

婴儿双歧杆菌 YLGB-1496 在抗衰老、提高先天免疫方面的新应用

技术领域

本发明涉及微生物技术领域，尤其是涉及一种长双歧杆菌婴儿亚种（即婴儿双歧杆菌）(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)菌株 YLGB-1496（保藏编号 CGMCC No.21109）在缓解由于金黄色葡萄球菌感染导致的死亡，延长寿命，提高先天免疫，延缓衰老的新用途。

背景技术

在体内各种各样的生理过程中，免疫系统是最容易受到攻击的。免疫系统与体内大多数器官和细胞保持持续接触，它的改变势必影响这些器官的组织细胞。随着年龄的增长，免疫系统的功能逐步减退，先天性免疫应答和获得性免疫应答都会随之下降，由此诱发出一些严重影响组织器官的疾病，加剧了机体各系统的衰老。免疫衰老 (*immunosenescence*) 就是指由于免疫功能调节失常而导致的易患慢性和急性疾病的现象。免疫功能的衰退是造成机体衰老的重要因素之一，因此机体免疫功能的加强能减少病理性衰老的发生。

益生菌是一类通过改变宿主某一部位菌群的组成，从而产生有利于宿主健康作用的单一或组成明确的混合微生物。益生作用则是指某种微生物制剂或发酵制品通过调节宿主黏膜与系统免疫功能以及改善肠道营养与菌群平衡对宿主所产生的有益的生理作用。随着衰老老人群的增加，能提供益生作用，控制老化和延长寿命的功能性食品越来越受到青睐。HIROMI KIMOTO -NIRA 等采用快速老化小鼠模型 (SAM) 中的 SAMP6，实验发现 SAMP6 小鼠服用热灭活的 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H61 后小鼠脾细胞产生更多的 IL -12 和 IFN - γ ，该研究认为 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H61 之所以能够抑制某些老化现象可能与其免疫调节作用相关。

秀丽隐杆线虫(*C.elegans*)是一种常见的、自由生活的小型土壤线虫，属于小杆亚纲 (*Rhabditia*)、小杆目 (*Rhabditidia*)、小杆总科(*Rhabditoidea*)。以细菌为食，其生命周期大约为 3d，平均寿命为 3 周。其呈蠕虫状、成体长约 1.0~1.5 mm，身体直径约 70.0 μ m。秀丽隐杆线虫为两侧对称，体表有一层角质层覆盖物，无分节，有 4 条主要的表皮索状组织及 1 个充满体液的假体腔。秀丽隐杆线虫的结构简单、身体透明、

易于观察、繁殖周期短等生物学特征赋予了其成为模式生物的前提。通过研究线虫的衰老和寿命控制机制，并将其成果应用于其他生物体，对延长人的寿命及提高人的生活质量有很大意义。本实验借助模式动物秀丽线虫，通过对其寿命进行观察，探究益生菌在其体内的抗衰老作用，为抗衰老、提高先天免疫的益生菌产品开发利用提供理论参考。

发明内容

本发明的一个目的在于提供长双歧杆菌婴儿亚种 YLGB-1496 的新用途。

长双歧杆菌婴儿亚种 YLGB-1496 的保藏编号为 CGMCC No.21109。保藏编号为 CGMCC No.21109 的长双歧杆菌婴儿亚种菌株已于 2020 年 12 月 05 日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），保藏单位地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国科学院微生物研究所，保藏日期：2020 年 12 月 05 日；保藏编号：CGMCC No. 21109；分类命名：长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)。本发明中将该菌株也称为 YLGB-1496 或 GB-1496。

本发明发现长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) YLGB-1496 菌株具有缓解由于金黄色葡萄球菌感染导致的死亡、延长寿命、提高先天免疫的功效。

从而，本发明提供了长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) 在制备用于个体抗衰老、提高个体先天免疫、缓解个体由于金黄色葡萄球菌感染导致的症状和/或抑制金黄色葡萄球菌感染个体的组合物中的应用，其中所述菌株为保藏编号 CGMCC No. 21109 的长双歧杆菌婴儿亚种。

根据本发明的具体实施方案，本发明金黄色葡萄球菌感染导致的症状包括衰老（例如免疫衰老(immunosenescence)）甚至死亡。

另一方面，本发明还提供了一种用于个体抗衰老、提高个体先天免疫、缓解个体由于金黄色葡萄球菌感染导致的症状和/或抑制金黄色葡萄球菌感染个体的组合物，其包括有效量的保藏编号为 CGMCC No.21109 的长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)。

根据本发明的具体实施方案，所述婴儿双歧杆菌以固态或液态菌制剂的形式用于制备所述组合物。

根据本发明的具体实施方案，所述组合物可以包括食品组合物、饲料组合物或药品组合物。

根据本发明的具体实施方案，所述组合物可使用于动物或是人类。所述组合物还可包括所属领域中的常规用料组分。例如，对于药物组合物，可包括适量的辅料，所述辅料可以为赋型剂、稀释剂、填充剂和/或吸收促进剂等。对于食品组合物，本发明的婴儿双歧杆菌可以按照现有技术中含婴儿双歧杆菌的食品进行生产。所述组合物可根据受施予者的需要，而采用不同形态。例如粉剂、锭剂、造粒、微胶囊和/或液体制剂等。

根据本发明的具体实施方案，所述组合物是用于缓解由于金黄色葡萄球菌感染导致的死亡；具体应用时，所述婴儿双歧杆菌的应用量为 $1.0 \times 10^3 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{12} \text{CFU/天}$ ，优选为 $1.0 \times 10^7 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{10} \text{CFU/天}$ 。

根据本发明的具体实施方案，所述组合物是用于延长寿命；具体应用时，所述婴儿双歧杆菌的应用量为 $1.0 \times 10^3 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{12} \text{CFU/天}$ ，优选为 $1.0 \times 10^7 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{10} \text{CFU/天}$ 。

根据本发明的具体实施方案，所述组合物是用于提高先天免疫；具体应用时，所述婴儿双歧杆菌的应用量为 $1.0 \times 10^3 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{12} \text{CFU/天}$ ，优选为 $1.0 \times 10^7 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{10} \text{CFU/天}$ 。

在本发明的一具体实施方案中，所述组合物为食品组合物，所述食品为发酵乳制品（例如发酵乳、风味发酵乳、发酵乳饮料等）、乳酪、含乳饮料、固体饮料或乳粉（例如婴幼儿配方粉或非婴幼儿配方粉）。

另一方面，本发明还提供了一种抗衰老、提高个体先天免疫、缓解个体由于金黄色葡萄球菌感染导致的症状和/或抑制金黄色葡萄球菌感染个体的方法，该方法包括给予有需要的个体有效量的保藏编号为 CGMCC No.21109 的长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*)。

在本发明的一些具体实施方案中，所述抗衰老为抗免疫衰老。

根据本发明的具体实施方案，所述长双歧杆菌婴儿亚种给予个体的量为 $1.0 \times 10^3 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{12} \text{CFU/天}$ ，优选为 $1.0 \times 10^7 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{10} \text{CFU/天}$ 。

综上所述，本发明提供了婴儿双歧杆菌 YLGB-1496 的新用途，该菌具有显著缓解由于金黄色葡萄球菌感染导致的死亡，延长寿命，提高先天免疫，可以用于制备具

有抗衰老、提高先天免疫功效的食品、药物及饲料等，具有广泛的应用前景。

附图说明

- 图 1 显示 *S. aureus* 对秀丽隐杆线虫的致病性和添加益生菌菌株的影响。
- 5 图 2 显示 *S. aureus* 和益生菌干预 5 天后秀丽隐杆线虫的存活率。

用于专利程序的微生物保藏：

- 婴儿双歧杆菌 YLGB-1496（或 GB-1496）菌株：
- 保藏日期：2020 年 12 月 05 日；
- 保藏单位：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC）；
- 10 保藏单位地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国科学院微生物研究所；
- 保藏编号：CGMCC No.21109；
- 分类命名：长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)。

具体实施方式

- 15 为了对本发明的技术特征、目的和有益效果有更加清楚的理解，现结合具体实施例及对本发明的技术方案进行以下详细说明，应理解这些实例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。实施例中，各原始试剂材料均可商购获得，未注明具体条件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件，或按照仪器制造商所建议的条件。

- 20 实施例 1：益生菌对秀丽隐线虫抗衰老作用测试

1.1 材料与仪器

- 婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) YLGB-1496 来自内蒙古伊利实业集团股份有限公司（来源为中国健康妈妈母乳，已于 2020 年 12 月 05 日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），保藏单位地址：
- 25 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国科学院微生物研究所，保藏日期：2020 年 12 月 05 日；保藏编号：CGMCC No.21109；分类命名：长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)）。

乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*) 商业菌株 X。

野生型秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) 商购获得。

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC25923) 商购获得。

实验所用其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。SPX-150B-Z 型生化培养箱：上海博讯实业有限公司医疗设备厂；奥林巴斯显微镜 (OlympusBX41)：南京艾朗仪器有限公司；LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌锅：上海申安医疗器械厂；T6 紫外/可见分光光度计：北京普析通用仪器有限公司；Multiskan FC 型酶标仪：赛默飞世尔 (上海) 仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 秀丽线虫培养方法

使用 NGM 培养基。配制方法：每 1000 mL 培养基含有琼脂 17 g，多聚蛋白胨 2.5 g，NaCl 3 g，121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，加入灭菌后的 1 mL 1 mol/L CaCl₂，1 mL 1 mol/L MgSO₄，25 mL 1 mol/L K₃PO₄ 缓冲液，待冷却至 50℃ 左右时，加入 1 mL 5 mg/mL 胆固醇，摇匀后倒入无菌培养皿内，取 OP50 置于培养皿内于 37℃ 培养过夜，备用。

1.2.2 益生菌活化

取乳酸杆菌于 MRS 培养基中，双歧杆菌于 MRS+Cys (1%) 培养基中，37℃ 培养活化，细胞收集并使用生理盐水洗脱，调整至 1×10⁷、1×10⁸ CFU (每个培养皿平板中益生菌的量) 于 NGM 培养基中备用。

1.2.3 秀丽线虫寿命测定

随机挑取暴露后的秀丽线虫至分别涂乳双歧杆菌 (商业菌株 X)、副干酪乳杆菌 K56、婴儿双歧杆菌 YLGB-1496 的 NGM 培养基中。以大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基、未添加其他成分 (只有 *S. aureus*) 的培养基作为对照组别。每组设 3 个平行，20℃ 培养。从转移当天 (存活实验第 0 天) 起计算秀丽线虫存活天数，以铂金丝碰触秀丽线虫仍然不动即判定为死亡，每天记录秀丽线虫存活和死亡条数，实验持续至第五天为止，记录死亡情况。

1.2.4 实验结果

寿命是秀丽线虫暴露前后变化最直接的反映，实验结果如图 1 所示，秀丽线虫经 *S. aureus* 感染后，在第 3 天开始，存活率显著下降，第 5 天秀丽线虫存活率剩下 1.75%。与之相比，10⁷ CFU 婴儿双歧杆菌 YLGB-1496 处理过的秀丽线虫组，在第 5 天，存活率为 20%；10⁸ CFU 婴儿双歧杆菌 YLGB-1496 处理过的秀丽线虫组，在第

5 天，存活率上升至 29 %，与 2'-FL 处理过的秀丽线虫组存活率相同，且与未处理的对照组具有显著性差异（存活率为 1.75 %， $p<0.001$ ）。另外， 10^8 CFU 婴儿双歧杆菌 YLGB-1496 与母乳低聚糖 2'-FL（15 mg/mL）处理过的秀丽线虫组，存活率大幅提升至 51.5%；副干酪乳杆菌 K56 处理的秀丽线虫组，在第 5 天，存活率为 30%，均与对照组的 1.75%有显著性差异（ $p<0.001$ ）。由图 2 可知，婴儿双歧杆菌、婴儿双歧杆菌复配母乳低聚糖 2'-FL、副干酪乳杆菌 K56、乳双歧杆菌商业菌株 X，能够显著延长秀丽线虫寿命（ $p<0.001$ ），其中副干酪乳杆菌 K56 与婴儿双歧杆菌 YLGB-1496 处理能够提升线虫存活率至 30%左右，婴儿双歧杆菌 YLGB-1496 复配母乳低聚糖 2'-FL 提升至 51.5%，最能够显著延长秀丽线虫寿命（ $p<0.001$ ）。

10 以上结果表明长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) 菌株 YLGB-1496（保藏编号 CGMCC No.21109）在抗衰老、提高先天免疫方面具有良好潜力，可以用于食品，如发酵乳、乳酪、含乳饮料、乳粉或其它含有该菌株及其衍生物的任何一种食品。

15 实施例 2：添加的母乳低聚糖组合与长双歧杆菌婴儿亚种 YLGB-1496 组合物的配方粉

本实施例提供一种婴儿配方奶粉，该配方奶粉中总蛋白质含量为 11.1g/100g 粉，脂肪含量为 28.3g/100g 粉，碳水化合物含量为 52.9g/100g 粉，长双歧杆菌婴儿亚种 YLGB-1496 为 1×10^8 CFU/100g 粉。

权利要求书

1. 一种长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)菌株在制备用于个体抗衰老、提高个体先天免疫、缓解个体由于金黄色葡萄球菌感染导致的症状和/或抑制金黄色葡萄球菌感染个体的组合物中的应用，其中所述婴儿双歧为保藏编号 CGMCC No.21109 的婴儿双歧杆菌。
5
2. 根据权利要求 1 所述的应用，其中，所述长双歧杆菌婴儿亚种菌株以固态或液态菌制剂的形式用于制备所述组合物。
3. 根据权利要求 1 所述的应用，其中，所述组合物包括食品组合物、饲料组合物或药品组合物。
- 10 4. 根据权利要求 3 所述的应用，其中，所述药品组合物还包括可用于药品的辅料，所述辅料为赋型剂、稀释剂、填充剂和/或吸收促进剂。
5. 根据权利要求 3 所述的应用，其中，所述药品组合物为粉剂、锭剂、造粒、微胶囊、液体制剂和/或其他剂型。
6. 根据权利要求 1 所述的应用，其中，所述组合物是用于缓解由于金黄色葡萄球菌感染导致的死亡；
15
- 优选地，其中，所述长双歧杆菌婴儿亚种菌株的应用量为 $1.0 \times 10^3 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{12} \text{CFU/天}$ ，更优选为 $1.0 \times 10^7 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{10} \text{CFU/天}$ 。
7. 根据权利要求 1 所述的应用，其中，所述组合物是用于延长寿命；
优选地，其中，所述长双歧杆菌婴儿亚种菌株的应用量为
20 $1.0 \times 10^3 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{12} \text{CFU/天}$ ，更优选为 $1.0 \times 10^7 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{10} \text{CFU/天}$ 。
8. 根据权利要求 1 所述的应用，其中，所述组合物是用于提高先天免疫；
优选地，其中，所述长双歧杆菌婴儿亚种菌株的应用量为
 $1.0 \times 10^3 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{12} \text{CFU/天}$ ，更优选为 $1.0 \times 10^7 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{10} \text{CFU/天}$ 。
9. 根据权利要求 6-8 中任一项所述的应用，其中，所述组合物为食品组合物。
- 25 10. 根据权利要求 9 所述的应用，其中，所述食品为发酵乳制品、乳酪、含乳饮料、固体饮料或乳粉。
11. 一种用于个体抗衰老、提高个体先天免疫、缓解个体由于金黄色葡萄球菌感染导致的症状和/或抑制金黄色葡萄球菌感染个体的组合物，其包括有效量的保藏编号为 CGMCC No.21109 的长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum* subsp.

infantis)。

12. 根据权利要求 11 所述的组合物，其中，所述组合物包括食品组合物、饲料组合物或药品组合物。

13. 一种抗衰老、提高个体先天免疫、缓解个体由于金黄色葡萄球菌感染导致的
5 症状和/或抑制金黄色葡萄球菌感染个体的方法，该方法包括给予有需要的个体有效量的保藏编号为 CGMCC No.21109 的长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中，所述抗衰老为抗免疫衰老。

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的方法，其中，所述长双歧杆菌婴儿亚种给予个
10 体的量为 $1.0 \times 10^3 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{12} \text{CFU/天}$ ，优选为 $1.0 \times 10^7 \text{CFU} \sim 1.0 \times 10^{10} \text{CFU/天}$ 。