



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109247581 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 29

(21) 申请号 201710576108.9

A23L 33/135 (2016.01)

(22) 申请日 2017.07.14

A61K 31/715 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 1/00 (2006.01)

申请公布号 CN 109247581 A

审查员 王雨昕

(43) 申请公布日 2019.01.22

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院

地址 518057 广东省深圳市南山区高新园
南区粤兴一道18号香港理工大学产学研大楼205室

(72) 发明人 吴建勇 宋昂芯

(74) 专利代理机构 深圳中一专利商标事务所

44237

代理人 官建红

(51) Int. Cl.

A23L 33/125 (2016.01)

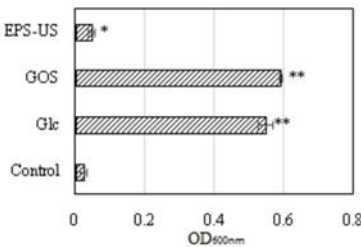
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

冬虫夏草胞外多糖在益生菌保健食品和/或
益生菌中药中的应用

(57) 摘要

本发明属于多糖技术领域,尤其涉及一种冬虫夏草胞外多糖在益生菌保健食品和/或益生菌中药中作为促益生菌生长辅料和/或保护益生菌生存活力用辅料的应用。本发明通过试验验证,冬虫夏草胞外多糖可以促进益生菌生长,而且能保护益生菌生存活力,因此,其在益生菌中药、益生菌保健食品等生产领域上具有广泛的应用,可显著提高益生菌的使用价值。



1. 一种冬虫夏草胞外多糖在益生菌保健食品和/或益生菌中药中作为促益生菌生长辅料和保护益生菌生存活力用辅料的应用,所述益生菌为双歧杆菌和乳酸杆菌。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述冬虫夏草胞外多糖的制备过程包括如下步骤:

提供冬虫夏草菌丝体和高压灭菌的菌丝体液体培养基;

将所述冬虫夏草菌丝体用所述菌丝体液体培养基进行发酵培养得发酵液;

将所述发酵液进行第一离心处理后收集上清液,将所述上清液依次进行第一醇析处理、第二离心处理得沉淀物质;

将所述沉淀物质冷冻干燥即得所述冬虫夏草胞外多糖。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述菌丝体液体培养基包括如下成分:葡萄糖30-40g/L,蛋白胨5g/L,磷酸二氢钾1g/L,七水硫酸镁0.5g/L,酵母膏10g/L。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,所述发酵培养的过程为:将所述冬虫夏草菌丝体接种于50mL的所述菌丝体液体培养基中,在温度为20-25℃、转速为100-200rpm的条件下摇床5-7d,然后加入200mL的所述菌丝体液体培养基中,在温度为20-25℃、转速为100-200rpm的条件下再摇床5-7d。

5. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述第一离心处理的条件为:离心力为4000-6000g,时间为15-20min;和/或

所述第二离心处理的条件为:离心力为10000-15000g,时间为15-20min。

6. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述第一醇析处理的过程为:将所述上清液与体积分数为90-95%的乙醇溶液按体积比1:(4-5)进行混合后,在温度为4℃的条件下静置12-24h。

7. 如权利要求2-6任一项所述的应用,其特征在于,所述冷冻干燥前还包括如下步骤:将所述沉淀物质溶于水中得浓度为8-12g/L的多糖溶液,将所述多糖溶液超声处理20-60min后,依次进行第二醇析处理、第三离心处理。

8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述超声处理条件为:在750W超声破碎仪中,振幅30-80%。

9. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述第二醇析处理的过程为:将超声处理后的所述多糖溶液与体积分数为90-95%的乙醇溶液按体积比1:5混合后,在温度为4℃的条件下静置12-24h;和/或

所述第三离心处理的条件为:离心力为10000-15000g,时间为15-20min。

冬虫夏草胞外多糖在益生菌保健食品和/或益生菌中药中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于多糖技术领域,具体涉及一种冬虫夏草胞外多糖在益生菌保健食品和/或中药中的应用。

背景技术

[0002] 冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc 为麦角菌科 (Clavicipitaceae) 虫草属 (*Cordyceps*) 的药用真菌,为中国特产的名贵中药材,传统的滋补药物。虫草中含有丰富的生理活性物质,具有独特的药用价值和广泛的药理作用,其中多糖是主要活性成分之一。

[0003] 由于天然冬虫夏草严格的寄生性和特殊的生态环境要求,其资源极其有限,价格昂贵,近年来随着冬虫夏草无性型研究的成功和人工发酵培养的不断发展,有关冬虫夏草多糖的研究逐渐增加,但没有关于冬虫夏草菌胞外多糖超声降解及其应用于促进益生菌生长的文献和专利报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的上述不足,提供一种冬虫夏草胞外多糖在益生菌保健食品和/或益生菌中药中作为促益生菌生长辅料和/或保护益生菌生存活力辅料的应用,旨在解决现有冬虫夏草胞外多糖应用有限的技术问题。

[0005] 为实现上述发明目的,本发明采用的技术方案如下:

[0006] 一种冬虫夏草胞外多糖在益生菌保健食品和/或益生菌中药中作为促益生菌生长辅料和/或保护益生菌生存活力用辅料的应用。

[0007] 本发明通过试验验证,冬虫夏草胞外多糖可以促进益生菌生长,而且能保护益生菌生存活力,因此,其在益生菌中药、益生菌保健食品等生产领域上具有广泛的应用,可显著提高益生菌的使用价值。

附图说明

[0008] 图1为本发明实施例2中不同碳源对双歧杆菌 *B. adolescentis* 生长的影响结果;

[0009] 图2为本发明实施例2中不同碳源对双歧杆菌 *B. bifidum* 生长的影响结果。

具体实施方式

[0010] 为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合附图和实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0011] 本发明实施例提供了一种冬虫夏草胞外多糖在益生菌保健食品和/或益生菌中药中作为促益生菌生长辅料和/或保护益生菌生存活力用辅料的应用。

[0012] 本发明通过试验验证,冬虫夏草胞外多糖可以促进益生菌生长,而且能保护益生

菌生存活力,因此,其在益生菌中药、益生菌保健食品等生产领域上具有广泛的应用,可显著提高益生菌的价值。

[0013] 进一步地,在上述应用中,益生菌为双歧杆菌和/或乳酸杆菌。在本发明一具体实施例中,双歧杆菌可以为*B.adolescentis*,*B.bifidum*,*B.adolescentis*,*B.bifidum*,*B.breve*,*B.infantis*和*B.longum*。

[0014] 进一步地,在上述应用中,冬虫夏草胞外多糖的制备过程包括如下步骤:

[0015] S01:提供冬虫夏草菌丝体和高压灭菌的菌丝体液体培养基;

[0016] S02:将冬虫夏草菌丝体用菌丝体液体培养基进行发酵培养得发酵液;

[0017] S03:将发酵液进行第一离心处理后收集上清液,将上清液依次进行第一醇析处理、第二离心处理得沉淀物质;

[0018] S04:将沉淀物质冷冻干燥即得冬虫夏草胞外多糖。

[0019] 进一步地,步骤S01中,菌丝体液体培养基包括如下成分:葡萄糖30-40g/L,蛋白胨5g/L,磷酸二氢钾1g/L,七水硫酸镁0.5g/L,酵母膏10g/L。其中,葡萄糖可进一步优选为40g/L。该菌丝体培养基可以更好地适用冬虫夏草菌丝体进行发酵。

[0020] 进一步地,步骤S02中,发酵培养的过程为:将冬虫夏草菌丝体接种于50mL的菌丝体液体培养基中,在温度为20-25℃、转速为100-200rpm的条件下摇床5-7d,然后加入200mL的菌丝体液体培养基中,在温度为20-25℃、转速为100-200rpm的条件下再摇床5-7d。该优选的发酵工艺过程,可以更有效地利于冬虫夏草菌丝体发酵高产冬虫夏草胞外多糖。

[0021] 进一步地,步骤S03中,第一离心处理的条件为:离心力为4000-6000g,时间为15-20min;第二离心处理的条件为:离心力为10000-15000g,时间为15-20min。两次离心处理更有利于冬虫夏草胞外多糖的分离沉淀。

[0022] 进一步地,步骤S03中,第一醇析处理的过程为:将上清液与体积分数为90-95%的乙醇溶液按体积比1:(4-5)进行混合后,在温度为4℃的条件下静置12-24h。该醇析处理过程更有利于冬虫夏草胞外多糖沉淀除杂,提高其产物纯度。

[0023] 进一步地,步骤S04中,冷冻干燥前还包括如下步骤:将沉淀物质溶于水中得浓度为8-12g/L的多糖溶液,将该多糖溶液超声处理20-60min后,依次进行第二醇析处理、第三离心处理。超声处理可以使冬虫夏草胞外多糖中的共价键断裂,从而导致冬虫夏草胞外多糖降解,其是多糖物理降解方法中的一种,降解效果显著。而试验证明,超声处理得到的降解的冬虫夏草胞外多糖,更能显著促进益生菌生长和/或更能显著保护益生菌生存活力。本发明一实施例中,超声处理时间优选30min。

[0024] 进一步地,上述超声处理条件为:在750W超声破碎仪中,振幅30-80%。该条件下,超声处理效果最佳。

[0025] 进一步地,上述第二醇析处理的过程为:将超声处理后的多糖溶液与体积分数为90-95%的乙醇溶液按体积比1:5混合后,在温度为4℃的条件下静置12-24h;第三离心处理的条件为:离心力为10000-15000g,时间为15-20min。第二醇析处理和第三离心处理后,使超声处理后的多糖溶液得到纯净的冬虫夏草胞外多糖沉淀。

[0026] 本发明先后进行过多次试验,现举一部分试验结果作为参考对发明进行进一步详细描述,下面结合具体实施例进行详细说明。

[0027] 实施例1

[0028] 6月初在虫草产地(中国川藏高原)采集新鲜野生冬虫夏草,在试验室经过充分洗涤、表面消毒和灭菌,从子实体中分离、纯化得到真菌,经形态和基因鉴定为冬虫夏草相关菌。菌种分离和菌丝体保藏采用PDA固体培养基,温度为20℃(长期保藏温度4℃)。

[0029] 从野生冬虫夏草得到的保存于固体PDA培养基的冬虫夏草菌,接种到液体培养基进行菌丝体发酵培养。该液体培养基成分:葡萄糖40g/L,蛋白胨5g/L,磷酸二氢钾1g/L,七水硫酸镁0.5g/L,酵母膏10g/L;将其分装到250mL三角瓶中,每瓶50mL,进行高压灭菌(121℃,20min),冷却至室温后,接入固体培养的冬虫夏草菌丝体,将接入了菌丝体的培养液置于摇床,在温度20℃、转速150rpm条件下进行培养,发酵培养7天。再将上述发酵冬虫夏草菌丝体接入1000mL三角瓶中(含有200mL培养基),在温度20℃、转速200rpm的摇床继续发酵培养7天。发酵结束后,将发酵液进行离心(6000g,10min),收集上清液,然后加入5倍体积乙醇(体积分数95%)进行沉淀,于4℃条件下静置过夜,然后进行离心(10000g,10min)收集沉淀部分,冷冻干燥后得到冬虫夏草胞外多糖(EPS)。称取一定量冬虫夏草胞外多糖溶解,用750W超声破碎仪处理,超声强度固定在30%振幅,超声时间为30min。经超声处理后的多糖溶液加入5倍体积乙醇溶液,于4℃条件下静置24h,然后进行离心收集沉淀部分,冷冻干燥后得到经超声处理的冬虫夏草胞外多糖(EPS-US)。

[0030] 实施例2

[0031] 将EPS-US代替葡萄糖(Glc)或半乳糖寡糖(GOS)作为碳源加到强化梭菌-RCM液体培养基中,浓度5g/L,高压灭菌(121℃,20min),然后按体积分数1%接入在RCM培养48小时的双歧杆菌*B.adolescentis*和双歧杆菌*B.bifidum*发酵液,在37℃,无氧环境,200rpm条件下培养48h,然后对发酵液进行测试分析。与无碳源的对照组(control)相比,EPS-US组的菌浓度OD值(600nm)增加结果如图1和图2所示。图1和图2中,Control组:不添加任何碳源的对照;Glc组:以葡萄糖Glc为碳源;GOS组:以半乳糖寡糖GOS为碳源;EPS-US组:以EPS-US为碳源;与对照组相比,*表示有显著性差异, $P<0.05$ 。从图1和图2可知,与无碳源的对照组(control组)相比,EPS-US组的菌浓度OD值增加,EPS-US能促进双歧杆菌*B.adolescentis*和双歧杆菌*B.bifidum*生长。

[0032] 双歧杆菌*B.adolescentis*发酵液和双歧杆菌*B.bifidum*发酵液的pH和醋酸分泌结果如表1所示。表1中,Control组:不添加任何碳源的对照组;Glc组:以葡萄糖为碳源;GOS组:以半乳糖寡糖为碳源;EPS-US组,以超声降解的冬虫夏草胞外多糖为碳源。且发酵液初始pH值为6.6-6.8;与对照组相比,*表示有显著性差异($P<0.05$),**表示有极显著性差异($P<0.01$)。从表1可知,与无碳源的对照组(control组)相比,EPS-US组的发酵液pH降低,醋酸分泌增加。

[0033] 表1

		发酵液 pH 值	醋酸含量 (mM)
[0034]	<i>B. adolescentis</i>		
	Control 组	5.71 ± 0.21	29.75 ± 2.22
	Glc 组	4.51 ± 0.09**	72.19 ± 7.06**
	GOS 组	4.40 ± 0.03**	55.75 ± 3.42**
	EPS-US 组	5.07 ± 0.06**	42.68 ± 10.82*
[0035]	<i>B. bifidum</i>		
	Control 组	5.88 ± 0.08	26.85 ± 1.82
	Glc 组	4.92 ± 0.07**	70.68 ± 1.24**
	GOS 组	4.73 ± 0.26**	68.86 ± 3.32**
	EPS-US 组	5.72 ± 0.06*	39.97 ± 2.68**

[0036] 实施例3

[0037] 将EPS-US代替葡萄糖作为碳源加到强化梭菌-RCM液体培养基中,浓度5g/L,高压灭菌(121℃,20min),然后按体积分数1%接入在RCM培养48小时的双歧杆菌*B. adolescentis*,*B. bifidum*,*B. adolescentis*,*B. bifidum*,*B. breve*,*B. infantis*和*B. longum*发酵液,在37℃,无氧环境,200rpm条件下培养20小时、48小时或6天,然后将发酵液取出并稀释成不同浓度(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ... 10^{-10}),接种在RCM固体培养基上,培养2天,结果如表2所示。表2为冬虫夏草胞外多糖与其它碳源对双歧杆菌固体培养菌落形成单位(CFU)的影响($\times 10^8$ /mL, n=3),其中,Control组:不添加任何碳源的对照组;Glc组:以葡萄糖为碳源;GOS组:以半乳糖寡糖为碳源;EPS-US组:以超声降解的冬虫夏草胞外多糖为碳源。

[0038] 由表2可知,试验中的5只双歧杆菌在所有三个时间培养期间,EPS-US组的菌落形成单位CFU值均明显高于高于无碳源的Control组和Glc组和GOS组。更为重要的是,对照组和用其它碳源组的双歧杆菌在培养48h后再转移至固体培养基中,基本上不再生长(CFU值趋于0);而以EPS-US作为碳源的双歧杆菌,即使在液体发酵时间6天后,除了*B. breve*菌,其他四株菌仍然有菌落形成CFU>0。这一实验表明EPS-US能促进益生菌生长和保护益生菌的生存活力。

[0039] 表2

	发酵时间	Control 组	Glc 组	GOS 组	EPS-US 组
[0040]	<i>B. adolescentis</i>				
	20 h	10.0 ± 3.82	2.34 ± 0.81	2.65 ± 0.71	$> 3 \times 10^5$
	48 h	0.77 ± 0.315	0.50 ± 0.39	0.78 ± 0.13	$> 3 \times 10^5$
	6 d	0.012 ± 0.003	$< 2 \times 10^{-5}$	$< 2 \times 10^{-5}$	328.33 ± 75.08
	<i>B. bifidum</i>				
	20 h	1.80 ± 1.13	6.55 ± 1.77	9.07 ± 3.72	26.20 ± 6.19
	48 h	0.22 ± 0.09	0.24 ± 0.04	0.25 ± 0.10	10.9 ± 5.72

	6 d	$(3.85 \pm 0.35) \times 10^{-4}$	$< 2 \times 10^{-5}$	$< 2 \times 10^{-5}$	0.24 ± 0.05
	<i>B. breve</i>				
	20 h	$(1.70 \pm 0.11) \times 10^4$	$(2.82 \pm 0.88) \times 10^4$	$> 3 \times 10^5$	$(1.12 \pm 0.47) \times 10^5$
	48 h	$(2.50 \pm 0.46) \times 10^3$	$(2.69 \pm 0.43) \times 10^3$	$(2.12 \pm 0.54) \times 10^3$	$> 3 \times 10^5$
	6 d	$(7.85 \pm 1.34) \times 10^{-3}$	$< 2 \times 10^{-5}$	$(6.25 \pm 0.50) \times 10^{-4}$	$(5.77 \pm 1.72) \times 10^{-3}$
[0041]	<i>B. infantis</i>				
	20 h	20.1 ± 11.4	$(1.62 \pm 0.13) \times 10^3$	21.5 ± 0.21	$> 3 \times 10^5$
	48 h	0.70 ± 0.34	1.8 ± 0.45	1.53 ± 0.35	$> 3 \times 10^5$
	6 d	$< 2 \times 10^{-5}$	$< 2 \times 10^{-5}$	$(6.90 \pm 0.85) \times 10^{-3}$	8.10 ± 1.27
	<i>B. longum</i>				
	20 h	0.69 ± 0.18	1.23 ± 0.57	12.5 ± 0.71	15.9 ± 0.14
	48 h	0.17 ± 0.14	0.55 ± 0.07	0.71 ± 0.33	$(1.72 \pm 0.38) \times 10^4$
	6 d	$(1.93 \pm 0.08) \times 10^{-3}$	$< 2 \times 10^{-5}$	$(3.65 \pm 2.05) \times 10^{-4}$	0.83 ± 0.69

[0042] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

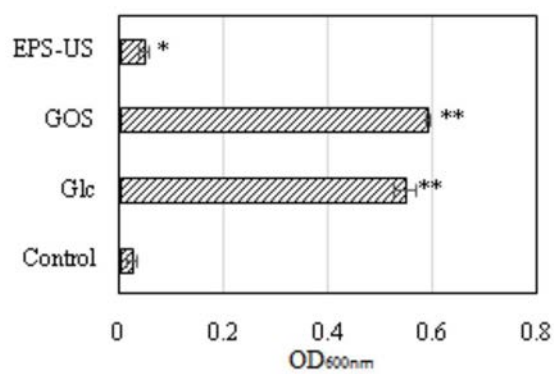


图1

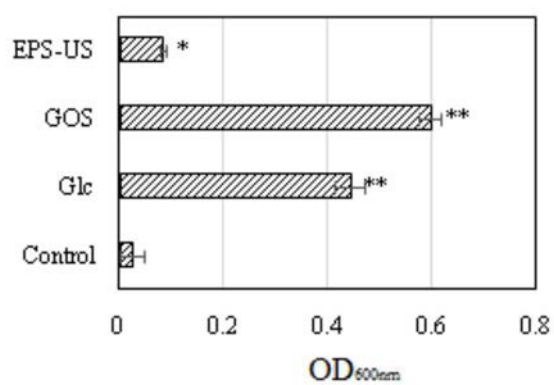


图2