



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103446552 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201210176435. 2

(22) 申请日 2012. 06. 01

(73) 专利权人 吴炳新

地址 250100 山东省济南市历城区山大北路  
77 号

(72) 发明人 褚新红 牛纪江 孙筱林 冯淑琴  
吴炳新

(51) Int. Cl.

A61K 36/9068(2006. 01)

A61P 1/00(2006. 01)

A23L 1/29(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1273839 A, 2000. 11. 22, 权利要求 1、6、  
7、9, 说明书第 3 页倒数第 2 段、第 4 页、第 5 页倒  
数第 1 段, .

审查员 李濯冰

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

用于预防和治疗消化系统疾病的发酵组合物

(57) 摘要

本发明涉及益生菌对中药提取物生物活性的影响, 特别是涉及健脾和胃中药复方提取物经肠道益生菌发酵, 以提高和改善其预防和治疗消化系统疾病的方法。本发明进一步涉及麦芽、山楂、茯苓、陈皮、大枣、甘草、生姜、萝卜提取物经肠道益生菌发酵后制得的发酵组合物, 以及该发酵组合物在制备用于预防和治疗消化系统疾病的食品、保健食品或药品中的应用。

1. 一种用于预防和治疗消化系统疾病的发酵组合物,其特征在于,健脾和胃中药提取物经肠道益生菌发酵制成,所述健脾和胃中药复方的组分为:麦芽、山楂、茯苓、陈皮、大枣、甘草、生姜、鲜萝卜,其制备方法如下:

将组方中生姜、鲜萝卜取汁,其余六味中药加 8 倍水浸泡 30 分钟,并于 100℃提取 1 小时,过滤,再向滤渣中加 6 倍量水,100℃提取 1 小时,过滤,合并滤液,减压浓缩至 2:1 ~ 4:1,即每 2 ~ 4 ml 提取液相当于 1g 药材,加入生姜、鲜萝卜汁,定容至 1000ml,即得中药复方提取物;然后加入 1.0% 的葡萄糖、0.4% 的蛋白胍、0.1% 的酵母粉、0.2% 的酵母膏和无机盐,调整 pH7.0,并于 115℃下灭菌 40 分钟,当温度降至 39℃时,接种预培养的体积比为 0.5% 的短双歧杆菌 AS 1.2213 菌液和各体积比 0.5% 的嗜酸乳杆菌 AS 1.1854、植物乳杆菌 AS 1.19 的菌液,37℃发酵 22 小时,当 pH 值降至 4.2 以下时结束发酵,即得到用于预防和治疗消化系统疾病的发酵组合物;

所述健脾和胃中药复方的组分及重量份为:麦芽 75g、山楂 50 g、茯苓 50 g、陈皮 25 g、大枣 25 g、甘草 10 g、生姜 9 g、鲜萝卜 41 g;

所述的无机盐为  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0mg/100ml、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.4mg/100ml、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.024 mg/100ml、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  70mg/100ml、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  100mg/100ml、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100mg/100ml。

2. 权利要求 1 所述的用于预防和治疗消化系统疾病的发酵组合物的制备方法,按照以下步骤进行:

将组方中生姜、鲜萝卜取汁,其余六味中药加 8 倍水浸泡 30 分钟,并于 100℃提取 1 小时,过滤,再向滤渣中加 6 倍量水,100℃提取 1 小时,过滤,合并滤液,减压浓缩至 2:1 ~ 4:1,即每 2 ~ 4 ml 提取液相当于 1g 药材,加入生姜、鲜萝卜汁,定容至 1000ml,即得中药复方提取物;然后加入 1.0% 的葡萄糖、0.4% 的蛋白胍、0.1% 的酵母粉、0.2% 的酵母膏和无机盐,调整 pH7.0,并于 115℃下灭菌 40 分钟,当温度降至 39℃时,接种预培养的体积比为 0.5% 的短双歧杆菌 AS 1.2213 菌液和各体积比 0.5% 的嗜酸乳杆菌 AS 1.1854、植物乳杆菌 AS 1.19 的菌液,37℃发酵 22 小时,当 pH 值降至 4.2 以下时结束发酵,即得到用于预防和治疗消化系统疾病的发酵组合物;

所述的无机盐为  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0mg/100ml、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.4mg/100ml、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.024 mg/100ml、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  70mg/100ml、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  100mg/100ml、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100mg/100ml。

3. 权利要求 1 所述的用于预防和治疗消化系统疾病的发酵组合物在制备用于预防和治疗消化系统疾病的药品、食品或保健品中的应用。

## 用于预防和治疗消化系统疾病的发酵组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及益生菌对中药提取物生物活性的影响,特别是涉及健脾和胃中药提取物经肠道益生菌发酵,以提高和改善其预防和治疗消化系统疾病的方法。本发明进一步涉及麦芽、山楂、茯苓、陈皮、大枣、甘草、生姜、萝卜提取物经肠道益生菌发酵后制得的发酵组合物,以及该发酵组合物在制备用于预防和治疗消化系统疾病的食品、保健食品或药品中的应用。

### 技术背景

[0002] 中草药治病的物质基础是其所含有的化学物质,这些化学物质以传统的汤剂即水提取物的形式经口进入人体之后,可表现有不同的运转途径:(1)原型化合物被机体吸收并进入循环发挥其药理作用;(2)原型化合物被机体吸收,经肝肠循环或在组织或血液内经过一系列代谢加工后发挥其药理作用;(3)化合物不被吸收,只能随粪便排出体外;(4)药物或其原型化合物在肠道正常菌群的作用下,发生某些由肠道细菌代谢酶导致的化学改变,改善了其吸收率、运转速度及生物学活性,从而在降低毒副作用的同时更有利于其药理学功能的发挥。因此,从实验室药代动力学研究和临床应用观察两方面入手,深入研究人肠道益生菌对天然药物化合物的加工与代谢转化,对于阐明传统中药的作用机理具有十分重要的意义。

[0003] 自十九世纪五十年代以来,已有许多研究者利用不同的动物模型和方法,研究了肠道正常菌群对天然药物或其有效成分的转化及结构修饰。许多体内和体外研究证明,肠道正常菌群对以汤剂(水提取物)形式导入的天然化合物存在一个生物转化和结构修饰的复杂代谢加工过程,从而对天然中草药的体内吸收、运输、代谢及作用的发挥起着重要作用。例如,Dooth 等人(Dooth AN et al., J. Biol. Chem., 223:251, 1956)的早期研究发现,给小鼠经口灌服槲皮素后,尿中可检出3,4-二羟基苯乙酸等B环裂解产物,但预先给动物投用抗生素(如新霉素),尿中则不能检出这些槲皮素代谢产物。结果提示这些裂解产物是经肠内细菌代谢转化而产生的。也已证明,真杆菌 *Eubacterium* sp. CLH 可借助其产生的 $\beta$ -葡糖醛酸酶,将甘草的主要成分甘草甜素转化成甘草次酸。另外,还有的实验观察到,将羊的肠内容物与豆科植物来源的异黄酮类化合物一起保温,可导致这些化合物的结构改变,即可使7-羟基-4-甲基异黄酮转化成大豆糖苷配基和 epuol,同时使鹰嘴豆芽素A转化成染料木黄酮。表明羊肠道内容物中的肠道菌群具有生物转化异黄酮类化合物的能力(Niissou, A, et al., Biochem. Biophys. Acta, 148:92, 1967)。

[0004] 上述这些及其他许多实验均提示,已知结构或未知结构的天然药物,如通过胃肠道途径摄入体内后,必须经过肠道内菌群或其代谢产物的作用,并发生某些结构改变后才能被吸收并发挥其生物学活性。

[0005] 随着现代生活节奏的加快以及工业污染的加重,胃肠疾病的发病率显著上升,成为目前严重影响人们身体健康和生活质量的一类疾病。由于胃肠疾病是人们生活中最常见、最普遍的病,因其发病广,所以人们就熟视无睹并习以为常。然而,传统医学认为:“脾胃

为后天之本”，说的是胃、肠是我们人体重要的消化系器官，并主要通过其运动功能使人体摄入的食物得以消化和吸收，胃肠运动功能失调则会引发诸多肠胃不适甚至疾病，保护消化道功能正常，对人体健康十分重要。

[0006] 利用中药发酵技术开发创新药物已成为当今世界药物研发的新趋势、国际医药学术界的热点。中药发酵技术是在继承中药炮制学发酵法的基础上，吸取微生态学研究成果，结合现代微生物工程而形成的高科技中药制药新技术。中药发酵是现代中药研究的热点，其优点可概括为：①保护中药活性成分免遭破坏，使药物的有效组分、活性物质最大限度地得以提取、利用；②提高中药药性，降低药物的毒副作用；③所优选的有益菌种本身能补充或增强原有药物的功能；④产生新的生物学活性物质；⑤为中药活性成分结构修饰提供新途径；⑥节省药材资源，保护环境；⑦是实现中药现代化、具有高科技水平的新技术，生产工艺可控，所得产物精确，制剂方便，便于与国际接轨。

[0007] 现有技术中的许多实验结果均提示，益生菌和中药均对消化系统疾病有预防和治疗作用。因此本发明的主题是，利用人体的多种肠道益生菌与本发明使用的健脾和胃中药复方提取物一起发酵，以实现肠道益生菌与中药的协同作用。结果令人惊奇地发现，健脾和胃中药复方提取物经与肠道益生菌共同发酵处理后，显著的提高和改善了其预防和治疗消化系统疾病的功能。

## 发明内容

[0008] 本发明涉及益生菌对中药提取物生物活性的影响，特别是涉及健脾和胃中药复方提取物经肠道益生菌发酵，以提高和改善其预防和治疗消化系统疾病的方法。本发明进一步涉及麦芽、山楂、茯苓、陈皮、大枣、甘草、生姜、萝卜组成的复方提取物经肠道益生菌发酵后，制得的发酵组合物，以及该发酵组合物在制备用于预防或治疗消化系统疾病的食物、保健食品或药品中的应用。

[0009] 本发明的一个目的是提供健脾和胃中药复方提取物经益生菌发酵处理后所得到的发酵产物。本发明中，由健脾和胃中药复方提取物经益生菌发酵处理后所得到的发酵产物常常被简称为发酵组合物。

[0010] 根据本发明的一个优选实施方案，中药复方选自具有健脾和胃功能的复方：其各成分的重量份比分别是麦芽 5-10%、山楂 2-8%、茯苓 3-7%、陈皮 2-4%、大枣 1-4%、甘草 0.5-2%、生姜 0.5-1.5%、鲜萝卜 3-6%。

[0011] 根据本发明，中药复方提取物发酵中所使用的益生菌选自双歧杆菌和乳杆菌。根据本发明的一个优选实施方案，用于发酵中药复方的双歧杆菌选自两歧双歧杆菌、短双歧杆菌、青春双歧杆菌和婴儿双歧杆菌；其中所说的乳杆菌选自嗜酸乳杆菌、德氏乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌（菌种来源于中国典型培养物保藏中心（CCTCC）（中国，武汉）或中国普通微生物菌种保藏管理中心（CGMCC）（中国，北京）或者从正常人的粪便或肠粘膜组织中分离得到这些细菌菌株）。

[0012] 为制备发酵组合物，将包括具有适当重量比的麦芽、山楂、茯苓、陈皮、大枣、甘草、生姜、萝卜组成的中药复方经水提取，浓缩至适当浓度（药液体积 ml：药材质量 g = 5：1 ~ 1：1）后，再加入适量葡萄糖（0.25% ~ 1.5%）、蛋白胨（0.1% ~ 0.6%）、酵母粉（0.05% ~ 0.2%）、酵母膏（0.1% ~ 0.4%）、无机盐（ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0mg/100ml、

ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 4mg/100ml、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.024mg/100ml、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 70mg/100ml、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 100mg/100ml、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mg/100ml), 调整 pH7.0 左右并于 115℃ 下灭菌 40 分钟后, 得到继后用于益生菌发酵的底物。

[0013] 当按上述方法制备的用于益生菌发酵的底物灭菌后, 温度降至 39℃ 左右时, 接种预培养的各约 0.5% (体积 / 体积) 一种或者两种双歧杆菌的菌液, 常规培养约 2 ~ 6 小时后, 再次接种预培养的各约 0.5% (体积 / 体积) 一种或者两种乳杆菌的菌液, 然后继续发酵 20 ~ 42 小时。或同时接种预培养的各约 0.5% (体积 / 体积) 一种或者两种双歧杆菌的菌液和预培养的各约 0.5% (体积 / 体积) 一种或者两种乳杆菌的菌液, 常规发酵 22 ~ 48 小时。当 pH 降至 4.2 以下时结束发酵, 即得益生菌发酵中药复方的发酵组合物 (参见实施例 1)。

[0014] 本发明的再一个目的是提供本发明的发酵组合物在预防和治疗消化系统疾病中应用。可按照制药工业中已知的方法 (如参见 Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, 1980) 将本发明的发酵组合物与一种或多种医药上可接受的载体或赋形剂或稀释剂按适当的比例混合, 并按已知方法除菌后制成含本发明发酵组合物的制剂。

[0015] 根据给药途径的不同, 可按照已知的常规方法, 将本发明的发酵组合物配制成为适于口服给药的合剂、乳剂、酏剂、散剂、颗粒剂、片剂、丸剂、胶囊剂。根据本发明, 最好是适于使用经胃肠道口服给药的合剂或乳剂。

[0016] 为了制备适于口服给药的合剂、乳剂或片剂、散剂、胶囊剂、颗粒剂, 可以使用蔗糖、乳糖、半乳糖等二糖, 或甘露醇、山梨醇等六碳多羟基醇, 以及玉米淀粉、明胶、脂质、微晶纤维素等作为载体或赋形剂。必要时, 也可在这些口服制剂中加入缓冲盐、着色剂、甜味剂、香料、分散剂及表面活性剂。

[0017] 根据使用目的的不同, 本发明的发酵组合物制剂除含有作为基本活性成分的发酵组合物外, 还可含有一种或多种具有相同、相似或不同生物学活性, 并对基本活性成分表现有辅助或协同作用, 但彼此又互不拮抗的天然或合成的其他药物成份或其混合物。

[0018] 可将本发明的发酵组合物直接制成食品或保健食品或药物, 适于患有消化系统疾病的人预防或治疗使用。

[0019] 一般说来, 本发明的发酵组合物的口服给药剂量可根据待治疗的病症或病理状态的性质、严重程度、病人的年龄、体重、一般健康状态, 以及病人对所用药物的敏感性、耐受性和给药方式等因素, 按照个体化的原则由临床医生确定。

[0020] 为检测本发明的发酵组合物与未经过益生菌发酵的中药复方提取物促消化功能, 本发明通过对比试验, 以证明经过益生菌发酵或未经益生菌发酵的上述中药复方提取物, 对小鼠小肠推进功能和在大鼠体重、摄食量及消化酶等的影响。结果表明, 本发明的发酵组合物比未经发酵的中药复方提取物, 上述各指标均有不同程度的提高和改善, 且两者有显著性差异 (参见实施例 2 和 3)。同时为检测本发明的发酵组合物对肠道致病菌和肠道益生菌的作用, 通过体外实验, 以证明其对肠道菌群的影响。结果表明, 本发明的发酵组合物上清对某些已知肠道致病菌具有十分显著的抑菌和杀菌作用, 而对人肠道中的主要益生菌具有明显的生长促进作用 (参见实施例 4 和 5)。

## 具体实施方式

[0021] 实施例 1: 益生菌发酵健脾和胃中药复方的发酵组合物的制备

[0022] 按下列重量称取各中药成分: 麦芽 75g、山楂 50g、茯苓 50g、陈皮 25g、大枣 25g、甘草 10g、生姜 9g、鲜萝卜 41g。其中生姜、鲜萝卜取汁, 其余六味中药加 8 倍水浸泡 30 分钟, 并于 100℃ 提取 1 小时, 过滤, 再向滤渣中加 6 倍量水, 100℃ 提取 1 小时, 过滤, 并合并滤液, 减压下浓缩至 2 : 1 ~ 4 : 1 (即每 2 ~ 4ml 提取液相当于 1g 药材)。加入生姜、鲜萝卜汁, 定容至 1000ml, 即得中药复方提取物。然后再加入适量葡萄糖 (1.0%)、蛋白胨 (0.4%)、酵母粉 (0.1%)、酵母膏 (0.2%)、无机盐 ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0mg/100ml、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4mg/100ml、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.024mg/100ml、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  70mg/100ml、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  100mg/100ml、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100mg/100ml), 调整 pH7.0 左右, 并于 115℃ 下灭菌 40 分钟。当温度降至 39℃ 左右时, 接种预培养的约 0.5% (体积 / 体积) 短双歧杆菌 (AS 1.2213) 的菌液, 和各约 0.5% (体积 / 体积) 嗜酸乳杆菌 (AS 1.1854)、植物乳杆菌 (AS 1.19) 的菌液, 37℃ 发酵 22 小时检测 pH 值, pH 值降至 4.2 以下时结束发酵, 即得益生菌发酵健脾和胃中药复方提取物的发酵组合物。

[0023] 本发明中使用的益生菌包括双歧杆菌和乳杆菌, 其中双歧杆菌是人或哺乳动物体内最重要的生理性细菌, 主要分布于小肠下部和结肠内。已知双歧杆菌对于人体的营养、生长、发育及免疫功能均具有重要作用。乳杆菌是人体内分布最为广泛的益生菌。在胃肠道中, 该细菌主要分布于迴肠部。乳杆菌参与维生素, 特别是 B 族维生素的生物合成, 具有辅助食物消化、促进营养素代谢及提高宿主对乳糖的耐受性等功能。因此, 本发明选用短双歧杆菌、嗜酸乳杆菌和植物乳杆菌等常见益生菌菌株, 主要是基于它们在人肠道内分布的总体广泛性及其生理学活性的互补性。

[0024] 可以从中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) (中国, 武汉) 和中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) (中国, 北京) 购得, 或者从正常人的粪便或肠粘膜组织中分离得到这些细菌菌株。

[0025] 实施例 2: 本发明发酵组合物与未经发酵的中药复方提取物小肠推进实验

[0026] 本实施例旨在利用对小鼠小肠推进实验, 举例描述按本发明方法制备发酵组合物优于未经发酵的中药复方提取物。

[0027] 取实施例 1 制备的发酵组合物和按相似方法制备的未经益生菌发酵的中药复方提取物, 分别浓缩至相同浓度, 作为供试样品。

[0028] 取体重 18 ~ 22g 的雄性小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为模型对照组、未经发酵的中药复方提取物组、发酵组合物组、空白对照组。分别经口给予受试样品, 对照组同样途径给水, 每日 1 次, 连续 30 天。试验前, 各组动物禁食 24 小时 (期间自由饮水), 试验开始前, 试验组和对照组再分别给予受试样品和蒸馏水 1 次, 给药 0.5 小时后, 试验组和造模组分别给予蒙脱石散 (0.05g/只), 空白对照组给予蒸馏水, 0.5 小时后各组小鼠经口给予墨汁, 25 分钟后立即脱颈椎处死动物, 打开腹腔分离肠系膜, 剪取上端自幽门、下端至回盲部的肠管, 将小肠拉成直线, 测量肠管长度为“小肠总长度”, 从幽门至墨汁前沿为“墨汁推进长度”, 计算墨汁推进率。

[0029] 墨汁推进率 (%) = 墨汁推进长度 (cm) / 小肠总长度 (cm) × 100%

[0030] 实验结果如下列表 1 所示:

[0031] 表 1 :中药复方提取物经益生菌发酵前、后样品对小鼠小肠运动功能的影响

组别	动物数 (只)	墨汁推进率
模型对照组	10	0.5404±0.0447
[0032] 未发酵中药组	10	0.5712±0.0597
发酵组合物组	10	0.6578±0.0812
空白对照组	10	0.6884±0.0899

[0033] 注:模型对照组与空白对照组之间有显著性差异。说明实验造模成功;未发酵中药组与模型对照组之间有显著性差异。说明中药本身具有一定功效;发酵组合物组与未发酵中药组之间有显著性差异。说明本组方经益生菌发酵后功效明显增强。

[0034] 从本实验结果中可以看出,实施例 1 所涉及的健脾和胃中药复方提取物经益生菌发酵后促小肠运动功能明显增强。

[0035] 实施例 3 :本发明发酵组合物与未经发酵的中药复方提取物对大鼠体重、摄食量及消化酶的影响

[0036] 本实施例旨在利用对大鼠体重、摄食量及消化酶的影响,举例描述按本发明方法制备的发酵组合物优于未经发酵的中药复方提取物。

[0037] 取实施例 1 制备的发酵组合物和按相似方法制备的未经益生菌发酵的中药复方提取物,分别浓缩至相同浓度,作为供试样品。

[0038] 选用洁净级雄性大鼠 30 只,体重 140 ~ 150g,随机分为 3 组,每组 10 只,空白对照组、未经发酵的中药复方提取物组、发酵组合物组。分别经口给予受试样品每日每只 2.5ml,对照组同样途径给同体积水,每日 1 次。每周测定 2 次体重和食物摄食量,连续 30 天。在试验前一天,各组动物禁食 24 小时,禁食期间自由饮水。乙醚轻度麻醉动物,剖腹结扎幽门和十二指肠结合处,由十二指肠注入受试药物或清洁水。大鼠创口缝合后放回笼中静养 5 小时,禁食禁水。然后麻醉处死动物,取出胃,收集胃液,离心 15 分钟 (2500 转 / 分钟)。吸取上清液测量胃液量,并以 Mett 法测定胃蛋白酶活性,准确吸取胃上清液 1ml 于试管中,并加入 15ml 的盐酸 (0.05mol/L),放进蛋白管两根作为平行样。试管封口后放在 37℃ 温箱保存,24 小时后取出两根蛋白管测量其四端透明部分的长度 (mm),求平均值。计算公式:

[0039] 胃蛋白酶活性单位 (U/ml) = 四端蛋白管透明部分的长度均值<sup>2</sup> × 16

[0040] 胃蛋白酶排出量 (U/h) = 胃蛋白酶活性 × 每小时胃液量

[0041] 实验结果如下列表 2 所示:

[0042] 表 2 :发酵组合物与未经发酵的中药复方提取物对大鼠摄食量、体重和消化酶的影响

组别	动物数 (只)	摄食量	体重	酶含量
[0043] 空白对照组	10	668.1±6.7733	269.1±9.4569	0.3438±0.0190
未发酵中药组	10	698.2±14.2501	284.7±6.8484	0.3698±0.0159
发酵组合物组	10	708.0±8.8569	290.1±7.7093	0.3762±0.0169

[0044] 注：未发酵中药组与空白对照组之间有显著性差异。说明中药本身具有一定功效；发酵组合物组与未发酵中药组之间有显著性差异。说明本组方经益生菌发酵后功效明显增强。

[0045] 从本实验结果中可以看出，实施例 1 所涉及的健脾和胃中药复方提取物经益生菌发酵后，摄食量、体重和消化酶均高于空白对照组，同时也高于未发酵中药组。实验结果表明该发酵组合物能使胃肠系统的消化、吸收功能得到明显地改善和增强。

[0046] 实施例 4：本发明的发酵组合物上清对肠道致病菌的体外抑菌和杀菌活性

[0047] 本实施例旨在举例说明按本发明方法制备的发酵组合物对某些已知肠道致病菌的体外抑菌和杀菌作用。

[0048] 1. 以弗氏痢疾杆菌、携带耐药质粒的 D15 痢疾杆菌，多耐药性大肠杆菌及鼠伤寒沙门氏菌作为靶细菌，以小井法检测实施例 1 制备的发酵组合物（II 号样品）和按相似方法制备的、未经益生菌发酵的中药复方提取物（I 号样品）对这些病原菌的体外抑菌活性。首先用生理盐水  $10^5$  倍稀释的上述病原菌的 18 小时肉汤培养液涂布平板，将平板  $37^\circ\text{C}$  保温 2 小时后，用打孔器在营养琼脂平板上打孔（直径 6mm），并在各实验孔内分别加入 0.1ml 未经益生菌发酵的中药复方提取物或本发明的发酵组合物上清液。 $37^\circ\text{C}$  下厌氧保温 24 小时，然后取出琼脂板观察并记录加样孔周围的抑菌环直径（mm）。结果如下列表 3 所示。

[0049] 表 3 发酵组合物与未经发酵中药复方提取物对肠道致病菌的体外抑菌活性

致病菌	未发酵中药组	发酵组合物组
	# I	# II
[0050] 弗氏痢疾杆菌	8.0*	13.0
D15痢疾杆菌	7.5	12.5
多耐药大肠杆菌	-	9.5
鼠伤寒沙门氏菌	-	10.5

[0051] \*表中数字为样品上清的抑菌环直径毫米（mm）数。

[0052] 从表 3 中所给出的数据可以看出，在模拟肠道环境的实验条件下，按本发明方法制备的发酵组合物上清对四种常见的肠道致病菌的抑菌环直径达 9.5-13.0mm。然而，在同样条件下，未经发酵的中药复方提取物上清则几乎未出现这样的抑菌环。实验结果表明，按本发明方法制备的发酵组合物具有十分显著的体外抑菌活性。

[0053] 2、以常见的肠道致病菌弗氏痢疾杆菌、多耐药大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌作为靶细菌，以倾注平板法检测本发明的发酵组合物对这些病原微生物的体外杀菌活性。

[0054] 首先，在含有 4ml 按本发明实施例 1 制得的发酵组合物上清的试管内加入约  $4 \mu\text{l}$  致病菌混悬液（ $10^6$  个细菌 /ml），并于  $37^\circ\text{C}$  保温。于试验的 0.25、2、6 小时分别取 1ml 试验样品，适当稀释，加于 10ml 溶融的营养琼脂中，混合后倾注于玻璃平板上。将平板置于  $37^\circ\text{C}$  孵箱中保温 24 小时后观察并记录所形成的细菌菌落数。使用生理盐水（NS）作为对照。实验结果如下列表 4 所示：

[0055] 表 4 发酵组合物对肠道致病菌的体外杀菌活性

	接触时间	鼠伤寒沙门氏菌		弗氏痢疾杆菌		多耐药大肠杆菌		金黄色葡萄球菌	
		+组合物	+NS	+组合物	+NS	+组合物	+NS	+培养物	+NS
[0056]	0.25小时	289*	890	1080	1210	1240	1870	1300	1460
	2小时	0	1120	0	1140	62	1950	50	1540
	6小时	0	1320	0	1260	0	1920	0	1480

[0057] \*数值为相应致病菌加发酵组合物（实验组）或生理盐水（对照组）保温不同时间（0.25, 2, 6 小时）后，在营养琼脂平板上形成的致病菌菌落数。

[0058] 从表 4 所示的结果可以看出，胃肠道致病菌与按本发明方法制备的发酵组合物接触约 2 小时后，分散于营养琼脂培养基中的所有鼠伤寒沙门氏菌、弗氏痢疾杆菌、多耐药大肠杆菌、金黄色葡萄球菌几乎全部被杀死。接触约 6 小时后，实验用致病菌已全部被杀死。实验结果表明，按本发明方法制备的发酵组合物表现有十分显著的体外杀菌活性。

[0059] 实施例 5：本发明的发酵组合物对肠道益生菌的体外生长促进作用

[0060] 本实施例旨在举例说明按本发明方法制备的发酵组合物对长双歧杆菌 (*B. longum*)、两歧双歧杆菌 (*B. bifidum*) 和嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 的体外生长促进作用。

[0061] 使用长双歧杆菌、两歧双歧杆菌和嗜酸乳杆菌作为实验菌，实验菌经活化后按每管 0.1ml（接种后培养基细菌浓度为  $10^6$  个/ml）分别接种于（1）常规 PTYG 培养基（每升培养基含有胰蛋白胨 5g、大豆蛋白胨 5g、酵母提取物 10g、葡萄糖 10g、盐溶液 40ml、半胱氨酸盐酸盐 0.5g、吐温 80 0.1ml、0.1% 刃天青 1ml）；（2）本发明的发酵组合物（调 pH 值至 7 并灭菌）。接种后将试管置于 37℃ 下恒温培养 24 小时。培养后收集培养液，稀释，然后进行菌落计数。结果如下列表 5 所示：

[0062] 表 5 发酵组合物对双歧杆菌及嗜酸乳杆菌生长的影响

	培养基	两歧双歧杆菌	长双歧杆菌	嗜酸乳杆菌
[0063]	发酵组合物	$1.53 \times 10^8$	$1.03 \times 10^{10}$	$1.04 \times 10^8$
	PTYG培养基	$1.89 \times 10^8$	$1.22 \times 10^{10}$	$8 \times 10^8$

[0064] 从表 5 中所示的数据可以看出，将双歧杆菌和嗜酸性乳杆菌等已知的益生菌接种于本发明发酵组合物中培养 24 小时后，被接种的细菌数均增殖到  $10^8$  cfu/ml 以上。

[0065] 因此可以认为，按本发明方法制备的发酵组合物对正常人肠道中的主要益生菌具有明显的生长促进作用。虽然有关机理尚不明确，但推测这种益生菌生长促进活性与所说的本发明发酵组合物中含有的低聚糖（即所谓“双歧因子”）、水解氨基酸（包括胱氨酸等含二硫键的氨基酸）、矿物质（钙、镁、磷、钾等）、B 族维生素（B1、B2、B6）及其他氮源、碳源物质有关。