{10}$个/克。。

[0042] 用法用量:口服,每次3-5粒,一日两次,温水服用。

[0043] 以下是醋酸菌冻干粉改善肠道功能的实验报告

[0044] 一、醋酸菌冻干粉对肠道功能及肠道菌群的影响

[0045] 1实验材料及动物处理

[0046] 1.1醋酸菌冻干粉的制备:巴氏醋酸杆菌亚种(Acetobacter pasteurianus subsp.Pasteurianus,AS1.1550),接种于固体培养基(培养基组成为葡萄糖100g、酵母膏10g、碳酸钙20g、琼脂18～20g、蒸馏水1L,pH＝6.8,95％乙醇20毫升)，30℃培养,培养48-72小时后,加入3倍量pH＝6.5的0.05M磷酸缓冲液,同时加入脱脂奶粉(0.2克/mL),匀浆器中5000rpm匀浆5分钟后,倒入培养皿,菌液厚度6mm-20℃预冻,然后冷冻干燥得到菌体冻干粉。。

[0047] 1.2实验动物分组及处理:昆明种小鼠60只雌雄各半,体重(20±2)g,购于第四军医大学实验动物中心,合格证号:SCXK(军)20013-007,饲养于标准化动物房,适应环境4d,自由采水、采食,室内通风条件良好,正常昼夜变化,相对湿度40％～70％,室温18～22℃。

[0048] 动物按体重分层后随机分为5组,每组12只小鼠,雌雄各半,醋酸菌冻干粉分为高中低三个剂量组(分别记作AH,AM,AL),分别按照0.2,0.4,0.8g/kg·d的剂量灌胃给予醋酸菌冻干粉,阳性药组(PCK)按照0.2g/kg·d的剂量给予益生菌制剂(妈咪爱,北京韩美药品有限公司),空白对照组(NCK)给以相应体积的溶媒,连续给药2周,末次给药后,动物禁食12h,动物禁食期间,用灭菌镊子或消毒棉签取适量新鲜小鼠粪样,用于DNA提取。小鼠称重后,麻醉,眼眶取血(用于测定血糖,血脂)后处死动物,剖腹分离小鼠小肠,收集肠内容物后,取靠近回肠部约1cm肠管,用生理盐水洗净肠内容物,置10％甲醛中固定待用。

[0049] 2检测方法及结果

[0050] 2.1血糖测定

[0051] 按照葡萄糖(Glu)测试盒(葡萄糖检测试剂盒(长春汇力生物技术有限公)说明操作,测量小鼠血糖,结果如下:

[0052] 醋酸菌冻干粉对小鼠血糖的影响(n＝12)

[0053]

| 组别 | NCK | PCK | AL | AM | AH |
|---|---|---|---|---|---|
| 血糖 (mmol/L) | 7.33±0.20 | 7.23±0.12 | 7.22±0.11 | 7.30±0.06 | 7.21±0.11 |

[0054] 表中:AH表示醋酸菌冻干粉高剂量组,AM为醋酸菌冻干粉中剂量组,AL为醋酸菌冻

干粉低剂量组，PCK为阳性药组即益生菌制剂妈咪爱组，NCK为空白对照组。

[0055] 经t-检验，各组血糖值数据差异无显著意义，说明醋酸菌冻干粉对小鼠血糖影响较小。

[0056] 2.2体重变化

[0057] 醋酸菌冻干粉对小鼠体重增加的影响(n＝12)

[0058]

| 组别 | NCK | PCK | AL | AM | AH |
|---|---|---|---|---|---|
| 初始体重(g) | 20.45±1.30 | 20.21±1.18 | 20.82±1.36 | 20.51±1.15 | 20.80±1.22 |
| 终体重(g) | 22.55±1.54 | 23.03±1.47 | 24.08±1.40★ | 24.52±1.07※ | 24.86±1.32※ |

[0059] ★表示与正常对照组相比较，t-检验，$p<0.05$，※表示与正常对照组相比较，t-检验，$p<0.01$.

[0060] 表中：AH表示醋酸菌冻干粉高剂量组，AM为醋酸菌冻干粉中剂量组，AL为醋酸菌冻干粉低剂量组，PCK为阳性药组即益生菌制剂妈咪爱组，NCK为空白对照组。

[0061] 从结果可以看出，给予醋酸菌冻干粉后，小鼠体重增加较快，与对照组相比较，数据差异有显著意义。阳性药组小鼠体重也有增加趋势，但统计处理后，数据差异无显著意义。

[0062] 2.3血脂分析

[0063] 总胆固醇(TC)测定试剂盒、甘油三酯(TG)测定试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)测定试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所，按照试剂盒说明书操作，结果如下。

[0064] 醋酸菌冻干粉对小鼠血脂的影响(n＝12)

[0065]

| 测试指标 | NCK | PCK | AL | AM | AH |
|---|---|---|---|---|---|
| TG mmol/L | 1.34±0.30 | 1.58±0.40 | 1.59±0.61 | 1.43±0.40 | 1.38±0.18 |
| TC mmol/L | 3.32±0.21 | 3.21±0.20 | 3.43±0.10 | 3.56±0.29 | 3.54±0.31 |
| LDL mmol/L | 2.12±0.34 | 2.04±0.12 | 2.05±0.21 | 2.30±0.30 | 2.29±0.27 |
| HDL mmol/L | 0.82±0.03 | 0.87±0.14 | 0.90±0.07 | 1.21±0.06※ | 1.03±0.04※ |

[0066] ※表示与正常对照组相比较，t-检验，$p<0.01$.

[0067] 表中：AH表示醋酸菌冻干粉高剂量组，AM为醋酸菌冻干粉中剂量组，AL为醋酸菌冻干粉低剂量组，PCK为阳性药组即益生菌制剂妈咪爱组，NCK为空白对照组。

[0068] 结果显示，给予醋酸菌冻干粉后，小鼠血清总胆固醇，总甘油三酯，低密度脂蛋白均无明显变化，醋酸菌冻干粉的中高剂量组的高密度脂蛋白含量上升，数据差异有显著意义，提示服用醋酸制剂可以增加小鼠血清高密度脂蛋白含量。

[0069] 2.4肠道pH变化

[0070] 取0.2g肠道内容物用重蒸水稀释致致100mL，用酸度计(S220 SevenCompact ™ pH)测定pH，结果如下：

[0071] 醋酸菌冻干粉对小鼠肠道pH的影响(n＝12)

[0072]

| 组别 | NCK | PCK | AL | AM | AH |
|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| pH | 7.33±0.20 | 6.95±0.13※ | 7.23±0.11 | 7.21±0.15 | 7.18±0.11★ |

[0073] ★表示与正常对照组相比较，t-检验，p＜0.05，※表示与正常对照组相比较t-检验，p＜0.01.

[0074] 表中：AH表示醋酸菌冻干粉高剂量组，AM为醋酸菌冻干粉中剂量组，AL为醋酸菌冻干粉低剂量组，PCK为阳性药组即益生菌制剂妈咪爱组，NCK为空白对照组。

[0075] 结果显示，服用醋酸菌冻干粉后，小鼠肠道pH有下降趋势，统计处理后，醋酸菌高剂量组的pH差异有显著意义，阳性药对肠道pH也有明显的降低作用。

[0076] 2.5肠粘膜形态变化

[0077] 取固定好的肠管，H-E染色后切片，观察小肠粘膜形态变化，用Image-pro plus 软件测量小肠绒毛高度，隐窝深度，计算绒毛高度/隐窝深度比值。-

[0078] 醋酸菌冻干粉对小鼠肠粘膜形态的影响(n＝10)

[0079]

| 组别 | 绒毛高度 | 隐窝高度 | 比值 |
|---|---|---|---|
| NCK | 648.8±90.0 | 184.72±54.9 | 3.68±0.74 |
| PCK | 913.2±88.3※ | 212.6±55.6 | 4.45±0.74★ |
| AL | 675.6±121.0 | 147.4±50.8 | 7.16±2.04※ |
| AM | 716±105.1 | 99.3±27.3※ | 5.21±1.40※ |

[0080]

| | | | |
|---|---|---|---|
| AH | 821.5±97.9※ | 134±41.6※ | 6.48±1.53※ |

[0081] ★表示与正常对照组相比较，t-检验，p＜0.05，※表示与正常对照组相比较t-检验，p＜0.01.

[0082] 表中：AH表示醋酸菌冻干粉高剂量组，AM为醋酸菌冻干粉中剂量组，AL为醋酸菌冻干粉低剂量组，PCK为阳性药组即益生菌制剂妈咪爱组，NCK为空白对照组。

[0083] 图1是组织切片的照片，H-E染色，其中AH表示醋酸菌冻干粉高剂量组，AM为醋酸菌冻干粉中剂量组，AL为醋酸菌冻干粉低剂量组，PCK为阳性药组即益生菌制剂妈咪爱组，NCK为空白对照组。

[0084] 结果显示，与对照组相比，阳性药组及醋酸菌冻干粉组的肠绒毛长度有增加趋势，其中，阳性药组，醋酸菌冻干粉高剂量组的肠绒毛长度与对照组相比，数据差异有显著意义；醋酸菌冻干粉组的隐窝高度有下降趋势，其中中高剂量组的数据差异有显著意义；绒毛高度/隐窝深度比值方面，阳性药组及醋酸菌冻干粉组均升高，数据差异有显著意义。提示服用醋酸菌冻干粉可以增加小肠吸收面积，促进营养物质的吸收；较高的绒毛高度/隐窝深度比值反映了较高肠绒毛细胞较快的生长及更新速度

[0085] 2.6肠道菌群变化检测

[0086] 新鲜小鼠粪样品(每组平行取5个样品)，粘磨，按照试剂盒说明提取 DNA(TIANamp Stool DNA Kit，粪便基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)。完成基因组DNA抽提后，利用1％琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA。，利用细菌 16SrRNAV3-V4区设计引物，16S rRNA引物为细菌16S rRNA 338F 5’- ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3’，806R 5’-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-

3’扩增目标基因，PCR扩增产物，纯化后。利用Illumina Miseq测序平台对目的片段进行高通量测序，在97％的相似水平下的OTU进行生物信息统计分析。用Usearch (vsesion 7.1http://drive5.com/uparse/)软件平台进行

[0087] OTU聚类分析，分类学分析及群落结构的统计分析。

[0088] 2.6.1OUT分布统计

[0089] 一共检测到652种(Operational Taxonomic Units，OTU)，按照97％相似性对非重复序列(不含单序列)进行OTU聚类。

[0090] 2.6.2稀释曲线分析

[0091] 图2显示，随着测序序列数的增多，曲线趋向平坦，说明测序数据量合理，能够覆盖绝大多数菌种。

[0092] 图2中，纵坐标rarefaction measure，表示基于特定测序条数能构建的OTU数量，即按照97％的相似度可以确认的分类单位数；横坐标Number of reads sampled的数字表示每个样品中随即抽取的测序条数；AH1C，AM1C，NCK2等字母表示的是随即抽取的具体的样本，如AH1C表示的样品是醋酸菌冻干粉高剂量组1号样，AM1C 表示的样品是醋酸菌冻干粉中剂量组1号样。

[0093] 2.6.3肠道菌群多样性比较

[0094] Shannon(the Shannon index)指数是用来估算样品中微生物多样性指数之一。它与Simpson多样性指数常用于反映alpha多样性指数。由表可以看出，不同处理条件下Shannon，Simpson指数变化均很小，说明肠道菌群的多样性基本一致。

[0095] 不同处理条件下小鼠肠道菌群多样性的变化(n＝5)

[0096]

| 测试指标 | NCK | PCK | AL | AM | AH |
|---|---|---|---|---|---|
| shannon | 4.78 | 4.82 | 4.87 | 4.78 | 4.75 |
| simpson_hci | 0.019 | 0.015 | 0.016 | 0.019 | 0.019 |

[0097] 表中：AH表示醋酸菌冻干粉高剂量组，AM为醋酸菌冻干粉中剂量组，AL为醋酸菌冻干粉低剂量组，PCK为阳性药组即益生菌制剂妈咪爱组，NCK为空白对照组。

[0098] 2.6.4肠道菌群结构在门水平的差异比较图

[0099] 图3显示，不同处理下肠道菌群在门水平的组成

[0100] 图3中：纵坐标Relative abundence表示相对丰度，横坐标是不同的处理组，其中AH表示醋酸菌冻干粉高剂量组，AM为醋酸菌冻干粉中剂量组，AL为醋酸菌冻干粉低剂量组，PCK为阳性药组即益生菌制剂妈咪爱组，NCK为空白对照组。

[0101] 不同处理组在门水平的种类组成一致，均由厚壁菌门(Firmicutes)，拟杆菌门(Bacteroidetes)，变形菌门(Proteobacteria)，candidate_division_tm7，脱铁杆菌门(Deferribacteres)，软壁菌门(Tenericutes)，放线菌门(Actinobacteria)，螺旋体门(Spirochaetae)等组成，其中厚壁菌门(Firmicutes)，拟杆菌门(Bacteroidetes)，变形菌门(Proteobacteria)的在各组相对含量均超过98％，是主要的优势菌；在门水平上，不同门的相对含量略有差异，与对照组相比，阳性组与醋酸菌各处理组的Firmicutes/ Bacteroidetes的比值均有减小趋势，其中醋酸菌低剂量组的Firmicutes/ Bacteroidetes与对照组相比，数据差异有显著意义。

[0102] 不同处理组肠道菌群落结构属水平组成变化(n＝5)

[0103]

| Taxon | AH | AL | AM | NCK | PCK |
|---|---|---|---|---|---|
| Bacteroidetes | 47.06 | 43.5 | 51.88 | 39.98 | 43.6 |
| Firmicutes | 42.76 | 46.59 | 38.3 | 47.64 | 45.55 |
| Proteobacteria | 8.97 | 7.63 | 8.28 | 10.94 | 8.87 |
| Candidate_division_TM7 | 0.46 | 1.15 | 0.62 | 0.35 | 0.26 |
| Deferribacteres | 0.34 | 0.45 | 0.18 | 0.72 | 0.78 |
| Tenericutes | 0.19 | 0.27 | 0.21 | 0.15 | 0.21 |
| Actinobacteria | 0.12 | 0.36 | 0.32 | 0.2 | 0.16 |
| Spirochaetae | 0.05 | 0 | 0.03 | 0.01 | 0.05 |
| Verrucomicrobia | 0.05 | 0.02 | 0.15 | 0.01 | 0.41 |
| Cyanobacteria | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.1 |
| Firmicutes/Bacteroidetes | 0.91 | 1.07 | 0.74 | 1.19 | 1.04 |

[0104] 2.6.5肠道菌群结构在属水平的差异比较图

[0105] 图4中,纵坐标Relative abundence表示相对丰度,横坐标是不同的处理组,其中AH表示醋酸菌冻干粉高剂量组,AM为醋酸菌冻干粉中剂量组,AL为醋酸菌冻干粉低剂量组,PCK为阳性药组即益生菌制剂妈咪爱组,NCK为空白对照组。

[0106] 一共检测到108个属的肠道菌种类,大多数属在各组间的相对丰度无明显差异,下表列出一些相对丰度差异相对较大的属及其统计处理结果(以样本中各各微生物检测到的序列数表示各微生物的相对丰度).

[0107] 不同处理组肠道菌群落结构属水平组成变化(n＝5)

[0108]

| Taxon | NCK | PCK | AL | AM | AH |
|---|---|---|---|---|---|
| S24-_norank | 3037±984 | 3660±1442 | 3765±699 | 5174±852※ | 5232±848※ |
| Ruminococcaceae_uncultured | 621±345 | 585±173 | 752±571 | 875±317 | 1542±332※ |
| Allobaculum | 253±150 | 249±132 | 1239±379※ | 841±264※ | 751±135※ |
| Parasutterella | 256±104 | 228±109 | 489±107 | 539±118※ | 481±233 |
| Coprococcus | 42±3 | 110±83 | 78±20※ | 51±29 | 64±21 |
| Akkermansia | 3±1 | 67±25※ | 3.6±3.5 | 25±8※ | 8±6.5 |
| Prevotella | 396±202 | 279±238 | 374±157 | 690±346 | 732±424 |
| Helicobacter | 1029±373 | 679±334 | 313±149※ | 178±34※ | 259±144※ |
| Prevotellaceae_uncultured | 556±150 | 562±371 | 164±70※ | 488±293 | 192±120※ |
| Roseburia | 397±154 | 296±81 | 333±125 | 76±56※ | 108±68※ |
| Rikenella | 120±37 | 91±26 | 36±27※ | 44±23※ | 101±50 |
| Anaerotruncus | 273±152 | 215±131 | 163±42 | 138±36 | 225±48 |
| Odoribacter | 110±42 | 284±75※ | 82±80 | 122±79 | 144±19 |
| RC9_gut_group | 198±178 | 142±86 | 53±43 | 106±47 | 71±32 |
| Lachnospiraceae_uncultured | 3844±1500 | 4647±2324 | 2919±481 | 2333±1120 | 3349±692 |
| Bacteroides | 1611±380 | 978.±282 | 1498±822 | 1287±920 | 1257±668 |

[0109] ※表示与正常对照组相比较t-检验,p＜0.05.

[0110] 表中:AH表示醋酸菌冻干粉高剂量组,AM为醋酸菌冻干粉中剂量组,AL为菌冻干粉

低剂量组，PCK为阳性药组即益生菌制剂妈咪爱组，NCK为空白对照组。

[0111] 由表可以看出，有9个属的相对丰度有下降趋势，经统计检验，Helicobacter，Prevotellaceae_uncultured，Roseburia，Rikenella在有的剂量组的相对丰度的数据差异有显著性意义，7个属的相对丰度有上升趋势，经统计分析，S24-7_norank，Ruminococcaceae_uncultured，Allobaculum，Parasutterella，Coprococcus，Akkermansia在有的剂量组的相对丰度的数据差异有显著性意义

[0112] 3.结论

[0113] 由结果可以看出，灌胃给予小鼠醋酸菌冻干粉后，小鼠体重增加较对照组快，说明醋酸菌冻干粉可以促进小鼠生长，对小鼠肠粘膜形态的研究表明，醋酸菌冻干粉可以增加小鼠肠道绒毛高度，提高绒毛高度/隐窝深度的比值，这两个指标与小肠的吸收面积与小肠功能密切相关[1]，提示醋酸菌冻干粉可以促进营养物质的吸收。消化道pH的小幅下降可以调控动物肠道微生物平衡、增殖有益菌、抑制有害菌、提高消化道酶活性等作用[2,3]，本实验结果，服用醋酸菌冻干粉，小鼠肠道pH可以降低0.1-0.15单位，提示醋酸菌冻干粉具有调节小鼠肠道功能的作用，与小鼠体重增加、肠绒毛形态变化的结果相一致。

[0114] 血糖及血脂的测定结果显示，服用醋酸菌冻干粉对血糖、血脂影响较小，对血清HDL-C的含量有升高作用，而其他脂质含量无明确变化。流行病学研究揭示，HDL-C的含量与心脑血管疾病发生负相关[4]，本实验结果提示醋酸菌冻干粉具有潜在的保健价值。

[0115] 肠道菌群的变化与健康密切相关，已经证实很多疾病如结肠癌、糖尿病、心脑血管疾病等的发生与肠道菌群的改变相关，如肠道微生物代谢产生的氧化三甲胺(TMAO)可以导致动脉粥样硬化[5]，阴沟肠杆菌B29，普雷沃氏菌与肥胖的发生相关[6-7]，自身免疫性疾病、糖尿病、慢性肾病、过敏性疾病、自闭症等均与肠道菌群的改变相关[8]。但是由于肠道菌群组成复杂，人类肠道拥有100万亿近1 000-11500种细菌，绝大多数肠道菌尚不能体外成功培养，有些菌种的分类地位也不明确，所以现在已知的益生菌种类较少，如双歧杆菌、乳杆菌、枯草杆菌等等，而绝大多数菌的生理功能尚不清楚。本研究结果显示，给予醋酸菌冻干粉后，小鼠肠道菌群发生了一些变化，在门水平上，Firmicutes/Bacteroidetes的比值均有减小趋势，文献显示，该比值减小可能预示处于较好的健康状态，与普通老人相比较，长寿老人的肠道菌群Firmicutes/Bacteroidetes比值较低[9]。在属水平上，相对丰度变化的13个属中，一般认为Allobaculum，Coprococcus属细菌参与短链脂肪酸的合成，并参与维持肠道菌群的稳定性[10-11]。内源性大麻素可以影响肠道菌群的变化，如Akkermansia[12]，糖尿病大鼠给予二甲双胍治疗后，Akkermansia的相对丰度也上升，单纯口服Akkermansia也可以改善糖尿病症状[13]，本研究显示，给予醋酸菌冻干粉后，肠道内Akkermansia的相对丰度提高，提示醋酸菌冻干粉在预防糖尿病发生方面有潜在的价值。Prevotella属在长寿老人肠道的相对丰度高于普通老人[9]，肥胖症患者体内的Prevotella相对含量低，给予阿拉伯糖基木聚糖后，Prevotella 相对含量上升，肥胖症患者的代谢状态与Roseburia spp.相对含量负相关，与 Bacteroides/Prevotella levels负相关[14]，本研究结果显示，醋酸菌冻干粉处理后 Prevotella相对含量上升，Roseburia相对含量下降。Helicobacter是慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤的主要病因，给予醋酸菌后，Helicobacter的相对含量明显降低。

[0116] 综上述，醋酸菌冻干粉可以增加肠绒毛表面积，促进营养物质的吸收，可以改变肠

道菌群的组成，具有潜在的促进健康的功能。

[0117] 参考文献

[0118] [1]李青竹，李润航，郑艳秋，娄玉杰.不同纤维源对吉林白鹅肠道形态学发育的影响[J].畜牧兽医学报，2014，04：596-602.

[0119] [2]李娜，卢娜，杨贵明，张少雨.日粮中添加酸化剂对断奶仔猪生产性能的影响[J].黑龙江畜牧兽医，2014，05：91-92

[0120] [3]肖芹，沈一茹，张珊，陈杰，施寿荣.复合酸化剂对肉鸡消化道pH和消化酶活性的影响[J].动物营养学报，2015，08：2527-2533.

[0121] [4]赵水平.高密度脂蛋白的研究现状[J].中国动脉硬化杂志，2005，06：673-675.

[0122] 5、Koeth RA，Wang Z，Levison BS，et al.Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine，a nutrient in red meat，promotes atherosclerosis[J].Nature Medicine，2013，19(5)：576-585

[0123] [6]Zhang H，DiBaise JK，Zuccolo A，et al.Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2009，106(7)：2365-2370

[0124] [7]Zhang C，Zhang M，Pang X，et al.Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations[J].ISME Journal，2012，6(10)：1848-1857

[0125] [8]郭慧玲，邵玉宇，孟和，等.肠道菌群与疾病关系的研究进展[J].微生物学通报，2015，42(2)：400-410.

[0126] [9]Park S H，Kim K A，Ahn Y T，et al.Comparative analysis of gut microbiota in elderly people of urbanized towns and longevity villages[J].Bmc Microbiology，2015，15(1)：1-9.

[0127] [10]Tap J，Furet J P，Bensaada M，et al.Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults[J].Environmental microbiology，2015，17(12)：4954-4964.

[0128] [11]Ferrario C，Taverniti V，Milani C，et al.Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with Lactobacillus paracasei DG varies among healthy adults.[J].Journal of Nutrition，2014，144(11)：1787-96.

[0129] [12]Cani P D，Geurts L，Matamoros S，et al.Glucose metabolism：focus on gut microbiota，the endocannabinoid system and beyond.[J].Diabetes&Metabolism，2014，40(4)：246-257.

[0130] [13]Shin N R，Lee J C，Lee H Y，et al.An increase in the Akkermansia spp.population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice.[J].Molecular Medicine Reports，2014，63(5)：727-35.

[0131] [14]Neyrinck A M，Possemiers S，Druart C，et al.Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria，Roseburia and Bacteroides/Prevotella in diet-induced obese mice.[J].Plos One，2011，6(6)：230-

234.

[0132] [15]石乐琴,郑荣梁,王秉瑞.幽门螺杆菌[J].微生物学免疫学进展,2007,03:51-68.

[0133] 二、醋酸菌冻干粉的急性毒性研究

[0134] 1、受试药物

[0135] 醋酸菌冻干粉,同前,临用前用蒸馏水溶解,配制成为最大浓度1.5g/mL.。

[0136] 2、实验动物

[0137] ICR小鼠由西安交通大学医学院医学实验动物中心提供,体重20～22g,鼠龄6～7周。

[0138] 3、实验方法

[0139] 经预试验,醋酸菌冻干粉LD50无法测出,所以测定醋酸菌冻干粉的最大耐受量。取健康ICR小鼠20只,体重20～22g,雌雄各半,实验前禁食12小时,按最大浓度,最大体积(40ml/kg)一次灌胃给药,给药后连续观察7天,记录动物死亡数。

[0140] 4、实验结果:灌药后七天内小鼠情况无异常,无一只死亡。

[0141] 5结论:醋酸菌冻干粉以灌胃法给予小鼠时,最大耐受量大于30g/kg,与该药物改善肠道功能所用最高剂量0.8g/kg相比,超过37倍,说明该产品使用安全。

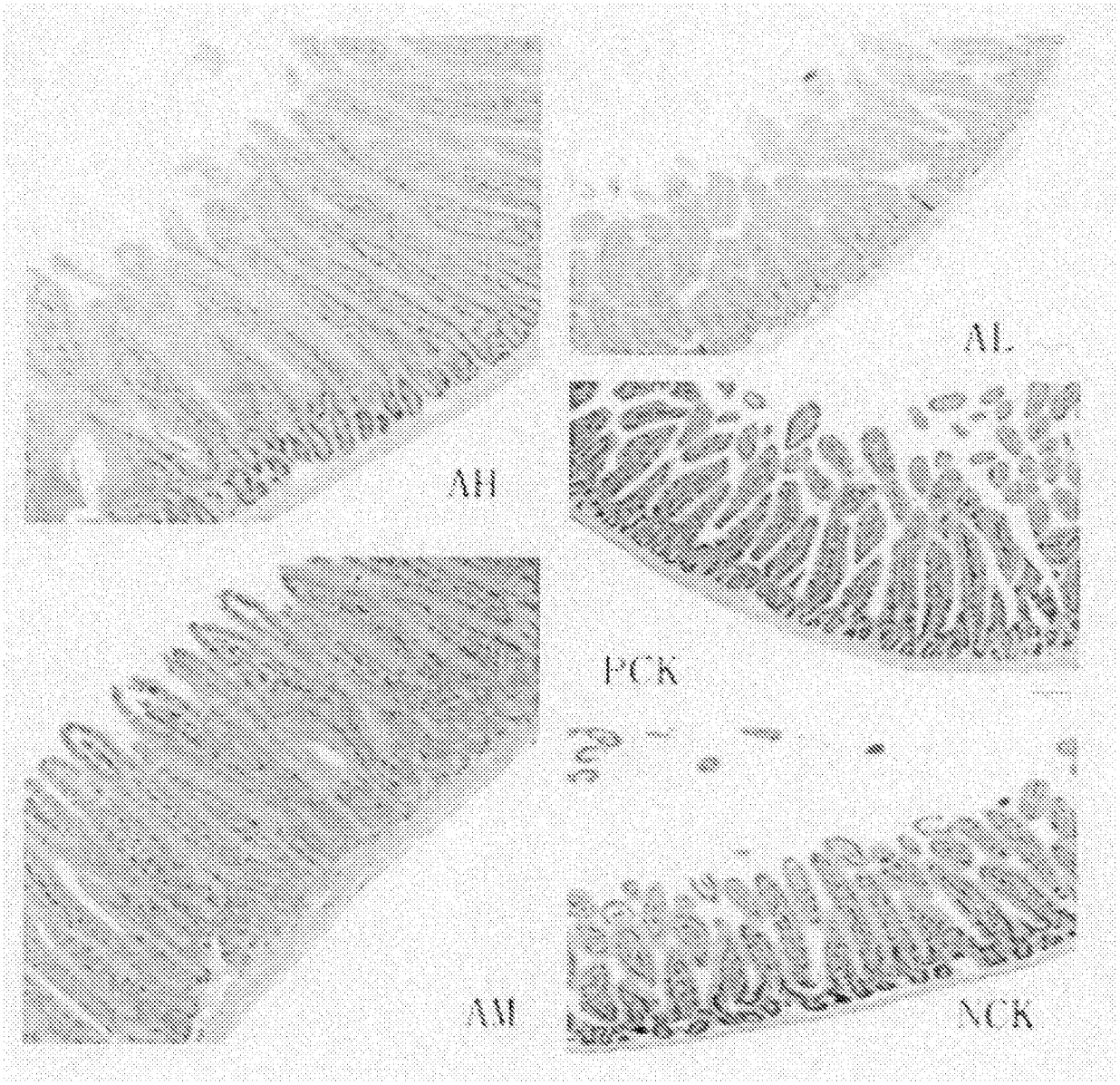



图1

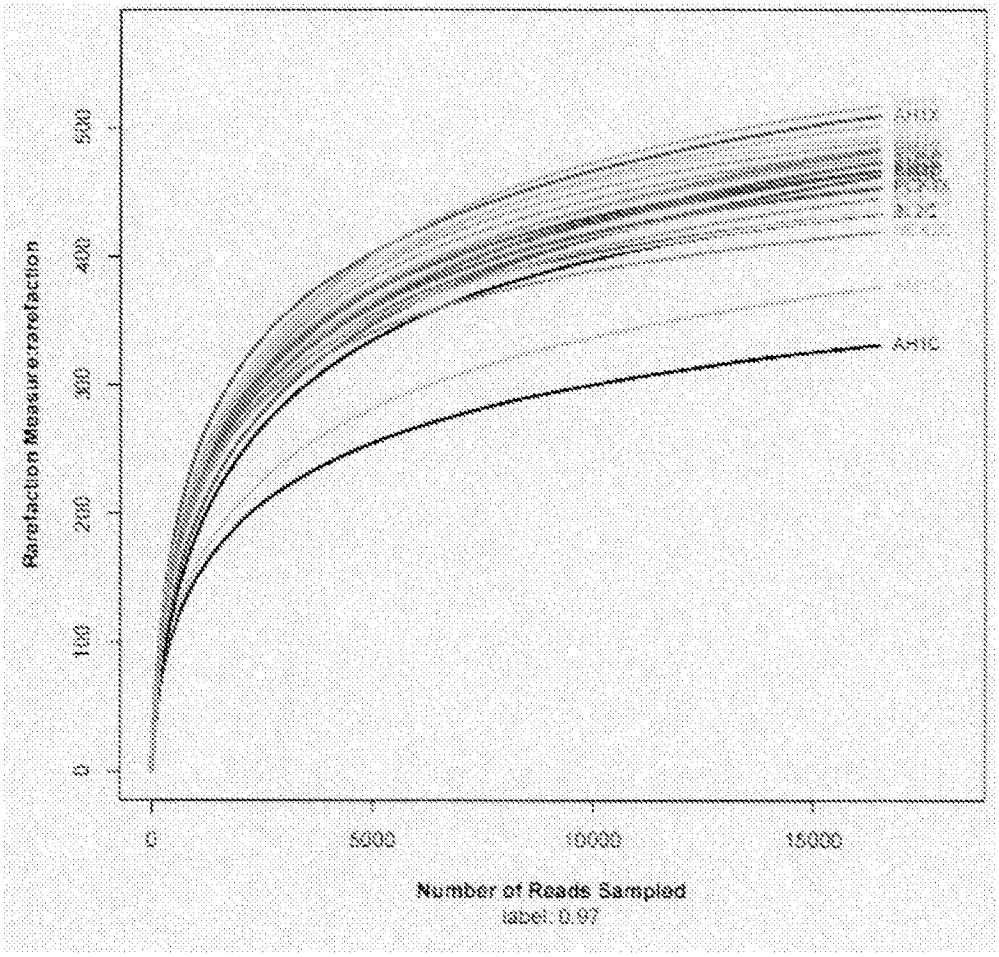

Rarefaction Measure:rarefaction
0
100
200
300
400
500
0
5000
10000
15000
Number of Reads Sampled
label: 0.97

图2

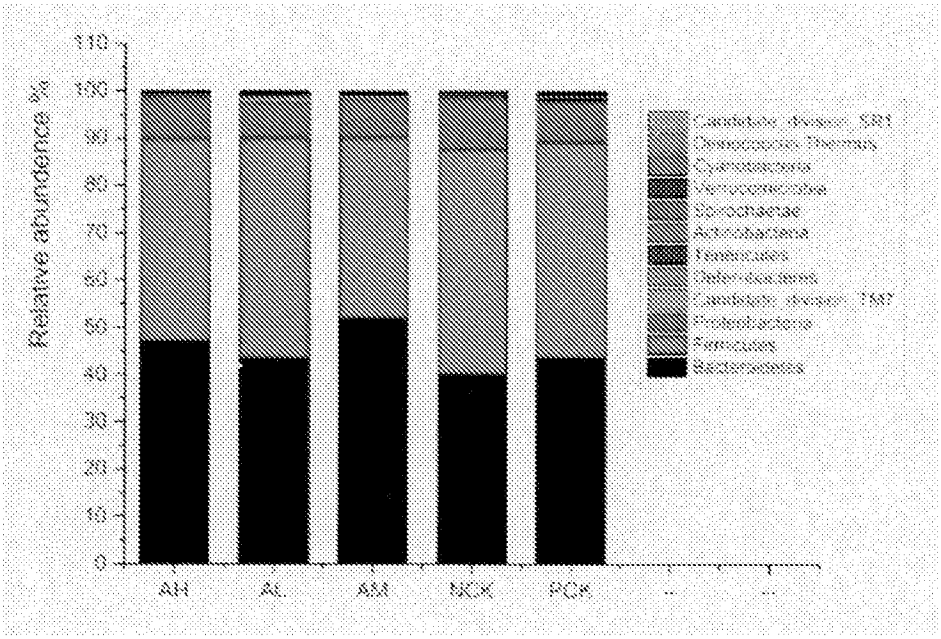

Relative abundance %
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
AH
AL
AM
NCK
PCK

图3

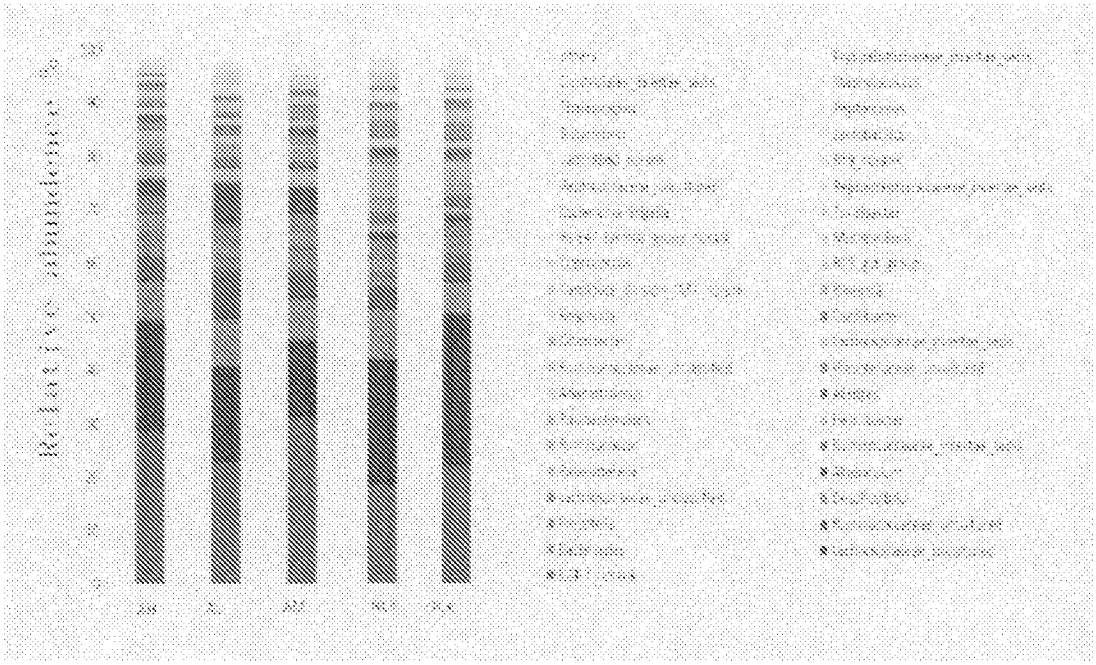


图4