



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 122629153 A

(43) 申请公布日 2026. 08. 25

(21) 申请号 202610325945.3

A23L 33/21 (2016.01)

(22) 申请日 2026.03.17

A23L 29/00 (2016.01)

(71) 申请人 无锡学院

地址 214105 江苏省无锡市锡山大道333号

(72) 发明人 胡晓会 蔡义进 王涛 徐恬

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权
代理有限公司 23211

专利代理师 梅静霞

(51) Int. Cl.

C12P 19/04 (2006.01)

A61K 31/718 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

C12P 19/18 (2006.01)

A23K 20/163 (2016.01)

A23K 10/14 (2016.01)

权利要求书1页 说明书6页

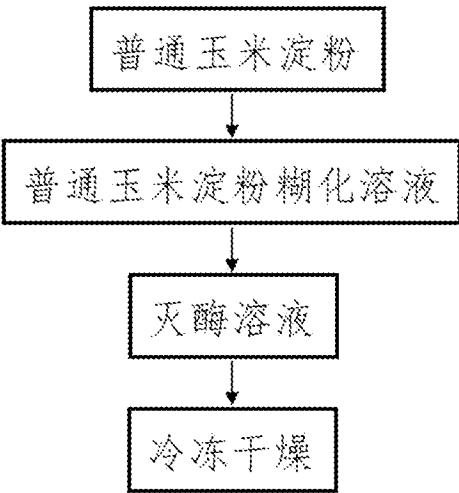
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种提高Akkermansia muciniphila菌丰度的
淀粉基饲料

(57) 摘要

本发明公开了一种提高Akkermansia muciniphila菌丰度的淀粉基饲料,属于功能食品技术领域。实验结果表明,淀粉基饲料能显著逆转小鼠的菌群紊乱;PCoA分析表明,其可使紊乱的菌群整体结构向健康状态恢复;具体表现为改善紊乱的厚壁菌门/拟杆菌门比例,促进有益菌Akkermansia muciniphila的增殖,并抑制条件致病菌生长,且此调节作用呈现剂量依赖性。因此,改性淀粉基饲料是一种具有潜力的调节肠道菌群的功能性食品原料。



1. 一种制备改性玉米淀粉的方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - (1) 将玉米淀粉制备成质量浓度5-10%的溶液,于100℃、350-400rpm条件下搅拌15-20min,得到糊化淀粉;
 - (2) 向步骤(1)所述糊化淀粉中添加100-300U/g 6- α -葡萄糖基转移酶,酶解至少10h后灭酶;
 - (3) 将步骤(2)灭酶后的酶解液进行冷冻干燥,得到改性淀粉。
2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,步骤(2)所述酶解的温度为35-40℃。
3. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,步骤(2)所述6- α -葡萄糖基转移酶的添加量为100-150U/g。
4. 由权利要求1~3任一所述方法制备得到的改性淀粉。
5. 含权利要求4所述改性淀粉的产品。
6. 根据权利要求5所述产品,其特征在于,所述产品包括食品、药品、饲料或保健品。
7. 权利要求4所述改性淀粉在制备调节或辅助改善肠道菌群的饲料中的应用,其特征在于,所述调节或辅助改善肠道菌群是靶向提高*Akkermansia muciniphila*的丰度。
8. 根据权利要求7所述应用,其特征在于,所述饲料的制剂形态为颗粒料、膨化料、粉料、碎粒料、液态料或预混料中的任意一种。
9. 根据权利要求7所述应用,其特征在于,所述饲料中还含有辅料;所述辅料包括蛋白质饲料、矿物质与维生素、氨基酸;优选的,所述辅料包括豆粕、磷酸氢钙、食盐、氨基酸。
10. 权利要求4所述改性淀粉在制备调节肠道菌群的保健品中的应用,其特征在于,所述调节肠道菌群是靶向提高*Akkermansia muciniphila*的丰度。

一种提高 *Akkermansia muciniphila* 菌丰度的淀粉基饲料

技术领域

[0001] 本发明涉及一种提高 *Akkermansia muciniphila* 菌丰度的淀粉基饲料,属于功能食品技术领域。

背景技术

[0002] 肠道菌群是维持宿主健康的关键因素,其平衡与消化、免疫和代谢功能密切相关。在畜牧养殖中,肠道菌群失调可能导致动物生长性能下降、疾病易感性增加及生产成本上升。近年来,研究显示特定有益菌群的富集能有效改善肠道屏障功能、抑制炎症并促进营养吸收。其中, *Akkermansia muciniphila* 作为一种革兰氏阴性厌氧菌,已被证实是肠道微生物中的关键有益菌。它定植于肠道黏液层,通过降解黏蛋白维持黏膜完整性,并产生短链脂肪酸等代谢物,具有抗炎、抗氧化和增强免疫调节的作用。但是,尚未有饲料能够靶向提高肠道内 *Akkermansia muciniphila* 的丰度。

发明内容

[0003] 本发明旨在解决现有技术中普通饲料对肠道菌群定向调控能力不足的问题,提供一种能优化肠道微生物组成、促进有益菌增殖并改善肠道健康的改性淀粉源组合饲料。

[0004] 本发明通过精确设计改性淀粉的比例,实现对肠道菌群,尤其是后肠微生物区系的精准营养干预。通过临床评价分析主要肠道菌群的变化。本发明通过采用酶法改性普通玉米淀粉制成淀粉饲料对小鼠进行喂食,通过临床评价,分析改性淀粉饲料可以提高 *Akkermansia muciniphila* 菌的丰度,提高有益菌含量,进而发挥作用。

[0005] 本发明的第一个目的是提供一种改性淀粉的制备方法,包括如下步骤:

(1) 在去离子水中加入普通玉米淀粉,混合均匀,加热糊化,得到普通玉米淀粉预处理溶液;

(2) 在普通玉米淀粉预处理溶液中加入6- α -葡萄糖基转移酶进行改性;

(3) 将步骤(2)酶解后的溶液煮沸灭酶;

(4) 将步骤(3)得到的灭酶后的溶液冷冻干燥。

[0006] 在本发明的一种实施方式中,步骤(1)中普通玉米淀粉预处理溶液中的普通玉米淀粉底物浓度为5-10 % (w/w)。

[0007] 在本发明的一种实施方式中,所述普通玉米淀粉预处理温度为100 °C, 350-400 rpm搅拌15-20 min。

[0008] 在本发明的一种实施方式中,步骤(2)所述的6- α -葡萄糖基转移酶为所述6- α -葡萄糖基转移酶为来源于 *Sporosacina globispora* C11的6- α -GT。该酶作用于普通玉米淀粉的终产物为改性淀粉。

[0009] 在本发明的一种实施方式中,编码所述6- α -葡萄糖基转移酶的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0010] 在本发明的一种实施方式中,步骤(3)所述灭酶为,煮沸灭酶20 min。

- [0011] 本发明的第二个目的是提供上述方法制备得到的改性淀粉。
- [0012] 本发明的第三个目的是提供含所述改性淀粉的产品。
- [0013] 在本发明的一种实施方式中,所述产品包括食品、药品、饲料或保健品。
- [0014] 本发明的第四个目的是提供一种可以提高*Akkermansia muciniphila*菌丰度的淀粉饲料。
- [0015] 在本发明的一种实施方式中,改性淀粉的使用剂量为100–400 mg/kg。
- [0016] 在本发明的一种实施方式中,所述饲料的制剂形态为颗粒料、膨化料、粉料、碎粒料、液态料或预混料中的任意一种。
- [0017] 在本发明的一种实施方式中,所述饲料中还含有辅料。
- [0018] 在本发明的一种实施方式中,所述辅料包括蛋白质饲料、矿物质与维生素、氨基酸。
- [0019] 在本发明的一种实施方式中,优选的,所述辅料包括豆粕、磷酸氢钙、食盐、氨基酸。
- [0020] 本发明的第五个目的是提供所述改性淀粉在制备调节肠道菌群的保健品中的应用,所述调节肠道菌群是靶向提高*Akkermansia muciniphila*的丰度。
- [0021] 有益效果:
本发明制备了一种改性淀粉,所述改性淀粉的分支度提高,物理性能良好;所述改性淀粉可显著改善肠道菌群,提高*Akkermansia muciniphila*菌的丰度,因此改性淀粉基饲料可以作为良好调节肠道菌群的功能性食品、药品或保健品。

附图说明

- 图1为改性淀粉制备的工艺流程图。
- [0022] 图2为实施例2所得产物的RVA结果图。
- [0023] 图3为实施例2所得产物HPAEC–PAD结果图。
- [0024] 图4为实施例3所得产物的HPAEC–PAD结果图。
- [0025] 图5为实施例4中肠道菌群变化图。
- [0026] 图6为实施例4中各组小鼠结肠组织H&E染色图。

具体实施方式

- [0027] 以下对本发明的优选实施例进行说明,应当理解实施例是为了更好地解释本发明,不用于限制本发明。
- [0028] 下述实施例中所涉及的培养基如下:
LB液体培养基:酵母粉 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,NaCl 10 g/L,pH 7.0。
- [0029] LB固体培养基:酵母粉 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,NaCl 10 g/L,pH 7.0,1.5% (w/v) 琼脂。
- [0030] 短支链淀粉的检测
将普通玉米淀粉经过Sp-6GT酶改性后的样品煮沸灭酶20 min,离心、脱支、稀释、过0.22 μm水相滤膜后,利用高效阴离子交换色谱系统 (HPAEC–PAD) 和快速粘度分析仪分析产物。HPAEC–PAD的条件为:Dionex CarboPac PA–200阴离子交换柱,柱温35°C,流动相为

100 mM NaOH、100 mM NaOH&500 mM NaAc,流速为0.5 mL/min。

[0031] 实施例1:重组6- α -糖基转移酶的表达

具体步骤如下:

(1) 菌株构建:

根据人工合成的6- α -葡萄糖基转移酶Sp-6GT的基因设计引物,上游引物:5'-CCATGGCCTATGTGAGCAG-3';下游引物:5'-GCGTGACCAAACAGCTCGA-3',PCR克隆出含编码信号肽序列的目的基因SEQ ID No.1(其中第1-66位编码信号肽)。根据pET-20b(+)载体序列设计引物,上游引物:5'-TGCCAGCCGGCGATGGCCATGGCCTATGTGA-3';下游引物:5'-CTCGAGCACACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGC-3',克隆出含连接位点的pET20b(+)载体。

[0032] PCR体系为:2×phanta Max Master Mix(Dye plus) 25 μ L,正向引物(20 μ M) 2 μ L,反向引物(20 μ M) 2 μ L,模板DNA 1 μ L,加入双蒸水至50 μ L。PCR扩增条件为:95℃预变性3 min;再进行30个循环(95℃ 15 s,60℃ 15 s,72℃ 3.5 min);最后72℃保温5 min。pET20b(+)载体的PCR体系为2×phanta Max Master Mix(Dye plus) 25 μ L,正向引物(20 μ M) 2 μ L,反向引物(20 μ M) 2 μ L,模板DNA 1 μ L,加入双蒸水至50 μ L。PCR扩增条件为:95℃预变性3 min;再进行30个循环(95℃ 15 s,60℃ 15 s,72℃ 4 min);最后72℃保温5 min。

[0033] 将6- α -葡萄糖基转移酶基因和pET20b(+)载体的PCR产物进行核酸电泳后切胶回收,使用同源重组方法将6- α -葡萄糖基转移酶基因和pET20b(+)载体连接。之后转化大肠杆菌JM109,涂布具有20 μ g/mL氨苄霉素的LB平板,挑取转化子进行测序、核酸电泳验证,获取含有6- α -葡萄糖基转移酶基因的表达式载体pET-20b(+)/sp。将表达式载体转化*Escherichia coli* BL21(DE3),得到基因工程菌*E.coli* BL21(DE3)(pET-20b(+)/sp)。

[0034] (2) 活化:

将100 μ L含有基因工程菌*E.coli* BL21(DE3)(pET-20b(+)/sp)的甘油管藏液接种于50 mL含有20 μ g/mL氨苄霉素的LB培养基(1%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,1%氯化钠,pH 7.0)中,37℃、200 rpm下摇瓶培养过夜,得到种子液。

[0035] (3) 发酵:

将步骤(2)所得种子液按4%的接种量转接至50 mL含有20 μ g/mL氨苄霉素的TB培养基(1.2%胰蛋白胨,2.4%酵母提取物,0.4%甘油,17 mM KH_2PO_4 ,72 mM K_2HPO_4 ,pH 6.0)中,25℃、200 rpm下摇瓶富集培养6 h,随后加入终浓度为0.05 mM的IPTG,于25℃(200 r/min)摇床继续诱导36 h。发酵结束后,将发酵液离心收集菌体,等比例添加50 mM PBS(pH 7.0)缓冲液重悬浮菌体,超声破碎后,高速离心收集上清液即为重组6- α -葡萄糖基转移酶的粗酶液(Sp-6GT)。

[0036] 实施例2:制备改性淀粉的方法

具体步骤如下:

(1)称取普通玉米淀粉10 g,加入90 mL离子水中,在100℃、350 rpm条件下搅拌15 min,混合均匀,得到浓度为10% (w/w)的糊化淀粉;

(2)在水浴锅温度降低为35℃后,分别加入0 U/g、150 U/g浓度的Sp-6 GT粗酶液,酶解10 h后,煮沸20 min灭酶;

(3)将灭酶后的酶解液冻干浓缩并称重,工艺流程图如图1所示。

[0037] 将得到的改性淀粉冻干粉进行RVA检测,结果如图2所示。检测样品总体积为25g,以干基淀粉8%为基准,根据冻干样品的含水量计算并补齐所需重量的水,装入RVA主机后测量。

[0038] 表1.普通玉米淀粉改性前后的RVA结果

样品	普通玉米淀粉 (0 U/g 处理后的产物)	改性淀粉
糊化温度	74.2 °C	50.2 °C
峰值粘度	2931 cP	7500 cP
热糊粘度	1989 cP	4746 cP
最终粘度	3277 cP	7711 cP
崩解值	942 cP	2454 cP
回生值	1288 cP	2165 cP

[0039] 从RVA特性来看与普通玉米淀粉相比,改性淀粉的糊化温度大幅降低,意味着淀粉在很低的温度下就开始吸水膨胀、糊化。有利于在较低的调质温度下实现糊化,节省能耗。在动物消化道内也更容易被酶分解,潜在提高了消化率。其峰值粘度极高意味着淀粉颗粒的膨胀能力极强,吸水后能产生极高的粘度。能显著提高颗粒料的硬度和耐久度。

[0040] 将步骤(2)所得酶解液取样1 g并定容至10 mL,加入1 mL 1000 U/g的异淀粉酶,40 °C,160 r/min反应24 h,使淀粉彻底脱支。沸水浴30 min终止反应、然后10000 r/min离心10 min,稀释20倍后,过0.22 μm水相滤膜进行HPAEC-PAD检测,结果如图3所示,与未添加Sp-6 GT粗酶液处理的淀粉相比,改性淀粉的链长分布发生显著变化。

[0041] 实施例3:改性淀粉的制备方法优化

具体实施方式参考实施例2,区别在于,将步骤(2)中Sp-6 GT粗酶液的添加量调整为50 U/g、100 U/g、200 U/g、300 U/g。取步骤(2)得到的酶解液,进行HPAEC-PAD检测,结果如表2和图4所示。

[0042] 表2.不同加酶量改性普通玉米淀粉的链长分布结果

样品	分支链段含量(%)			
	DP 1-12	DP 13-24	DP 25-36	DP > 36
普通玉米淀粉(0 U/g)	11.71	56.1	19.21	12.98
50 U/g	35.63	57.76	5.33	1.27
100 U/g	50.8	41.7	6.19	1.31
150 U/g	52.43	35.34	11.12	1.12
200 U/g	94.18	5.82	0	0
300 U/g	59.68	35.93	3.81	0.56

[0043] 从图表数据可知,当加酶量为50 U/g和100 U/g时,淀粉改性程度较低,产物中仍

保留大量聚合度(DP)为13~24的支链片段;当加酶量增至200 U/g时,DP 1~12的链段比例显著提高至94.18%,但酶用量过高同时引起明显的水解副反应,生成14.39%的单糖;继续提高酶量至300 U/g,单糖含量进一步上升至27.51%,表明6GT酶的水解作用已占主导。综上,选择150 U/g的加酶量可在有效控制短链生成的同时,显著抑制单糖的过度形成,从而实现较高的定向改性效率。

[0044] 实施例4:改性淀粉饲料在调节肠道菌群方面的应用

(1) 以不同剂量的实施例2制备得到的改性淀粉为原料进行动物实验:

将40只小鼠平均分成4组,每组10只小鼠,分别为对照组,模型组,低剂量改性淀粉饲料组(L-SCS),高剂量改性淀粉饲料组(H-SCS),实验开始前所有小鼠均经过7天适应性喂养,干预期从第1天开始,空白对照组每天灌胃PBS磷酸缓冲液;模型组在前七天灌胃PBS磷酸缓冲液,后七天灌胃3.0%葡聚糖硫酸钠(DSS)进行造模;低剂量改性淀粉饲料组在前七天灌胃低剂量改性淀粉饲料(100 mg/kg),后七天先灌胃3.0%葡聚糖硫酸钠(DSS),1 h后灌胃低剂量改性淀粉饲料(100 mg/kg);高剂量改性淀粉饲料组在前七天灌胃高剂量改性淀粉饲料(400 mg/kg),后七天先灌胃3.0%葡聚糖硫酸钠(DSS),1 h后灌胃高剂量改性淀粉饲料(400 mg/kg)。所有小鼠均自由饮食、饮水,各组DSS的灌胃量均为0.012g,每2天称取小鼠的体重,测量相关指标,在造模后的第7天(干预期第14天)处死小鼠,取小鼠的肠道内容物样本,对其进行分析。

(2) 实验方法:

实验期间隔日测量小鼠体重并绘制变化曲线,计算日体重变化率,同时收集粪便样本进行性状评估及潜血检测;实验终点处死小鼠后对结肠组织进行常规石蜡包埋,制备切片后进行阿利新蓝(Alcian blue)染色,通过阿利新蓝染色观察杯状细胞数量及分布;同时对收集的肠道内容物进行16s rRNA分析。

[0045] (3) 实验结果:

实验探究了改性淀粉饲料对DSS诱导的小鼠的肠道菌群调节作用,实验设置了100 mg/kg和400 mg/kg两个剂量组。实验结果全面证实了改性淀粉饲料的调节效应:在体重变化方面,对照组呈现稳定增长趋势,而DSS模型组体重显著下降($p<0.001$),各剂量改性淀粉饲料干预组均能有效缓解这一症状($p<0.05$);疾病活动指数(DAI)评估结果显示,与正常对照组相比,DSS模型组DAI评分显著升高($p<0.001$),表现为粪便性状异常、排便频率增加及潜血现象严重。经不同剂量改性淀粉饲料干预后,DAI评分较模型组均有明显下降($p<0.05$),且呈现明确的剂量-效应关系;阿利新蓝染色分析表明(图6),DSS组结肠黏膜杯状细胞密度显著降低且分布不均($p<0.001$);而改性淀粉饲料干预组均能有效增加杯状细胞数量并改善其分布,呈现剂量依赖性效应,表明改性淀粉能有效修复黏液层屏障功能;16s rRNA分析结果显示改性淀粉饲料能显著逆转结肠炎引起的菌群紊乱,图5中表明组间微生物群落结构存在极显著的统计学差异。PCoA图中,DSS模型组的样本点明显偏离对照组,而经过高剂量改性淀粉饲料组处理的样本点则向对照组方向靠拢,并用椭圆聚类。这证明高剂量改性淀粉能有效使紊乱的肠道菌群整体结构向健康状态恢复。可观察到诸如厚壁菌门(Firmicutes)与拟杆菌门(Bacteroidetes)的比例等在DSS组发生紊乱,而在改性淀粉饲料处理组得到改善。有益菌Akkermansia muciniphila的丰度显著上升。条件致病菌或促炎菌(如埃希氏菌属、螺杆菌属)的丰度下降。从图中可以看出菌群结构的改善程度与改性淀粉

的剂量密切相关。高剂量组的改善效果通常明显优于低剂量组,更接近健康对照组,表明其调节作用具有剂量依赖性。

[0046] 实施例5:一种颗粒饲料

一种颗粒饲料,所述颗粒饲料包括400 mg的改性淀粉、豆粕115 mg、磷酸氢钙35 mg、食盐16.5 mg、氨基酸5.5 mg。冻干后的改性淀粉粉碎过80-100目筛,控制水分 $\leq 10\%$ 。将改性淀粉与其余物质等量递增混合,V型混合机中搅拌15-20分钟。加入粘合剂溶液(HPMC溶于纯水)湿法制粒。50-60℃流化床干燥至水分 $\leq 5\%$,得到淀粉颗粒饲料。制备得到的淀粉颗粒饲料具有调节小鼠肠道菌群的效果。

[0047] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

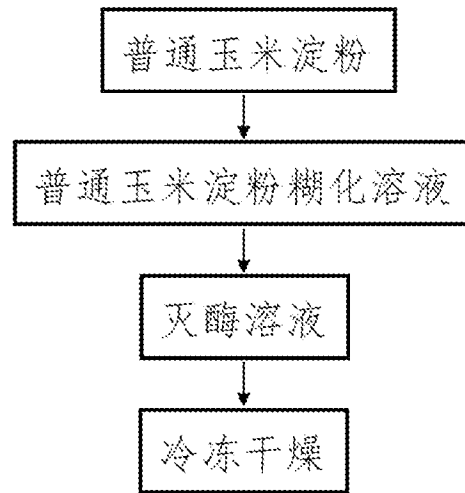


图1

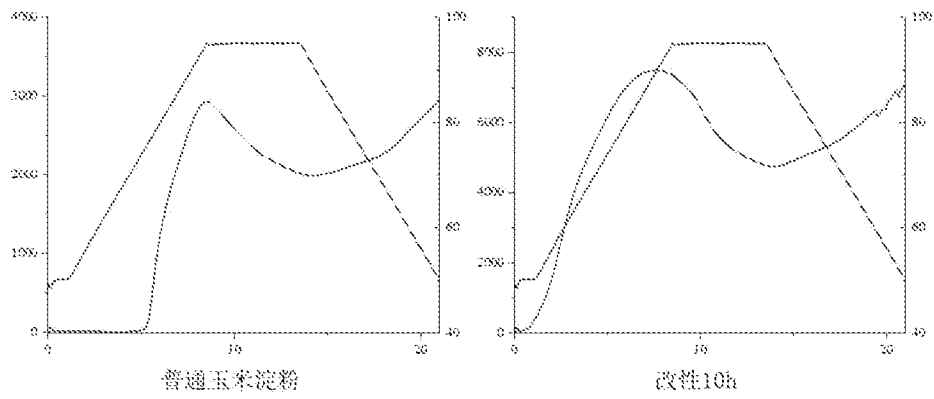


图2

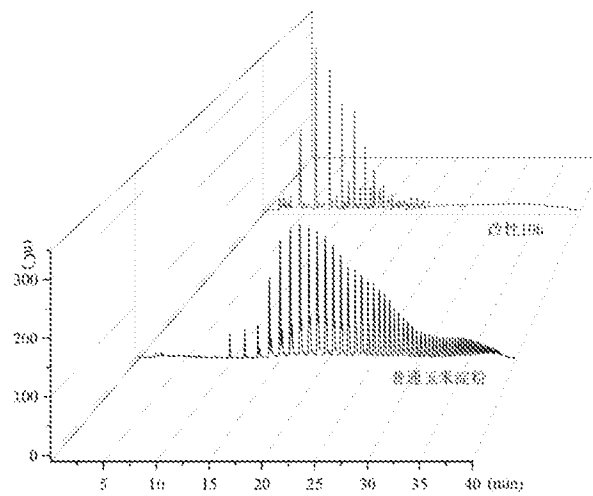


图3

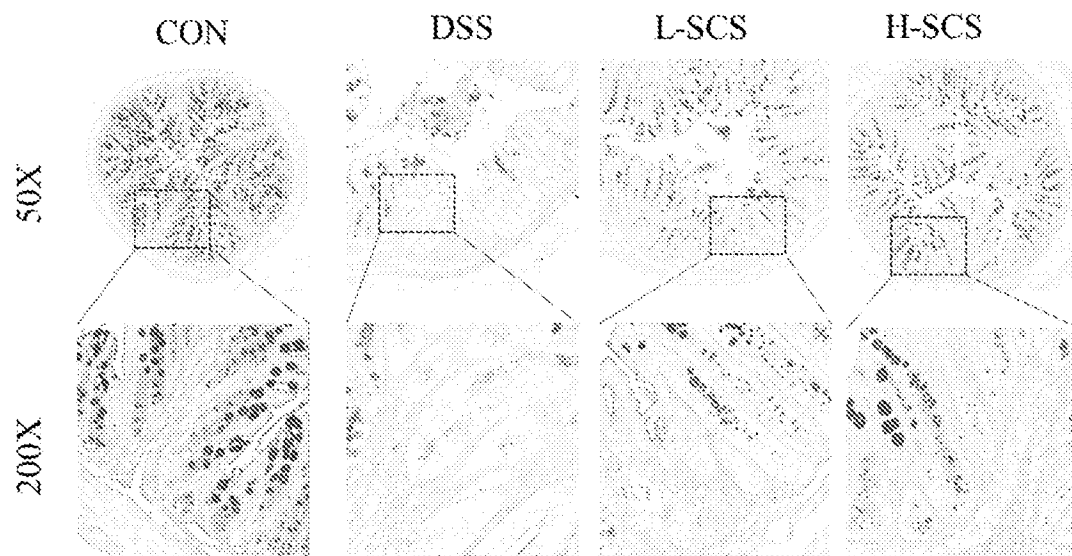


图6