

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 2 月 27 日 (27.02.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/037532 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 1/20 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01) *A61P 25/24* (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01) *C12R 1/01* (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/101685

(22) 国际申请日: 2018 年 8 月 22 日 (22.08.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号陈卫, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 陈卫(CHEN, Wei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 王刚(WANG, Gang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号陈卫, Jiangsu 214122 (CN)。 田培郡(TIAN, Peijun); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号陈卫, Jiangsu 214122 (CN)。 赵建

新(ZHAO, Jianxin); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号陈卫, Jiangsu 214122 (CN)。 张灏(ZHANG, Hao); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号陈卫, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 南京禹为知识产权代理事务所(特殊普通合伙)(YUV (NANJING) INTELLECTUAL PROPERTY FIRM (SPECIAL GP)); 中国江苏省南京市江宁区利源南路 55 号牛首工业园 1 号楼 B 栋 2 楼王晓东, Jiangsu 211100 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: BIFIDOBACTERIUM BREVE CCFM1025, FOODS FERMENTED THEREBY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 短双歧杆菌CCFM1025、其发酵食品及其应用

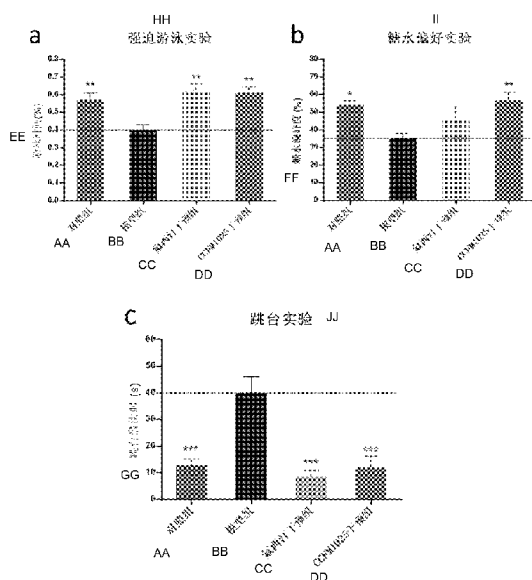


图 1

AA CONTROL GROUP
BB MODEL GROUP
CC FLUOXETINE INTERVENTION GROUP
DD CCFM1025 INTERVENTION GROUP
EE SWIMMING TIME (%)
FF SUGAR WATER PREFERENCE (%)
GG PLATFORM INCUBATION PERIOD (S)
HH FORCED SWIMMING EXPERIMENT
II SUGAR WATER PREFERENCE EXPERIMENT
JJ PLATFORM EXPERIMENT

(57) Abstract: Bifidobacterium breve CCFM1025, foods fermented thereby and an application thereof in the preparation of an anti-depression drug, an anti-inflammatory bowel disease drug, an anti-obesity drug, health products and functional foods.

(57) 摘要: 短双歧杆菌 CCFM1025、其发酵食品及其在制备抗抑郁、抗炎症性肠病、抗肥胖的药物、保健品和功能性食品中的应用。

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于
生物材料保藏的说明 (细则13之二. 4(d) (i) 和
48. 2(a) (viii))。

短双歧杆菌 CCFM1025、其发酵食品及其应用

技术领域

本发明属于微生物技术领域，具体涉及短双歧杆菌 CCFM1025、其发酵食品及其应用。

背景技术

抑郁症又称抑郁障碍，包括重度抑郁症、双相情感障碍、季节性情绪失调、产后抑郁等。作为一种异质性疾病，抑郁症的发病机制至今尚未明确阐明。不同抑郁症患者对治疗的反应具有不一致性，使其成为越来越严重的全球性疾病负担。目前世界上有超过 3.5 亿的抑郁症患者，预计到 2030 年，抑郁症将成为全球第一大疾病。

目前关于抑郁症的机制有两大解释，包括脑中单胺类神经递质失调和下丘脑-垂体-肾上腺轴（HPA）功能异常。其中单胺类神经递质失调是主要研究的方向，也被大量的病例证实，主要表现为大脑神经突触间隙的 5-羟色胺（5-HT）、多巴胺、去甲肾上腺素等神经递质水平降低。此外，作为一种持续的慢性应激状态，抑郁症能够导致 HPA 轴持续激活，分泌过量糖皮质激素（GC），导致海马体长期受到过量的 GC 攻击，损害海马神经元的结构和功能。海马损伤又进一步加重神经内分泌异常，加重抑郁症状。

基于已有的发病机制，目前用于临床的抗抑郁药物，主要集中在提高大脑突触间隙的单胺类神经递质水平（主要是 5-HT）。其中选择性 5-羟色胺重摄取抑制剂（SSRI）和 5-羟色胺和去甲肾上腺素重摄取抑制剂（SNRI）是目前的一线抗抑郁药物，占临床用药的 70% 以上。但目前的临床用药，存在以下两个问题：第一，药物起效有 2-4 周的延迟，原因是服用 SSRI 增加突触间隙的 5-HT 浓度后，5-HT 会反作用于突触前 5-HT_{1A} 受体，产生负反馈抑制，导致突触前 5-HT 的合成和分泌减少。持续服药 2-4 周，使 5-HT_{1A} 受体脱敏后，SSRI 才能真正起效。而这 2-4 周，在临床上会导致患者服药依从性降低，大大增加自杀风险。第二，大部分抗抑郁药物不具备预防作用，且长期服药会产生非特异性腹痛、便秘、腹泻、消化不良、胃胀气等副作用。因此，探索新的抗抑郁方法显得尤为重要，也显示出十分广阔的市场潜力。

“脑肠轴”是近年来提出的一个新概念，作为肠内细菌与大脑间的双向通信系统，主要通过神经途径、内分泌途径和免疫途径来调节大脑的功能以及行

为。肠道内包含大量肠道微生物（约 10^{14} - 10^{15} 个），是人体最大的微生态系统。肠道菌群及其代谢产物与宿主之间的正常交流，对于维持宿主的健康是必要的。肠道微生态的紊乱与许多疾病相关，包括糖尿病、肥胖症、炎性肠病、神经退行性疾病和肿瘤等。通过益生菌调节肠道菌群也成为治疗神经类疾病的一种新途径。

因此，筛选出一种能够调节肠道菌群，并能有效缓解抑郁的益生菌显得十分必要。对于深入挖掘益生菌的功能，开发具有更高保健价值的益生菌具有十分重要的意义。同时为利用膳食策略缓解抑郁症开辟出新的途径和解决方案。

发明内容

本部分的目的在于概述本发明的实施例的一些方面以及简要介绍一些较佳实施例。在本部分以及本申请的说明书摘要和发明名称中可能会做些简化或省略以避免使本部分、说明书摘要和发明名称的目的模糊，而这种简化或省略不能用于限制本发明的范围。

鉴于上述的技术缺陷，提出了本发明。

因此，作为本发明其中一个方面，本发明克服现有技术中存在的不足，提供短双歧杆菌 CCFM1025 (*Bifidobacterium breve*)，于 2018 年 6 月 11 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏地址为广州市先烈中路 100 号大院 59 号楼 5 楼广东省微生物研究所，保藏编号为 GDMCC No.60386。

作为本发明另一个方面，本发明克服现有技术中存在的不足，提供一种发酵食品。

为解决上述技术问题，本发明提供如下技术方案，其中：所述发酵食品为使用短双歧杆菌 CCFM1025 发酵生产制得，所述发酵食品包括固态食品、液态食品、半固态食品。

作为本发明所述发酵食品的一种优选方法，其中：所述发酵食品包括乳制品、豆制品、果蔬制品，所述乳制品包括牛奶、酸奶油、干酪；所述果蔬制品包括黄瓜、胡萝卜、甜菜、芹菜、圆白菜制品。

作为本发明另一个方面，本发明克服现有技术中存在的不足，提供短双歧杆菌 CCFM1025 在制备体内定植益生菌中的应用。

作为本发明另一个方面，本发明克服现有技术中存在的不足，提供短双歧杆菌 CCFM1025 在制备抗抑郁、抗炎症性肠病、抗肥胖药物和保健品中的应

用。

作为本发明所述短双歧杆菌 CCFM1025 在制备体内定植益生菌中的应用的一种优选方案，其中：所述短双歧杆菌 CCFM1025 能够改善抑郁小鼠的抑郁样行为、提高抑郁小鼠脑中的 5-羟色胺（5-HT）、5-羟色氨酸（5-HTP）和脑源神经营养因子（BDNF）的水平、降低抑郁小鼠血清中的皮质酮水平；所述短双歧杆菌 CCFM1025 能够提高抑郁小鼠血清中的 5-羟色胺水平，改善胃肠道蠕动功能；所述短双歧杆菌 CCFM1025 能够改善改善抑郁小鼠的肠道菌群紊乱，降低肠道韦荣球菌科（*Veillonellaceae*）的丰度，提高双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）和支原体科（*Allobaculum*）的丰度，提高肠道菌群 α -多样性，减少炎症性肠病和肥胖的发生；所述短双歧杆菌能够提高模拟肠嗜铬细胞（RIN14B 细胞）中色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 水平，并提高该细胞 5-羟色氨酸的分泌量，能够特异性地通过刺激肠道嗜铬细胞产生 5-羟色氨酸从而为脑中 5-羟色胺的合成提供前体物质。

作为本发明另一个方面，本发明克服现有技术中存在的不足，提供权利要求 2 或 3 所述的发酵食品在制备抗抑郁、抗炎症性肠病、抗肥胖功能性食品中的应用。

作为本发明所述发酵食品在制备抗抑郁功能性食品中的应用的一种优选方案，其中：所述短双歧杆菌 CCFM1025 能够改善抑郁小鼠的抑郁样行为、提高抑郁小鼠脑中的 5-羟色胺、5-羟色氨酸和脑源神经营养因子的水平、降低抑郁小鼠血清中的皮质酮水平；所述短双歧杆菌 CCFM1025 能够提高抑郁小鼠血清中的 5-羟色胺水平，改善胃肠道蠕动功能；所述短双歧杆菌 CCFM1025 能够改善改善抑郁小鼠的肠道菌群紊乱，降低肠道韦荣球菌科（*Veillonellaceae*）的丰度，提高双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）和支原体科（*Allobaculum*）的丰度，提高肠道菌群 α -多样性，减少炎症性肠病和肥胖的发生；所述短双歧杆菌能够提高模拟肠嗜铬细胞（RIN14B 细胞）中色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 水平，并提高该细胞 5-羟色氨酸的分泌量，能够特异性地通过刺激肠道嗜铬细胞产生 5-羟色氨酸从而为脑中 5-羟色胺的合成提供前体物质。

为解决上述技术问题，本发明提供了如下技术方案：

本发明的有益效果：在抑郁模型小鼠实验中，服用 CCFM1025 能够显著缓解小鼠的抑郁样行为，评估指标包括强迫游泳实验、糖水偏好实验和跳台实

验；服用 CCFM1025 能够显著提高抑郁小鼠海马体中的 5-羟色氨酸和 5-羟色胺的水平，同时显著提高大脑前额叶皮质中 BDNF 的水平；服用 CCFM1025 能够显著降低抑郁小鼠血清中的皮质酮水平，缓解抑郁引起的 HPA 功能亢进；服用 CCFM1025 能够提高抑郁小鼠血清组织中的 5-羟色胺水平，改善其肠道蠕动功能。服用 CCFM1025 能够改善抑郁引起的肠道菌群紊乱，增加肠道菌群的 α -多样性，还能够降低肠道韦荣球菌科 (Veillonellaceae) 的丰度、提高双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 和支原体科 (Allobaculum) 的丰度，并使肠道菌群趋于正常化，减少炎症性肠病和肥胖的发生。体外实验结果表明，CCFM1025 能够提高模拟肠嗜铬细胞 (RIN14B 细胞) 中色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 水平，并提高该细胞 5-羟色氨酸的分泌量，能够特异性地通过刺激肠道嗜铬细胞产生 5-羟色氨酸从而为脑中 5-羟色胺的合成提供前体物质。

本发明所述的短双歧杆菌 CCFM1025 可用于制备具有抗抑郁功能的食物、保健品和药品，具有非常广泛的应用前景。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案，下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动性的前提下，还可以根据这些附图获得其它的附图。其中：

图 1 为本菌株干预抑郁小鼠六周后，小鼠的行为学变化示意图。(a) 强迫游泳实验；(b) 糖水偏好实验；(c) 跳台实验；其中 $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ ， $***P<0.001$ (vs 模型组)。

图 2 为本菌株干预抑郁小鼠六周后，海马组织中 5-羟色胺 (5-HT，图 a) 和 5-羟色氨酸 (5-HTP，图 b)、前额叶皮质中脑源神经营养因子 (BDNF，图 c) 的水平变化示意图；其中 $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ ， $***P<0.001$ (vs 模型组)。

图 3 为本菌株干预抑郁小鼠六周后，小鼠血清中皮质酮水平示意图；其中 $**P<0.01$ ， $***P<0.001$ (vs 模型组)。

图 4 为本菌株干预抑郁小鼠六周后，小鼠血清中 5-HT 水平示意图；其中 $**P<0.01$ (vs 模型组)。

图 5 为本菌株干预抑郁小鼠六周后，小鼠肠道菌群 α -多样性变化示意图；其中 $*P<0.05$ (vs 模型组)。

图 6 为本菌株干预抑郁小鼠六周后，小鼠肠道菌群 β -多样性变化示意图。

图 7 为本菌株干预抑郁小鼠六周后，小鼠肠道中韦荣球菌科 (Veillonellaceae)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 和支原体科 (*Allobaculum*) 的变化示意图；其中 $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ ， $***P<0.001$ 。

图 8 为本菌株刺激 RIN14B 细胞后，细胞内色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 水平和细胞上清中 5-羟色氨酸含量的变化示意图；其中 $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ 。

具体实施方式

为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂，下面结合具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。

在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明，但是本发明还可以采用其他不同于在此描述的其它方式来实施，本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似推广，因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

其次，此处所称的“一个实施例”或“实施例”是指可包含于本发明至少一个实现方式中的特定特征、结构或特性。在本说明书中不同地方出现的“在一个实施例中”并非均指同一个实施例，也不是单独的或选择性的与其他实施例互相排斥的实施例。

本发明的短双歧杆菌 CCFM1025 (*Bifidobacterium breve*)，于 2018 年 6 月 11 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏地址为广州市先烈中路 100 号大院 59 号楼 5 楼广东省微生物研究所，保藏编号为 GDMCC No.60386。

所述短双歧杆菌 CCFM1025 具有以下生物学特性：

- (1) 菌体特征：呈革兰氏染色阳性，不形成孢子，不运动的细菌。
- (2) 菌落特征：菌落小，乳白色，圆形，边缘整齐，微凸起，不透明，表面湿润光滑；
- (3) 生长特性：该菌株的最低生长温度为 15℃，最高生长温度为 45℃，在温度 35-37℃下生长最佳，最适生长 pH 为 6.5，培养 18h 后进入稳定期；
- (4) 在抑郁小鼠模型中能够显著改善小鼠的行为学表现；
- (5) 在抑郁小鼠模型中能够提高小鼠脑中的 5-HT、5-HTP 和 BDNF 的水平；
- (6) 在抑郁小鼠模型中能降低小鼠血清皮质酮的水平；

(7) 在抑郁小鼠模型中能提高抑郁小鼠血清组织中的 5-HT 水平, 改善其肠道蠕动功能;

(8) 能降低抑郁小鼠肠道中韦荣球菌科 (Veillonellaceae) 的丰度、提高双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 和支原体科 (*Allobaculum*) 的丰度, 增加肠道菌群的 α -多样性, 改善抑郁引起的肠道菌群紊乱, 减少炎症性肠病和肥胖的发生。

所述短双歧杆菌 CCFM1025 的提取方法为:

(一) 双歧杆菌的分离筛选:

(1) 取 1g 健康成年人的新鲜粪便。梯度稀释后涂布于 mMRS 固体培养基, 置于厌氧环境下 37°C 培养 72 小时;

(2) 观察记录菌落形态, 挑取菌落划线纯化;

(3) 在 mMRS 液体培养基中, 37°C 培养 48 小时, 所得菌落进行革兰氏染色, 记录菌落形态。

(4) 弃除菌落中的革兰氏阴性菌菌株和革兰氏阳性球菌, 挑选得到革兰氏阳性杆菌。

(5) 过氧化氢酶分析后, 弃除过氧化氢酶阳性菌株, 保留过氧化氢酶阴性菌株。

(二) 双歧杆菌的初步鉴定: 果糖-6-磷酸盐磷酸酮酶测定法

(1) 将步骤 (一) 所筛选得到的乳酸菌在液体 mMRS 培养液中培养 24h, 然后取 1mL 培养物 8000rpm 离心 2min;

(2) 用含 0.05% (质量百分数) 半胱氨酸盐酸盐的 pH6.5 的 0.05M KH_2PO_4 溶液洗涤两次;

(3) 重悬于 200 μL 添加了 0.25% (质量百分数) Triton X-100 的上述磷酸盐缓冲液;

(4) 添加 50 μL 浓度为 6mg/mL 氟化钠和 10mg/mL 碘乙酸钠的混合液以及 50 μL 浓度为 80mg/mL 的果糖-6-磷酸, 37°C 孵育 1h;

(5) 添加 300 μL 浓度为 0.139g/mL、pH 6.5 的盐酸羟胺, 并于室温放置 10 min;

(6) 分别添加 200 μL 15% (质量百分数) 的三氯乙酸和 4M HCl;

(7) 添加 200 μL 含有 5% (质量百分数) 三氯化铁的 0.1M HCl, 体系迅

速变为红色,即为 F6PPK 阳性,初步断定其为双歧杆菌。

(三) 双歧杆菌的分子生物学鉴定:

(1) 单菌基因组抽提: 将步骤(二)所筛选得到的双歧杆菌培养过夜,取培养过夜的菌悬液 1mL 于 1.5 mL 离心管, 10000rpm 离心 2min, 弃上清得菌体; 用 1mL 无菌水吹洗菌体后, 10000rpm 离心 2min, 弃上清得菌体; 加入 200 μ L SDS 裂解液, 80 $^{\circ}$ C 水浴 30min; 加入酚-氯仿溶液 200 μ L 于菌体裂解液中, 其中酚-氯仿溶液的组成成分及体积比为 Tris 饱和酚: 氯仿: 异戊醇=25:24:1, 颠倒混匀后, 12000rpm 离心 5-10min, 取上清 200 μ L; 加入 400 μ L 冰乙醇或冰异丙醇于 200 μ L 上清中, -20 $^{\circ}$ C 静置 1h, 12000rpm 离心 5-10min, 弃上清; 加入 500 μ L 70% (体积百分数) 冰乙醇重悬沉淀, 12000rpm 离心 1-3min, 弃上清; 60 $^{\circ}$ C 烘箱烘干, 或者自然晾干; 50 μ L ddH₂O 重溶沉淀以备 PCR;

(2) 16S rDNA PCR:

A. 细菌 16S rDNA 50 μ L PCR 反应体系:

10 $\times$ Taq buffer, 5 μ L; dNTP, 5 μ L; 27F, 0.5 μ L; 1492R, 0.5 μ L; Taq 酶, 0.5 μ L; 模板, 0.5 μ L; ddH₂O, 38 μ L。

B. PCR 条件:

95 $^{\circ}$ C 5min; 95 $^{\circ}$ C 10s; 55 $^{\circ}$ C 30s; 72 $^{\circ}$ C 30s; step2-4 30 $\times$; 72 $^{\circ}$ C 5min; 12 $^{\circ}$ C 2min;

C. 制备 1% 琼脂糖凝胶, 之后将 PCR 产物与 10000 $\times$ loading buffer 混合, 上样量 2 μ L, 120V 跑 30min, 然后进行凝胶成像;

D. 将得到 PCR 产物送专业测序公司, 将得到的测序结果与使用 BLAST 在 GeneBank 中进行搜索和相似性比对, 鉴定为短双歧杆菌。

(3) 全基因组测序

将提取的全基因组送专业测序公司, 利用二代测序仪对菌的全基因组进行测序, 将得到的序列结果使用 BLAST 在 GeneBank 中进行搜索和相似性比对, 测序结果鉴定为属于短双歧杆菌的一种新发现的菌株。菌株-80 $^{\circ}$ C 保藏备用。

实施例 1: 短双歧杆菌 CCFM1025 能够显著改善抑郁小鼠的行为学指标

取 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 32 只, 适应环境一周后, 根据体重随机分为四组: 对照组、模型组、氟西汀干预组、CCFM1025 干预组, 每组含 8 只小鼠。动物分组及处理方法见表 1。

表 1 动物实验分组及处理方法

组别	处理方法	实验周期
对照组	自由饮食饮水, 灌胃对照溶剂	6 周
模型组	慢性不可预知应激; 自由饮食饮水, 灌胃对照溶剂	6 周
氟西汀干 预组	慢性不可预知应激; 自由饮食饮水, 灌胃 10mg/kg 氟西汀	6 周
CCFM1025 干预组	慢性不可预知应激; 自由饮食饮水, 灌胃 10^9 cfu 活的乳酸菌	6 周

慢性不可预知应激抑郁小鼠模型: 每天随机采用 1-2 种刺激, 每天刺激的时间随机决定, 避免昼夜节律。每种方法不超过三次, 为期五周。刺激因素包括: (1) 禁食 24h; (2) 禁水+空瓶刺激 24h; (3) 夹尾 3min; (4) 潮湿垫料 24h; (5) 制动 1~2h; (6) 45°倾斜笼盒 24h; (7) 持续光照 24h; (8) 无垫料 24h; (9) 强迫游泳 15 分钟; (10) 孤养 24h。

乳酸菌灌胃剂: 取活化 2 代的双歧杆菌 CCFM1025 并于 37°C 下培养至 24h, 于 4°C、8000r/min 离心 3min 收集菌体, 弃去上清并用 5% 灭菌脱脂乳液重悬菌体, 使乳酸菌浓度达到 5×10^9 CFU/mL。灌胃体积为 0.2mL/只/天。

第五周开始, 停止每日的慢性不可预知应激以及药物和益生菌的干预, 同时对所有小鼠进行行为学测试。包括强迫游泳实验、悬尾实验、糖水偏好实验、旷场实验和跳台实验。具体实施方法和结果如下:

(1) 强迫游泳实验:

强迫游泳实验是一种行为绝望实验法, 是用于评价药物抗抑郁作用的经典实验模型。实验桶内装入大约 20cm 高的清水, 水温在 $24 \pm 1^\circ$ 左右, 在正式实验前 24 小时, 每只小鼠均进行 15 分钟的游泳训练测试。正式实验时, 每只小鼠进行 6 分钟测试。使用摄像头对实验全程录像。记录不动(漂浮)时间, 即四肢不动或仅后肢轻微运动。实验结果如图 1a 所示, 抑郁组小鼠在水中的游泳时间显著降低, 表现出行为绝望的特点。而服用 CCFM1025 能够显著改善这一现象, 表明小鼠抑郁症状减轻。

(2) 糖水偏好实验:

糖水偏好测试是检测抑郁症快感缺失的模型。在开始测试之前, 笼内放置

两个相同的饮水瓶，使小鼠适应性饮水至少 3 天。适应结束后，将其中一瓶水替换为含有 1% 蔗糖的水溶液。通过称量瓶子重量来检测水和蔗糖溶液的摄入量。每天更换两个瓶子的位置，以减少因水量不同引起的饮水偏好。蔗糖偏好计算公式为：蔗糖偏好 = $V(\text{蔗糖溶液}) / [V(\text{蔗糖溶液}) + V(\text{水})] \times 100\%$ ，总共测试 3 天，取平均值。实验结果如图 1b 所示，抑郁小鼠的糖水偏好程度显著下降，服用 CCFM1025 后，小鼠恢复至正常的糖水偏好程度，表明 CCFM1025 能缓解抑郁导致的快感缺失。

(3) 跳台实验：

第一阶段为电击训练阶段。将小鼠放入跳台反应箱的平台上，反应箱底部电栅通电（38V），当小鼠从平台上跳下时，即遭受一次电击刺激。训练时间为 3min，若个别小鼠 3 分钟内没有跳下平台，则人为将其赶下，确保所有动物均遭受到电击伤害，造成伤害感受性记忆。训练完毕后放回原笼饲养。第二阶段（电击训练后 24h）为记忆再现测试阶段。将小鼠放入反应箱平台上，测试时间为 3 分钟，本次测试不通电，记录小鼠从站上平台到第 1 次跳下的时间（在平台上停留的时间）即跳台潜伏期，如果小鼠一直未跳下平台则以 180s 计算。整个实验过程中尽量避免对动物行为的人为干扰。实验结果表明（图 1c），抑郁小鼠的跳台潜伏期显著升高，代表抑郁和焦虑程度增加，而服用 CCFM1025 能够缓解其焦虑程度。

实施例 2：CCFM1025 能显著提高抑郁小鼠脑内神经递质水平

实施例 2 中的小鼠于第六周末安乐处死，取小鼠脑组织，并于冰上分离海马和前额叶皮质。分别取一定质量的新鲜海马和前额叶皮质组织（重量不低于 50mg），加入 9 倍体积的无菌 PBS 缓冲液（相当于 1g 组织加 9ml 的匀浆液），用组织匀浆器进行匀浆，组织液经过 3000g、20min 离心后取上清，用 ELISA 试剂盒检测 5-HT 和 BDNF 含量。海马组织液上清加入等体积的 5% 高氯酸沉淀蛋白，10000g 离心 10min，吸取上清液经 0.22 μ m 水系滤膜过滤后，采用高效液相色谱-荧光检测法（HPLC-FLD）进行 5-HTP 的含量测定。色谱柱采用岛津 Intertsil ODS-3（5 μ m，4.6mm $\times$ 250mm），流动相 A 为 0.1mol/L 的 NaAc（其中含有 0.1mmol/L 的 EDTA-2Na），pH5.1。流动相 B 为甲醇，流动相 A：B=85:15，流速 1.0mL/min，荧光检测激发波长为 290nm，发射波长为 330nm，进样量为 10 μ L。实验结果如图 2 所示，结果表明，服用 CCFM1025 能够显著

逆转应激造成的海马中 5-HT、5-HTP 和前额叶皮质中 BDNF 水平的降低。其中，CCFM1025 对海马 5-HTP 和 5-HT 的改善程度和氟西汀相当，对前额叶皮质中 BDNF 的改善效果显著优于氟西汀。

实施例 3：短双歧杆菌 CCFM1025 能够降低小鼠血清中皮质酮水平

实施例 2 中的小鼠于第六周末安乐处死，收集小鼠血液，1000g 离心 15min 获得血清。用 ELISA 试剂盒检测血清中皮质酮的含量。实验结果表明（图 3），抑郁小鼠由于持续的慢性应激，出现下丘脑-垂体-肾上腺轴（HPA）功能亢进，血清中皮质酮水平显著升高，服用 CCFM1025 能显著降低抑郁小鼠血清中的皮质酮水平，缓解 HPA 亢进，显示出良好的抗抑郁功效。

实施例 4：短双歧杆菌 CCFM1025 能够提高抑郁小鼠血清 5-HT 水平

取实施例 4 中的血清，用 ELISA 试剂盒检测血清中的 5-HT 含量。外周组织中的 5-HT 对维持正常的肠道蠕动功能具有重要意义。外周组织的 5-HT 能够激动胃肠道平滑肌 5-HT₂ 受体，或作用于肠壁内神经节细胞 5-HT₄ 受体，引起胃肠道平滑肌收缩，使胃肠道张力增加，肠蠕动加快；外周组织 5-HT 的减少与便秘、胃肠道不适等疾病有直接的关联。实验结果表明（图 4），抑郁小鼠外周组织 5-HT 显著降低，肠道蠕动功能受损。服用氟西汀虽然有抗抑郁效果，但无法改善抑郁小鼠的肠道功能。而服用 CCFM1025 不仅能够缓解抑郁症状，还能显著提高血清中 5-HT 的含量，使之恢复至正常水平，恢复抑郁小鼠的正常肠道蠕动功能。

实施例 5：短双歧杆菌 CCFM1025 对抑郁小鼠肠道菌群的调节作用及其多功能调节作用

取实施例 2 中小鼠第六周末的新鲜粪便，采用 MP 的粪便试剂盒提取小鼠粪便样品中总 DNA。具体操作步骤如下主要参照试剂盒说明书进行。以小鼠粪便基因组为模板，以上游引物 520F (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3')、下游引物 802R (5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3') 为引物扩增 16S rDNA 的 V3-V4 区片段，目的片段长度为 247bp 左右。PCR 反应结束，将观察到目的条带的所有 PCR 样品再次进行电泳，配制 2.0% 琼脂糖凝胶，于 120V 条件下电泳 40min，跑胶结束后，在紫外灯下快速进行目的条带的切割。按照 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒说明书进行目的条带胶回收。根据 Qubit DNA3.0 试剂盒检测样品 DNA 浓度，随后根据 TurSeq DNA LT Sample Preparation Kit 及其说明构建文库，最后根据 MiSeq Regent Kit 及其说明经过 Illumina Miseq 测序仪上机测定。测序完成后，剔除掉序列长度 < 200 bp、引物序列、不能拼接的单序列，按照重叠碱基 > 10 bp 且

无错配的标准拼接序列。将相似度大于97%序列定义为一个分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU)，通过Ribosomal Database Project (RDP) Naïve Bayesclassifier来确定物种。计算样品的 α -多样性、 β -多样性，用来评估样品的菌群多样性。其中 α -多样性用chao1和PD whole tree指数来表征，结果显示 (图5)，抑郁小鼠的肠道菌群， α -多样性降低，表明抑郁伴随着一定程度的肠道菌群紊乱。服用CCFM1025能显著上调肠道菌群的 α -多样性，改善肠道菌群的物种丰度程度。 β -多样性用主坐标分析 (PCoA) 进行评估 (图6)，结果表明抑郁小鼠肠道菌群与正常小鼠存在显著差异，小鼠服用CCFM1025后其肠道菌群与抑郁组小鼠的菌群实现一定程度的分离，并有向正常小鼠菌群转化的趋势。

此外，韦荣球菌科 (Veillonellaceae) 丰度在抑郁小鼠中显著提高，而服用CCFM1025能够显著逆转这一现象；韦荣球菌科包括6个属和25个种，为革兰氏阴性、厌氧或微需氧球菌和球杆菌。其中部分菌为条件致病菌，常见于人和动物的微生物感染疾病中，在重度骨关节炎和心内膜炎中也有发现。服用CCFM1025还能增加双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 和支原体科 (*Allobaculum*) 的丰度。其中，双歧杆菌属具有生物屏障、营养作用、抗肿瘤、增强免疫、改善胃肠道功能、抗衰老等多种重要的生理功能，是一种生理性有益菌。支原体科能够产生短链脂肪酸，尤其是丁酸，不仅能够为肠上皮细胞氧化供能，而且还有维持水电解质平衡、调节肠道菌群平衡、调节肠道屏障功能等重要作用。此外，短链脂肪酸能通过G蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 激活途径和组蛋白脱乙酰基酶 (histone deacetylases, HDACs) 抑制途径两条信号通路发挥抗炎作用，对炎症性肠病 (Inflammatory bowel disease, IBD) 和肥胖均具有显著的改善作用。以上结果表明CCFM1025在抗抑郁功能的基础上，还同时具备调节肠道菌群、调节免疫及肠道屏障、减少炎症性肠病和肥胖发生的多重功能。

实施例6：双歧杆菌CCFM1025对RIN14B细胞5-HTP合成的影响

细胞上清中 5-HTP 的测定：RIN14B 细胞以 $4 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度种在 24 孔板，孵育 72h。弃去培养基，用含有 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 $2\mu\text{M}$ 氟西汀的 HBSS (1mL) 清洗细胞，加入 1mL 含有 CCFM1025 的 HBSS 悬液 (对照组为不含菌体的 HBSS)， 37°C 孵育 20min，收集上清，6000g 离心 5min 去除沉淀，取上清液冷冻于 -80°C 待测。HPLC-FLD 检测细胞上清中的 5-HTP (参考实施例 3)。

TPH1的mRNA测定：上述步骤中的贴壁细胞用HBSS洗涤三次，加入1mL Trizol，置于冰上孵育5-10min，吹打使细胞脱落，将裂解液转移至无酶EP管。采用常规方法提取细胞总RNA，根据反转录试剂盒的说明进行cDNA的合成（Prime Script RT reagent Kit gDNA Eraser，Takara）。合成的cDNA样品经过超微量分光光度计（NanoDrop 2000C）检测其浓度和纯度（A260/A280），-80℃保存待用。用荧光染料SYBR Green super mix（Qiagen, Germany）混合样本，PCR体系为5μL mix、1μL cDNA、1μL正向和反向引物，用dd水补至总体积为10μL。在实时荧光定量基因扩增仪器CFX96™ Real-Time System（Bio-Rad, USA）上进行检测，每个样本设立3个平行孔，并以管家基因β-Actin为内参，所得结果用 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 的方法进行分析；所用的引物序列见表2。

表 2 qPCR 引物序列

基因	序列
TPH1	Forward-5' -GCCTGTTACACATCGAGTCCC-3'
	Reverse-5' -ACAGTCTCCATAACGTCTTCCTT-3'
β-Actin	Forward-5' -CAGTCGGTTGGAGCGAGCAT-3'
	Reverse-5' -GGACTTCCTGTAACAACGCATCT-3'

结果表明，CCFM1025刺激RIN14B细胞后，细胞内TPH1的mRNA水平显著提高。相应地，细胞分泌5-HTP的量也显著提高。肠嗜铬细胞分泌的5-HTP能够进入血液循环，并通过血脑屏障，为脑中5-HT的合成提供前体物质。因此CCFM1025能够特异性地通过刺激肠嗜铬细胞分泌5-HTP从而促进大脑中5-HT的合成，实现抗抑郁功能。

实施例7：利用本发明短双歧杆菌CCFM1025制造含该菌的发酵食品

选用新鲜蔬菜洗净后榨汁，接着进行高温瞬间灭菌，在温度140℃下高温热杀菌2秒后，立即降温至37℃，再接入本发明制备的短双歧杆菌CCFM1025菌剂发酵剂，使其浓度达到 10^6 CFU/mL以上，在温度4℃下冷藏保存，于是得到含有本发明短双歧杆菌CCFM1025活菌的果蔬饮料。

利用本发明能够使用短双歧杆菌 CCFM1025 发酵生产制备其他发酵食品，所述发酵食品包括固态食品、液态食品、半固态食品。所述发酵食品包括乳制品、豆制品、果蔬制品，所述乳制品包括牛奶、酸奶油、干酪；所述果蔬制品包括黄瓜、胡萝卜、甜菜、芹菜、圆白菜制品。

所述发酵食品能够改善抑郁小鼠的抑郁样行为、提高抑郁小鼠脑中的 5-羟色胺、5-羟色氨酸和脑源神经营养因子的水平、降低抑郁小鼠血清中的皮质

酮水平；所述发酵食品能够提高抑郁小鼠血清中的 5-羟色胺水平，改善胃肠道蠕动功能；所述发酵食品能够改善改善抑郁小鼠的肠道菌群紊乱，降低肠道韦荣球菌科（*Veillonellaceae*）的丰度，提高双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）和支原体科（*Allobaculum*）的丰度，提高肠道菌群 α -多样性，减少炎症性肠病和肥胖的发生；能够提高模拟肠嗜铬细胞（RIN14B 细胞）中色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 水平，并提高该细胞 5-羟色氨酸的分泌量，能够特异性地通过刺激肠道嗜铬细胞产生 5-羟色氨酸从而为脑中 5-羟色胺的合成提供前体物质。

应说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的精神和范围，其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

权 利 要 求 书

1、短双歧杆菌 CCFM1025 (*Bifidobacterium breve*)，于 2018 年 6 月 11 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏地址为广州市先烈中路 100 号大院 59 号楼 5 楼广东省微生物研究所，保藏编号为 GDMCC No.60386。

2、一种发酵食品，其特征在于：所述发酵食品为使用短双歧杆菌 CCFM1025 发酵生产制得，所述发酵食品包括固态食品、液态食品、半固态食品。

3、如权利要求 2 所述的发酵食品，其特征在于：所述发酵食品包括乳制品、豆制品、果蔬制品，所述乳制品包括牛奶、酸奶油、干酪；所述果蔬制品包括黄瓜、胡萝卜、甜菜、芹菜、圆白菜制品。

4、短双歧杆菌 CCFM1025 在制备体内定植益生菌中的应用。

5、短双歧杆菌 CCFM1025 在制备抗抑郁、抗炎症性肠病、抗肥胖药物和保健品中的应用。

6、如权利要求 5 所述的应用，其特征在于：所述短双歧杆菌 CCFM1025 能够改善抑郁小鼠的抑郁样行为、提高抑郁小鼠脑中的 5-羟色胺(5-HT)、5-羟色氨酸(5-HTP)和脑源神经营养因子(BDNF)的水平、降低抑郁小鼠血清中的皮质酮水平；所述短双歧杆菌 CCFM1025 能够提高抑郁小鼠血清中的 5-羟色胺水平，改善胃肠道蠕动功能；所述短双歧杆菌 CCFM1025 能够改善改善抑郁小鼠的肠道菌群紊乱，降低肠道韦荣球菌科 (Veillonellaceae) 的丰度，提高双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 和支原体科 (Allobaculum) 的丰度，提高肠道菌群 α -多样性，减少炎症性肠病和肥胖的发生；所述短双歧杆菌能够提高模拟肠嗜铬细胞（即 RIN14B 细胞）中色氨酸羟化酶 1(TPH1)的 mRNA 水平，并提高该细胞 5-羟色氨酸的分泌量，能够特异性地通过刺激肠道嗜铬细胞产生 5-羟色氨酸从而为脑中 5-羟色胺的合成提供前体物质。

7、权利要求 2 或 3 所述的发酵食品在制备抗抑郁、抗炎症性肠病、抗肥胖的功能性食品中的应用。

8、如权利要求 7 所述的应用，其特征在于：所述短双歧杆菌 CCFM1025 能够改善抑郁小鼠的抑郁样行为、提高抑郁小鼠脑中的 5-羟色胺、5-羟色氨酸和脑源神经营养因子的水平、降低抑郁小鼠血清中的皮质酮水平；所述短双歧杆菌 CCFM1025 能够提高抑郁小鼠血清中的 5-羟色胺水平，改善胃肠道蠕动功能；所述短双歧杆菌 CCFM1025 能够改善改善抑郁小鼠的肠道菌群紊乱，降低肠道韦荣球菌科 (Veillonellaceae) 的丰度，提高双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 和支

原体科 (Allobaculum) 的丰度, 提高肠道菌群 α -多样性, 减少炎症性肠病和肥胖的发生; 所述短双歧杆菌能够提高模拟肠嗜铬细胞 (RIN14B 细胞) 中色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 水平, 并提高该细胞 5-羟色氨酸的分泌量, 能够特异性地通过刺激肠道嗜铬细胞产生 5-羟色氨酸从而为脑中 5-羟色胺的合成提供前体物质。

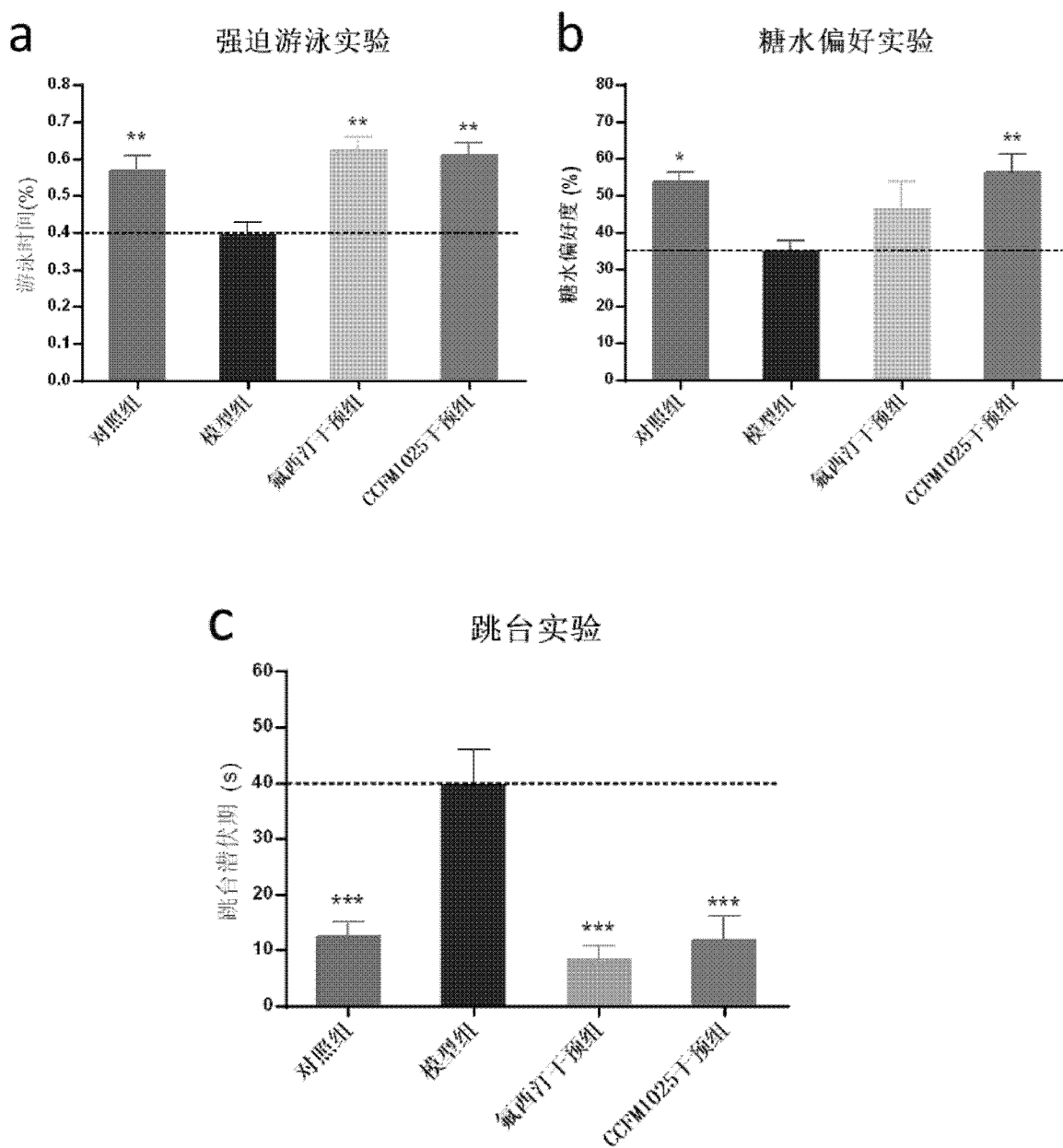


图 1

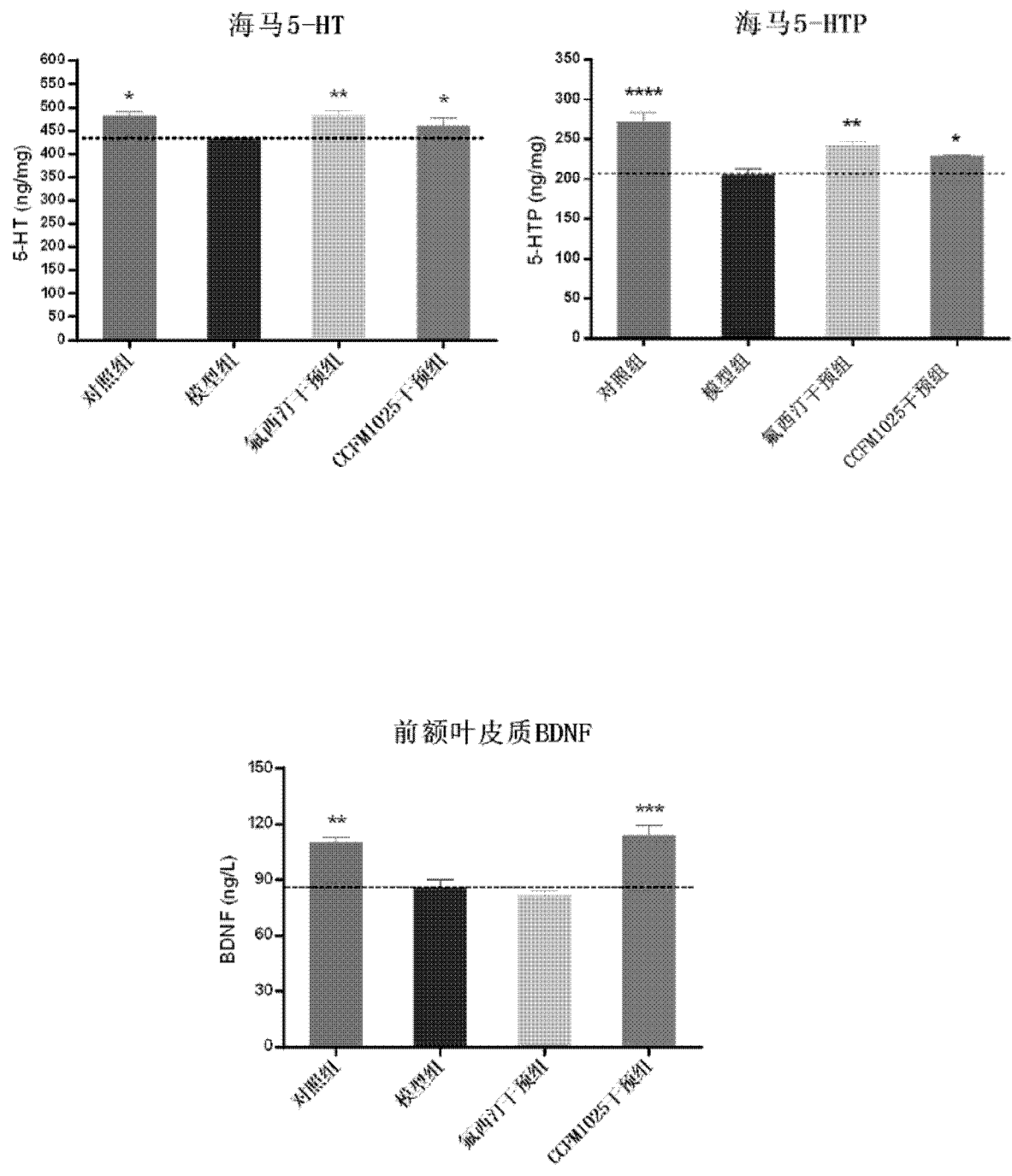


图 2

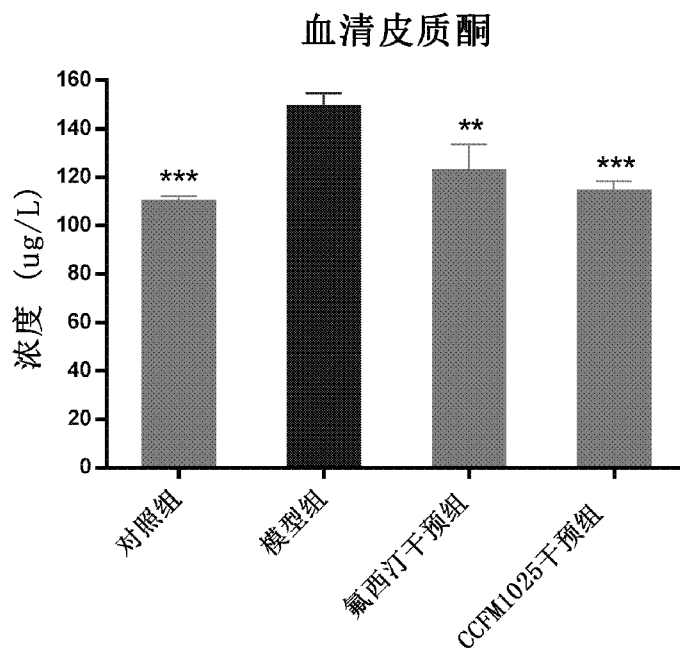


图 3

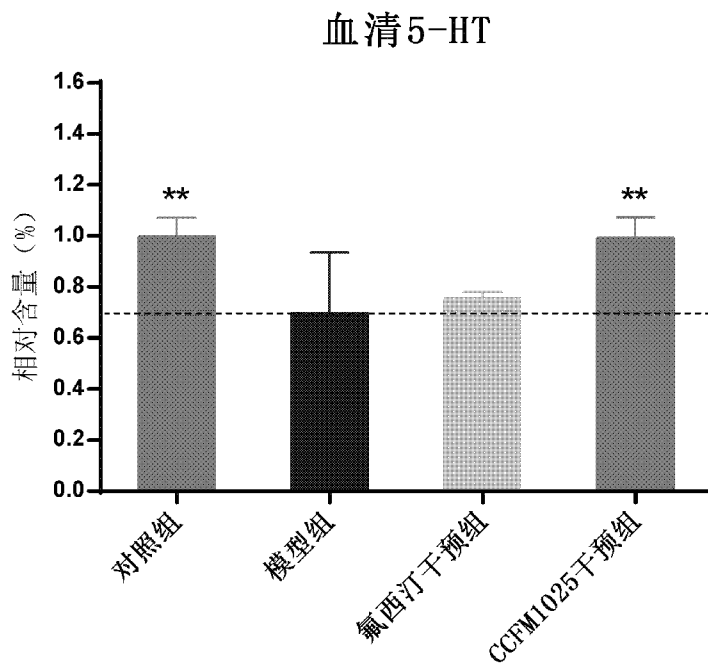


图 4

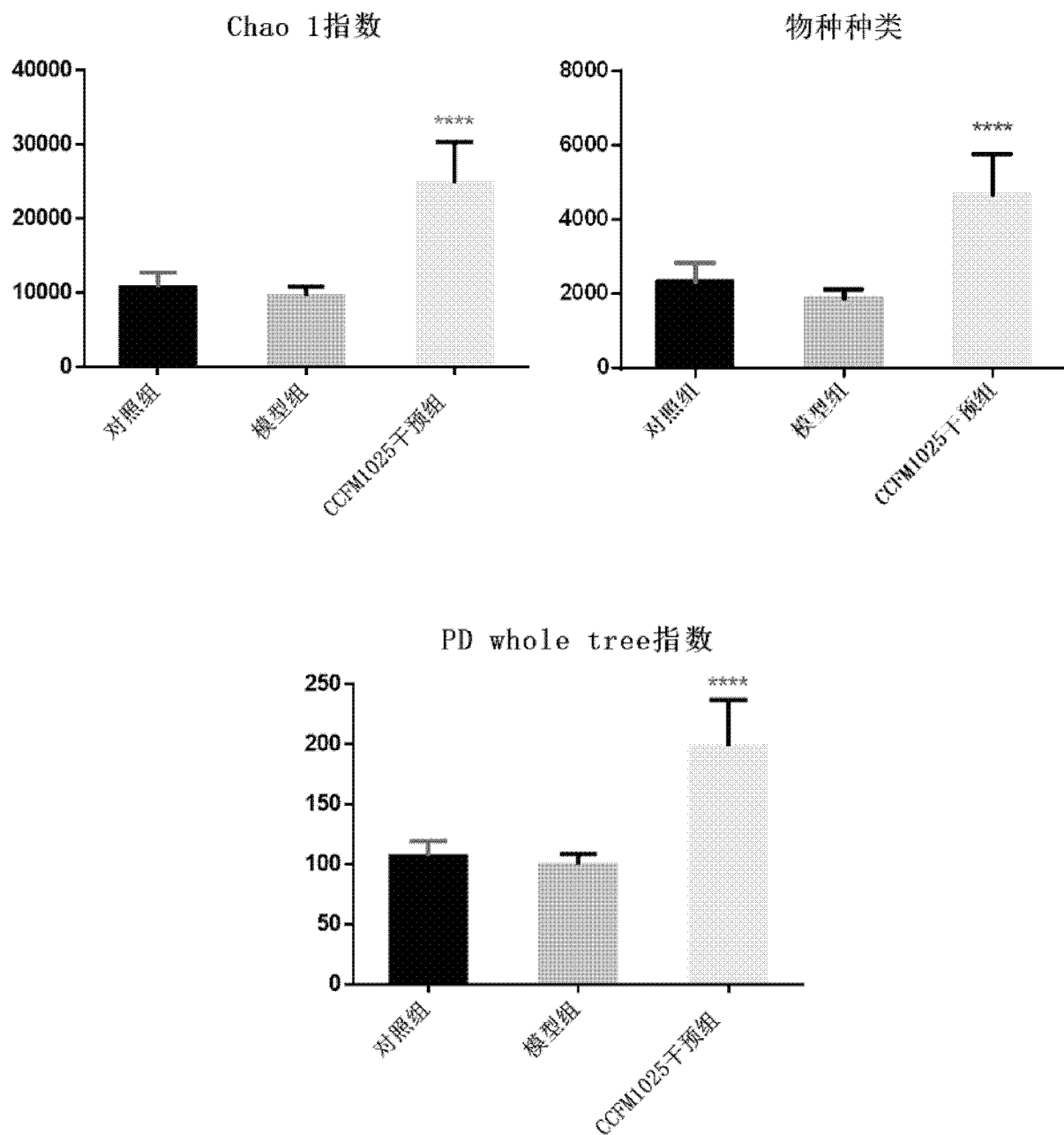


图 5

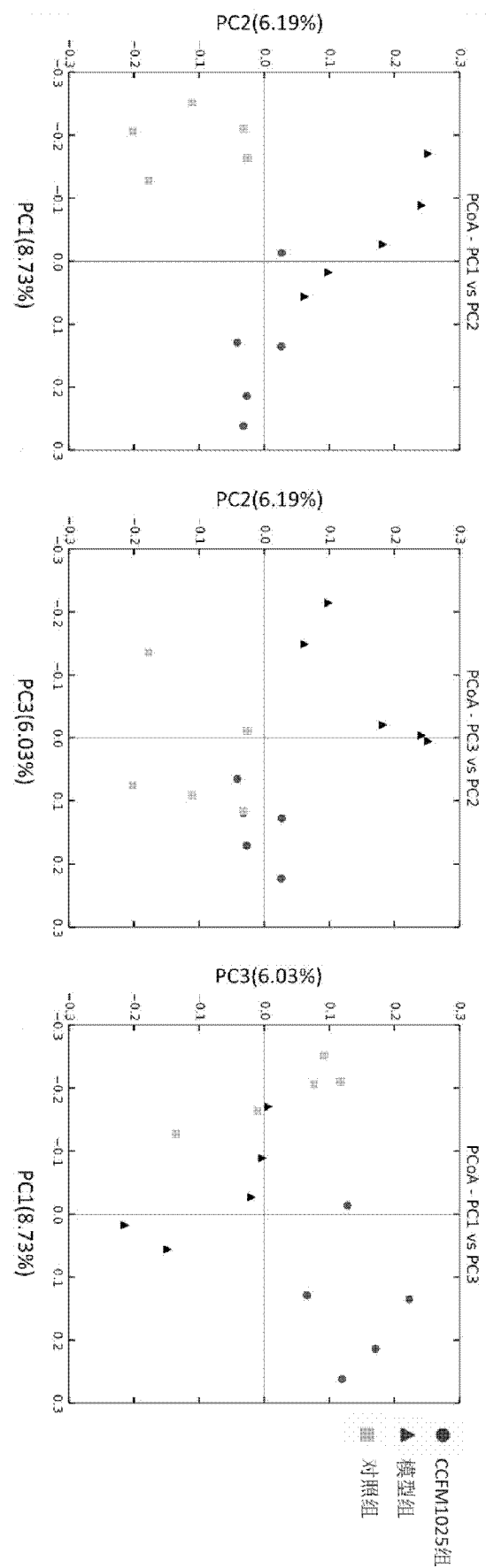


图 6

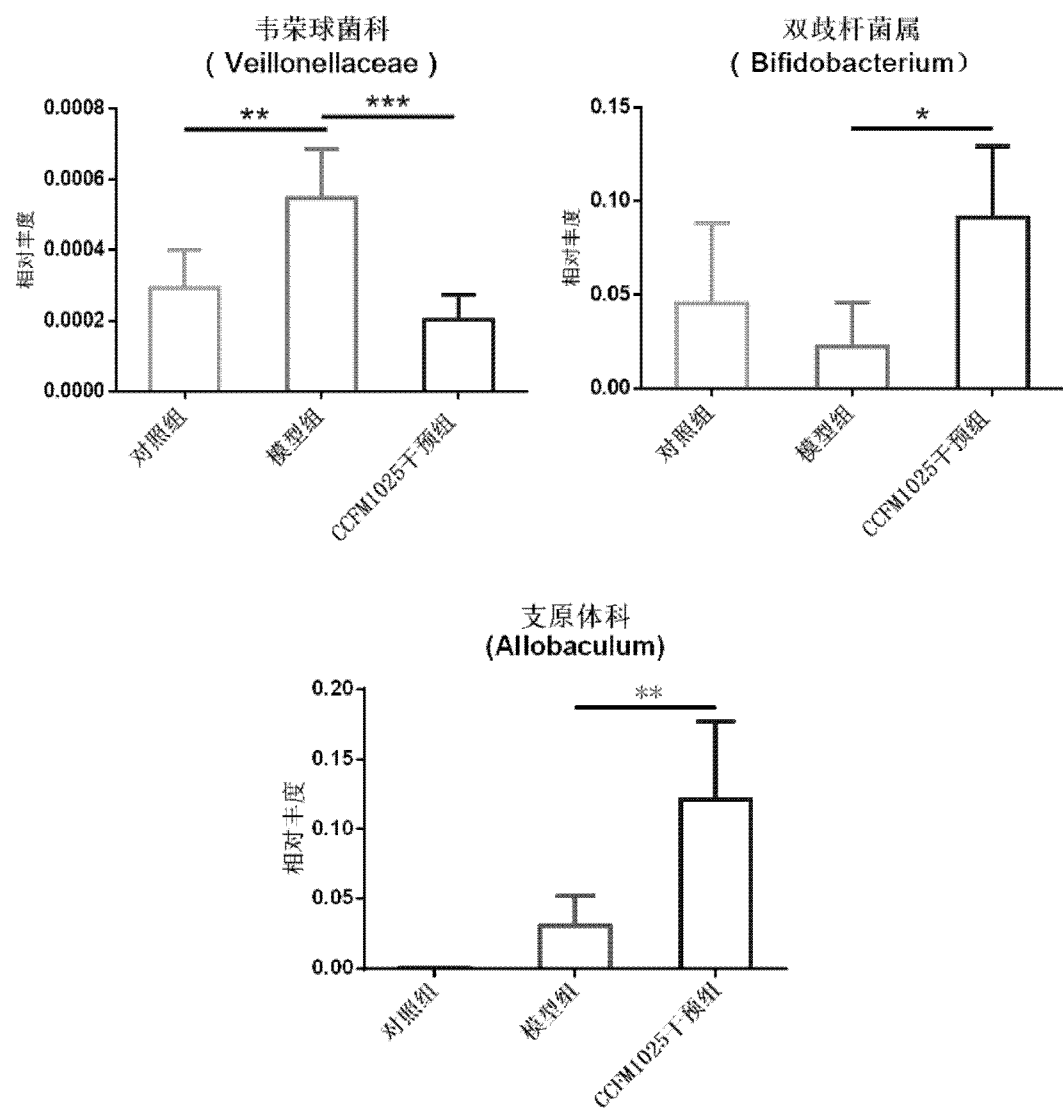


图 7

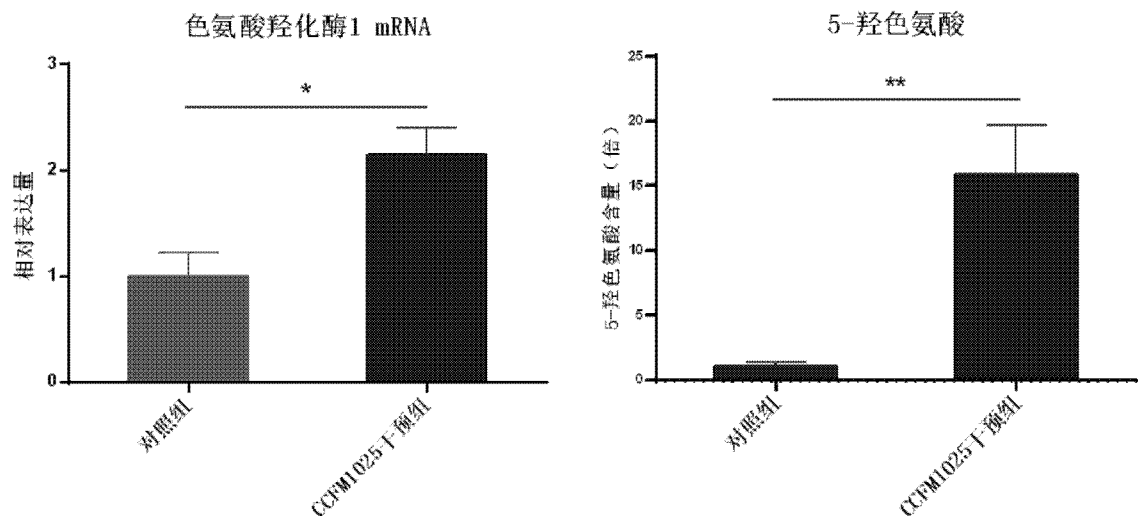


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/101685

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61K 35/745(2015.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61P 3/04(2006.01)i;
A61P 25/24(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A23L; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CPRSABS; CNTXT; CJFD; DWPI: 双歧杆菌, 抑郁, 肠病, 肥胖, bifidobacterium, depressi+, enteropathy, bowel, IBD, obesity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105985918 A (GLAC BIOTECH CO., LTD.) 05 October 2016 (2016-10-05) claims 1-10, and description, paragraph 22	1-4
Y	CN 105985918 A (GLAC BIOTECH CO., LTD.) 05 October 2016 (2016-10-05) claims 1-10, and description, paragraph 22	5-8
Y	CN 107109348 A (CHR HANSEN A/S) 29 August 2017 (2017-08-29) claims 1-15	5-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 April 2019

Date of mailing of the international search report

09 May 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

**National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China**

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/101685

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105985918	A	05 October 2016	TW	201615826	A	01 May 2016
				TW	I572713	B	01 March 2017
CN	107109348	A	29 August 2017	EP	3194567	A1	26 July 2017
				BR	112017002934	A2	30 January 2018
				US	2017252382	A1	07 September 2017
				US	10022408	B2	17 July 2018
				WO	2016030504	A1	03 March 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/101685

A. 主题的分类

C12N 1/20(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61K 35/745(2015.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61P 3/04(2006.01)i; A61P 25/24(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A23L; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS; CPRSABS; CNTXT; CJFD; DWPI: 双歧杆菌, 抑郁, 肠病, 肥胖, bifidobacterium, depressi+, enteropathy, bowel, IBD, obesity

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 105985918 A (安徽锦乔生物科技有限公司) 2016年 10月 5日 (2016 - 10 - 05) 权利要求1-10, 说明书第22段	1-4
Y	CN 105985918 A (安徽锦乔生物科技有限公司) 2016年 10月 5日 (2016 - 10 - 05) 权利要求1-10, 说明书第22段	5-8
Y	CN 107109348 A (科. 汉森有限公司) 2017年 8月 29日 (2017 - 08 - 29) 权利要求1-15	5-8

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 4月 23日

国际检索报告邮寄日期

2019年 5月 9日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

赵世华

电话号码 62411183

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/101685

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	105985918	A	2016年 10月 5日	TW	201615826	A	2016年 5月 1日
				TW	I572713	B	2017年 3月 1日
CN	107109348	A	2017年 8月 29日	EP	3194567	A1	2017年 7月 26日
				BR	112017002934	A2	2018年 1月 30日
				US	2017252382	A1	2017年 9月 7日
				US	10022408	B2	2018年 7月 17日
				WO	2016030504	A1	2016年 3月 3日