



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201106957 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：098129313

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 08 月 31 日

(51)Int. Cl.：

A61K35/74 (2006.01)

C07K14/335 (2006.01)

A23C9/123 (2006.01)

A61P37/08 (2006.01)

(71)申請人：生合生物科技股份有限公司 (中華民國) SYNBIO TECH INC. (TW)

高雄市路竹區北嶺六路 66 號

(72)發明人：徐添根 HSU, TIEN KEN (TW)；蔡政志 TSAI, CHENG CHIH (TW)；朱明財 CHU, MING TSAI (TW)；柯博強 KE, PO CHIANG (TW)；張憶如 CHANG, I JU (TW)

(74)代理人：陳啟舜

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：9 項 圖式數：6 共 18 頁

(54)名稱

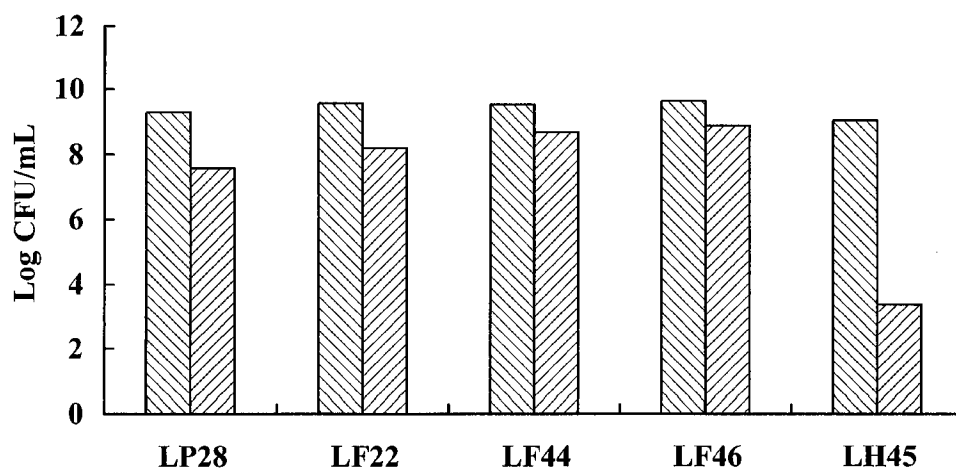
一種新植物乳酸桿菌株 L P 2 8 及其減緩過敏反應之用途

THE NEW STRAIN OF LACTOBACILLUS PLANTARUM LP28 AND ITS USE IN TREATING ALLERGY

(57)摘要

一種植物乳酸桿菌菌株(Lactobacillus plantarum LP28)，寄存於中華民國食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC910435。此株乳酸桿菌菌株或其代謝產物具有優異之減緩過敏反應的能力，而可廣泛用於食品組成物或藥學組成物之製備。

▣ MRS ▣ MRS+0.3% OX



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明涉及一種可減緩過敏反應之乳酸桿菌菌株。

【先前技術】

過敏反應係指免疫系統對一些沒有侵犯性的外來物質產生的強烈反應，近數十年間，過敏疾病患者劇增，該過敏疾病例如支氣管氣喘、過敏性鼻炎及異位性皮膚炎等。人體免疫中心細胞 T 淋巴球可依據分泌之細胞素的不同分為二型，第一型 T 淋巴球 (Th1) 主要分泌干擾素 γ (Interferon- γ , IFN- γ)，第二型 T 淋巴球 (Th2) 主要分泌介白素-4 (Interleukin-4, IL-4)、介白素-5 (Interleukin-5, IL-5) 等細胞激素；然而，第一型及第二型 T 淋巴球間具有動態的平衡關係，如果第一型 T 淋巴球之作用微弱，則容易引起人體之過敏反應。目前，過敏疾病之治療多半係以藥物針對病徵進行治療，但以藥物治療過敏疾病，對患者容易產生副作用，使得許多國家之研究機構迫切尋找更安全有效的過敏疾病治療方法。

研究學者發現，腸胃道中有害菌與益生菌之菌數比例與過敏疾病之發生具有極大的相關性，腸胃道中益生菌多者，益生菌會保護消化道黏膜、促進免疫球蛋白增生、產生自然抗體及使免疫細胞容易滲入消化道黏膜；而腸胃道中有害菌多者，有害菌容易破壞腸胃道黏膜、導致淋巴細胞減少及免疫球蛋白種類不足的現象，然而腸胃道黏膜的破壞會導致抗原量增加，進而引起致敏作用產生過敏疾

病；是以，人類所接觸的細菌種類，足以影響免疫系統發育的走向，許多研究學者希望可藉由調整腸胃道中益生菌菌數及種類，進一步控制過敏反應的發生。

乳酸菌是腸胃道中最常見之益生菌，其係一種安全性極高之微生物。乳酸菌具有抑制有害菌之生長、調節免疫反應、清除過氧化物及降低膽固醇等能力。此外，乳酸菌含有宜人的香味物質，並能產生乳酸或細菌素(bacteriocin)等抗菌性物質，而常被廣泛的使用於製成發酵乳等食品。

然而，欲利用乳酸菌達到治療過敏疾病之目的，目前之乳酸菌種之功效尚無法令人滿意，人體胃酸酸度高達 pH 2.5，大多數乳酸菌無法在如此酸之環境中生存，使得為人體所食入之乳酸菌經過胃酸及膽鹼之侵蝕後菌體受損或死亡，而無法有效的附著於腸黏膜而隨糞便排出體外。腸道是人體最大之免疫器官，大多數被人體攝入的乳酸菌無法健康的存活於腸道中，即無法發揮乳酸菌之功能，進而難以有效改善免疫系統所引發之過敏反應。

因此，篩選出可提高第一型 T 淋巴球作用，且同時可抵抗胃酸及膽鹼之乳酸菌株，為治療過敏疾病之刻不容緩課題。

【發明內容】

本發明之目的係提供一種乳酸菌菌株，其可促進第一型 T 淋巴球作用，以分泌干擾素 γ 。

本發明之另一目的係提供此一種乳酸桿菌菌株，其有效抵抗胃酸及膽鹼。

本發明之再一目的係提供此一株乳酸桿菌菌株，其可減緩過敏反應。

本發明主要係提供一種植物乳酸桿菌菌株 (*Lactobacillus plantarum* LP28)，該株乳酸桿菌菌株係寄存於中華民國食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC910435。該株乳酸桿菌菌株或其代謝產物具有優異之減緩過敏反應的能力，而可廣泛用於食品組成物或藥學組成物之製備。

【實施方式】

為讓本發明之上述及其他目的、特徵及優點能更明顯易懂，下文特舉本發明之較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

本發明人經過廣泛且深入的實驗，篩選出一株具有優異減緩過敏反應之植物乳酸桿菌菌株 (*Lactobacillus plantarum* LP28；寄存編號：BCRC910435)。該株乳酸桿菌菌株之篩選過程如下：

1、由樣品中篩選乳酸菌菌株

本發明之篩選乳酸菌的第一步驟：係取傳統市場豆干做為乳酸菌篩選來源樣品。樣品先進行 37°C，16~20 小時之集殖培養 (Enrichment culture)，並篩選出產生凝乳現象之菌株。本發明之篩選乳酸菌菌株的第二步驟：係取集殖培養過後的樣品進行序列稀釋及平板劃線培養，並於 37°C 厭氧條件下培養 2 至 3 天，以挑選出不同菌相之單一菌落。本發明之篩選乳酸菌菌株的第三步驟：係將該具有單一菌

落進行革蘭氏染色及觸酶反應測試，並篩選出革蘭氏染色呈陽性且觸酶反應呈陰性之數株菌株，即為初步篩選之乳酸菌菌株，並將該初步篩選出的乳酸菌菌株進行菌種之鑑定，該初步篩選出的數株乳酸菌菌株中，包含有一株植物乳酸桿菌菌株 (*Lactobacillus plantarum*)、三株發酵乳酸桿菌菌株 (*Lactobacillus fermentum*) 與一株瑞士乳酸桿菌 (*Lactobacillus helveticus*)，本發明人分別將該五株乳酸菌菌株命名為 LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45。

2、耐酸性耐膽鹽試驗

本發明將該五株乳酸菌菌株 (LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45) 分別進行耐酸性及耐膽鹼試驗。該耐酸性試驗之第一步驟：係將該五株乳酸菌菌株接種於 MRS 培養液中，並於 37°C 下培養數個小時以產生各該乳酸菌菌株之 MRS 培養液。該耐酸性試驗之第二步驟：係取一定量之各株乳酸菌菌株之 MRS 培養液，以 5000rpm、5 分鐘離心後，並以無菌 PBS 沖洗離心取得菌體後覆溶於無菌 PBS，分別添加於人工胃液中，該人工胃液之酸性為 pH2.0 及 pH3.0，並置於 37°C 培養兩個小時，且每一個小時分析一次菌數。該五株乳酸菌菌株 (LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45) 之耐酸性試驗 pH2.0 與 pH3.0 之結果分別如第 1 圖與第 2 圖所示，由圖可知，進行耐人工胃酸 pH2.0 兩小時後，以乳酸桿菌菌株 LP28、LF22 與 LF46 具有最高之存活菌數 ($>10^6$ Log CFU/mL)，而進行耐人工胃酸 pH3.0 兩小時結果顯示，乳酸桿菌菌株 LP28、LF22 具有最高之存活菌數 ($>10^9$ Log CFU/mL)，上述結果顯示乳酸菌 LP28 與 LF22 具有良

好耐酸能力。該些乳酸菌菌株 LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45 耐人工胃酸 pH2.0 兩個時段之存活菌數結果如第 1 圖所示；另外該些乳酸菌耐人工胃酸 pH3.0 兩個時段之存活菌數結果如第 2 圖所示。

該耐膽鹽試驗之第一步驟：係將該五株乳酸菌菌株（LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45）分別接種於 MRS 培養液中，並於 37°C 下培養數個小時以產生各該乳酸菌菌株之 MRS 及培養液。該耐膽鹽試驗之第二步驟：係分別取一定量之各株乳酸菌菌株之 MRS 培養液，分別添加於含有 0.3% 膽鹽（0.3% ox gall）之 MRS 培養液中，以作為實驗組，且取各株乳酸菌菌株之培養液加入未添加 0.3% 膽鹽之 MRS 培養液中，以做為對照組；將實驗組及對照組置於 37°C 培養數個小時後，分析其存活菌數。該五株乳酸菌菌株（LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45）之耐膽鹽試驗之結果如第 3 圖所示，由圖可知，進行耐膽鹽數小時後，以乳酸菌菌株 LP28、LF22、LF44 與 LF46 具有最高之存活菌數，該五株乳酸菌菌株 LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45 耐膽鹽之存活菌數結果如第 3 圖所示：

本發明之將五株乳酸菌菌株進行耐酸及耐膽鹼試驗之結果，係篩選出二株具最高耐人工胃液且耐膽鹽之乳酸菌菌株 LP28 與 LF22，並取該些乳酸菌菌株 LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45 進行免疫激活試驗。

3、免疫激活試驗

本發明係利用細胞實驗評估乳酸菌減低過敏免疫反應的能力。其係進行以乳酸菌刺激人類周邊血液單核球細胞。

胞 (human peripheral blood mononuclear cells, hPBMC) 之免疫激活試驗，並以酵素免疫連結吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 檢測第一型 T 淋巴球所分泌之細胞激素 IFN- γ 及第二型 T 淋巴球所分泌之細胞激素 IL-4 的產量。

該免疫激活試驗之第一步驟：係製備人類周邊血液淋巴球，其係第一型 T 淋巴球。取人類白血球濃厚液與磷酸緩衝液 (Phosphate Buffered Saline, PBS) 均勻混合；將該混合均勻之混合液以細胞梯度離心方式分離出人類週邊血液單核細胞。該免疫激活試驗之第二步驟：係將該人類周邊血液單核細胞與 Hanks 平衡鹽溶液 (Hanks balanced salt solution, HBSS) 均勻混合清洗後，置入 RPMI-1640 培養基中，利用錐蟲藍染色法 (Trypan blue) 計算人類周邊血液單核球細胞數目，並利用 RPMI-1640 培養基將該周邊血液單核球細胞數目調整為 2×10^6 Cells/ml，分盤於 24 孔盤中，與不同濃度乳酸菌體共培養。負對照組為以 10 μ g/ml 之植物血凝素 (Phytohemagglutinin, PHA) 加入到 2×10^6 Cells/ml 之人類周邊血液單核球細胞均勻混合，與其他乳酸菌體刺激人類周圍血液單核球做比較。該免疫激活試驗之第三步驟：係刺激細胞素產生。其係取該五株乳酸菌菌株 (LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45) 做為實驗組，並取未添加任何乳酸菌之人類周邊血液單核細胞 (PBMC) 當做對照組及誘導 IFN- γ 的產生之植物血凝素 (PHA) 做為控制組，將各培養液與細胞液以適當比例均勻混合培養數十小時，取實驗組、對照組及控制組培養上清液進行酵

素免疫連結吸附分析，以檢測細胞激素 IFN- γ 與 IL-4 的產量。各乳酸菌菌株刺激人類周邊血液單核球細胞產生 IFN- γ 、IL-4 及兩者間的比例之結果分別為如第 4 圖、第 5 圖及第 6 圖所示，又該實驗組與控制組刺激人類周邊血液單核球細胞產生 IFN- γ 的量值如第 4 圖所示：

由第 4 圖可知，該乳酸菌菌株 LP28 可刺激人類周邊血液單核球細胞產生較多之 IFN- γ ，進而可提高第一型 T 淋巴球之作用，平衡第一型及第二型 T 淋巴球間之動態關係，可進一步減緩人類之過敏反應。

實驗組與控制組刺激人類周邊血液單核球細胞產生 IL-4 的量值如第 5 圖所示：

IL-4 為活化 Th2 免疫系統中的肥大細胞的細胞激素，可與體內的 IgE 結合，經過訊息傳遞刺激細胞釋放類似組織胺等化學物質而引起發炎，此類化學物質導致身體不同部位的組織產生過敏，故 IL-4 會幫助 Th2 細胞的分化而抑制 Th1 細胞的分化。由第 5 圖及上列表格可知，該乳酸菌菌株 LP28 可大幅降低人類周邊血液單核球細胞產生 IL-4 的濃度，有助於 Th1 與 Th2 免疫反應間的平衡。

實驗組與控制組刺激人類周邊血液單核球細胞產生 IFN- γ 與 IL-4 的比值如第 6 圖所示：

如上所述，本發明係藉由對生物體有益之本發明三株乳酸菌菌株 LP28 刺激第一型 T 淋巴球 (Th1) 分泌大量干擾素 γ (Interferon- γ)，並降低第二型 T 淋巴球 (Th2) IL-4 的分泌，進而可減緩過敏反應，亦可利用本發明乳酸菌菌株 LP28 之代謝產物，將該代謝產物廣泛應用於食品組成。

物或藥學組成物之加工，以製作可減緩過敏反應之食品、藥學組成或治療劑，其中該食品係可為發酵乳等乳製品。

雖然本發明已利用上述較佳實施例揭示，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍之內，當可作各種更動與修改，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

第 1 圖：乳酸菌菌株 LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45 耐人工胃酸 pH2.0 兩個時段之存活菌數結果柱狀圖。

第 2 圖：乳酸菌菌株 LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45 耐人工胃酸 pH3.0 兩個時段之存活菌數結果柱狀圖。

第 3 圖：乳酸菌菌株 LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45 耐 0.3%膽鹽試驗結果柱狀圖。

第 4 圖：乳酸菌菌株 LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45 刺激人類周邊血液單核球細胞產生 IFN- γ 之結果柱狀圖。

第 5 圖：乳酸菌菌株 LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45 刺激人類周邊血液單核球細胞產生 IL-4 之結果柱狀圖。

第 6 圖：乳酸菌菌株 LP28、LF22、LF44、LF46 與 LH45 刺激人類周邊血液單核球細胞產生 Interferon-r/IL-4 比值之結果柱狀圖。

【主要元件符號說明】

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98121313

※申請日：98 8 31

※IPC 分類：

A61k 35/74

C07K 14/335

A23C 9/123

A61P 37/08

一、發明名稱：(中文/英文)

一種新植物乳酸桿菌株 LP28 及其減緩過敏反應之用途 / The
New Strain of *Lactobacillus Plantarum* LP28 and Its Use in Treating
Allergy

二、中文發明摘要：

一種植物乳酸桿菌菌株 (*Lactobacillus plantarum* LP28)，寄存於中華民國食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC910435。此株乳酸桿菌菌株或其代謝產物具有優異之減緩過敏反應的能力，而可廣泛用於食品組成物或藥學組成物之製備。

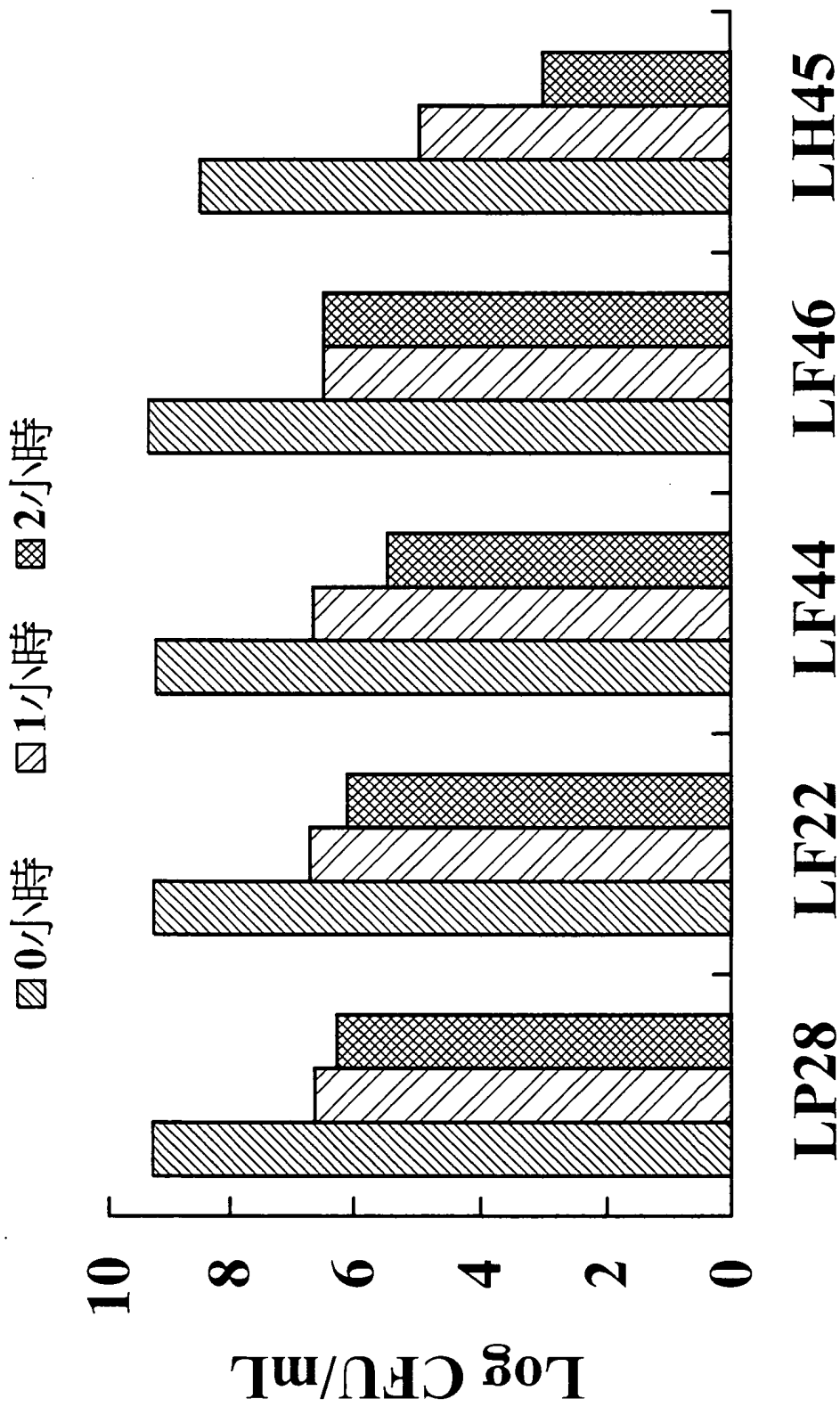
三、英文發明摘要：

The new strain of *Lactobacillus plantarum* LP28, which was deposited at Bioresource Collection and Research Center of Taiwan, with deposit number of BCRC910435. The strain or its metabolic products can be used for treating allergy. The strain can be used in food or pharmaceutical compositions.

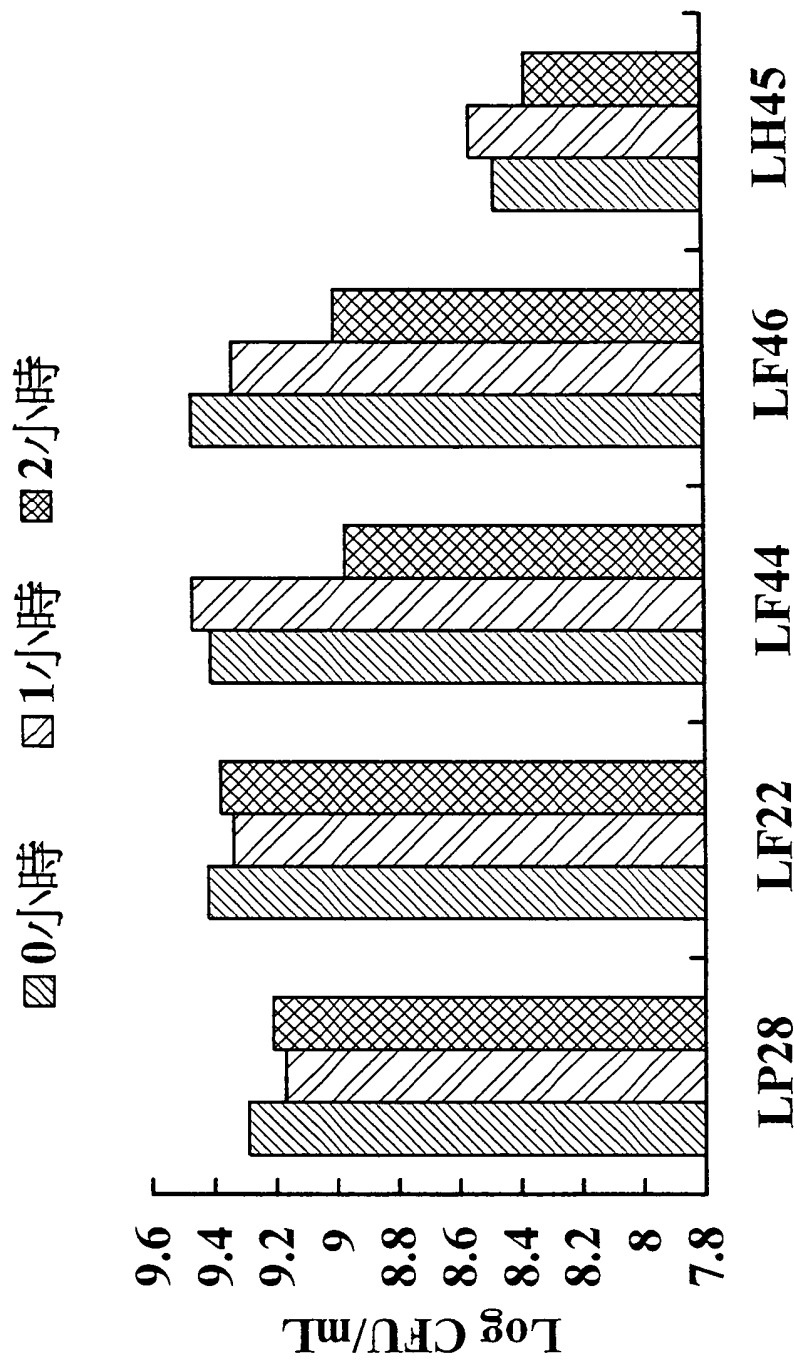
七、申請專利範圍：

- 1、一種經分離之植物乳酸桿菌菌株〔*Lactobacillus plantarum* LP28〕，其寄存於中華民國食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC910435。
- 2、依申請專利範圍第 1 項所述之植物乳酸桿菌菌株，其促進第一型 T 淋巴球大量分泌細胞激素，進而平衡第一型及第二型 T 淋巴球間之動態關係。
- 3、依申請專利範圍第 2 項所述之植物乳酸桿菌菌株，其中該細胞激素為干擾素 γ (Interferon Interferon- γ)。
- 4、依申請專利範圍第 1 項所述之植物乳酸桿菌菌株，其降低第二型 T 淋巴球分泌細胞激素，進而平衡第一型及第二型 T 淋巴球間之動態關係。
- 5、依申請專利範圍第 4 項所述之植物乳酸桿菌菌株，其中該細胞激素為介白素-4(Interleukin-4, IL-4)。
- 6、一種減緩過敏反應之治療劑，其包含如申請專利範圍第 1 項所述之植物乳酸桿菌菌株或其代謝產物。
- 7、一種減緩過敏反應之藥學組成物，其包含如申請專利範圍第 1 項所述之植物乳酸桿菌菌株或其代謝產物。
- 8、一種減緩過敏反應之食品，其包含如申請專利範圍第 1 項所述之植物乳酸桿菌菌株或其代謝產物。
- 9、依申請專利範圍第 8 項所述減緩過敏反應之食品，該食品係發酵乳。

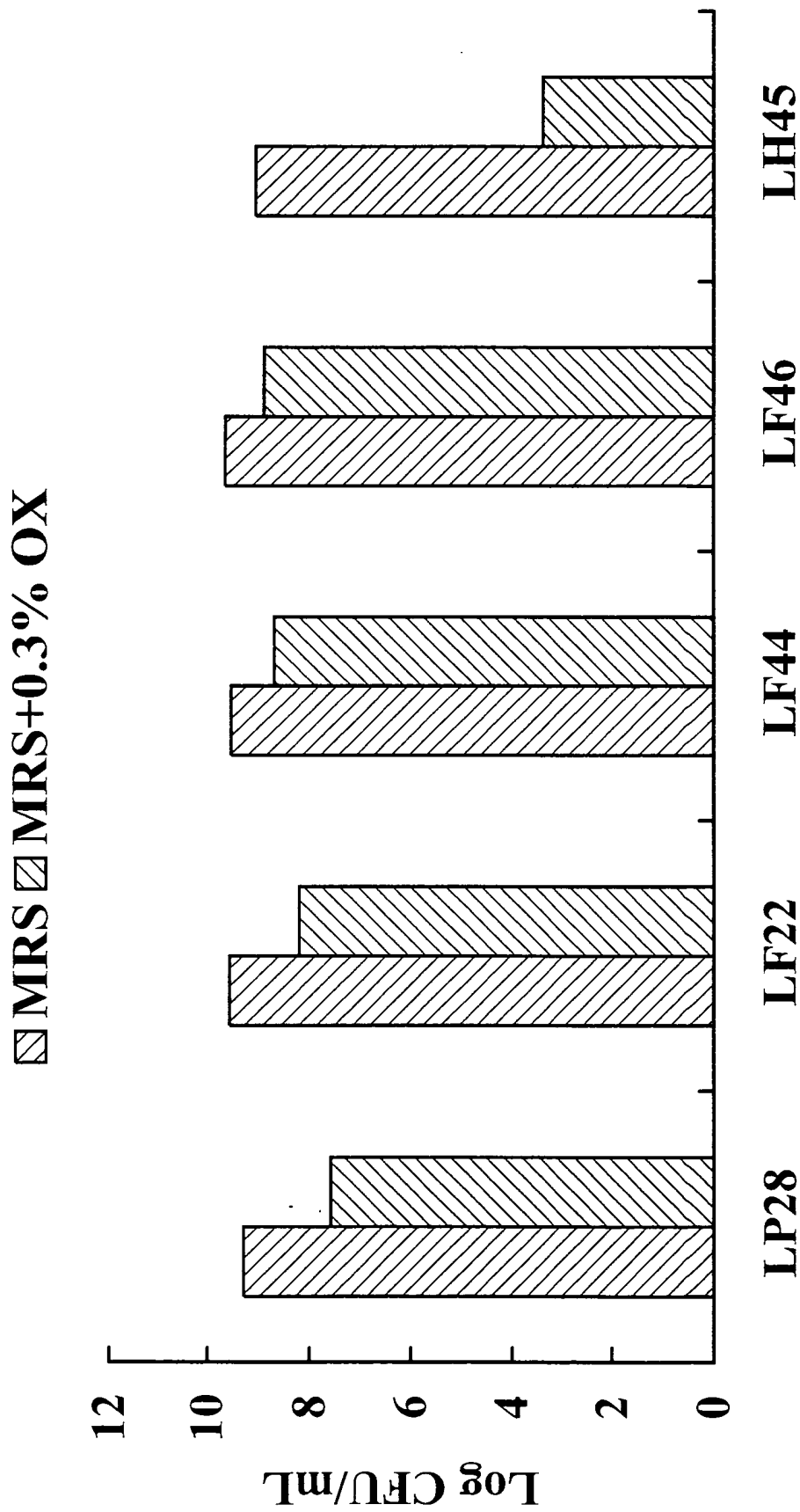
八、圖式：



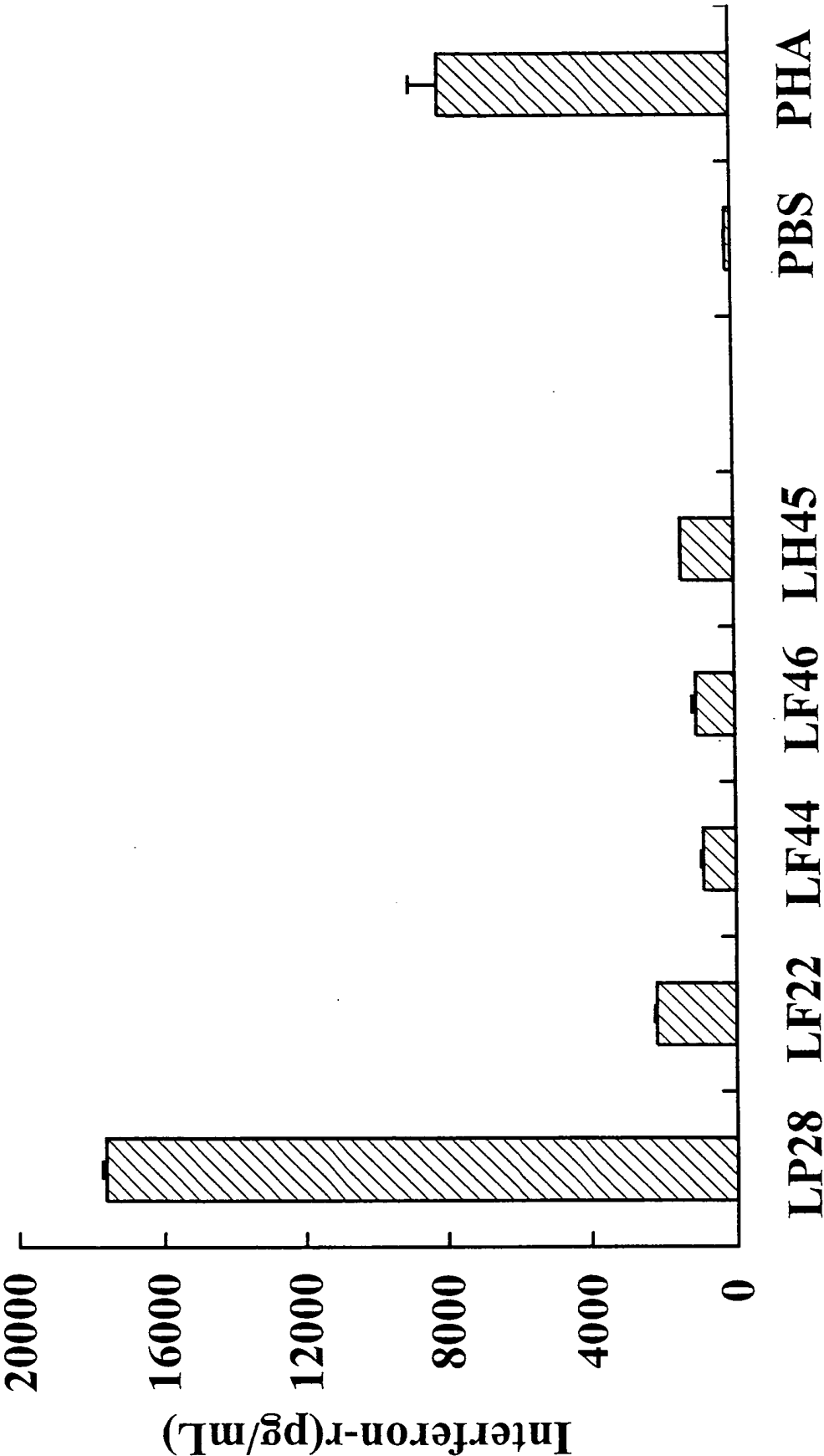
第 1 圖



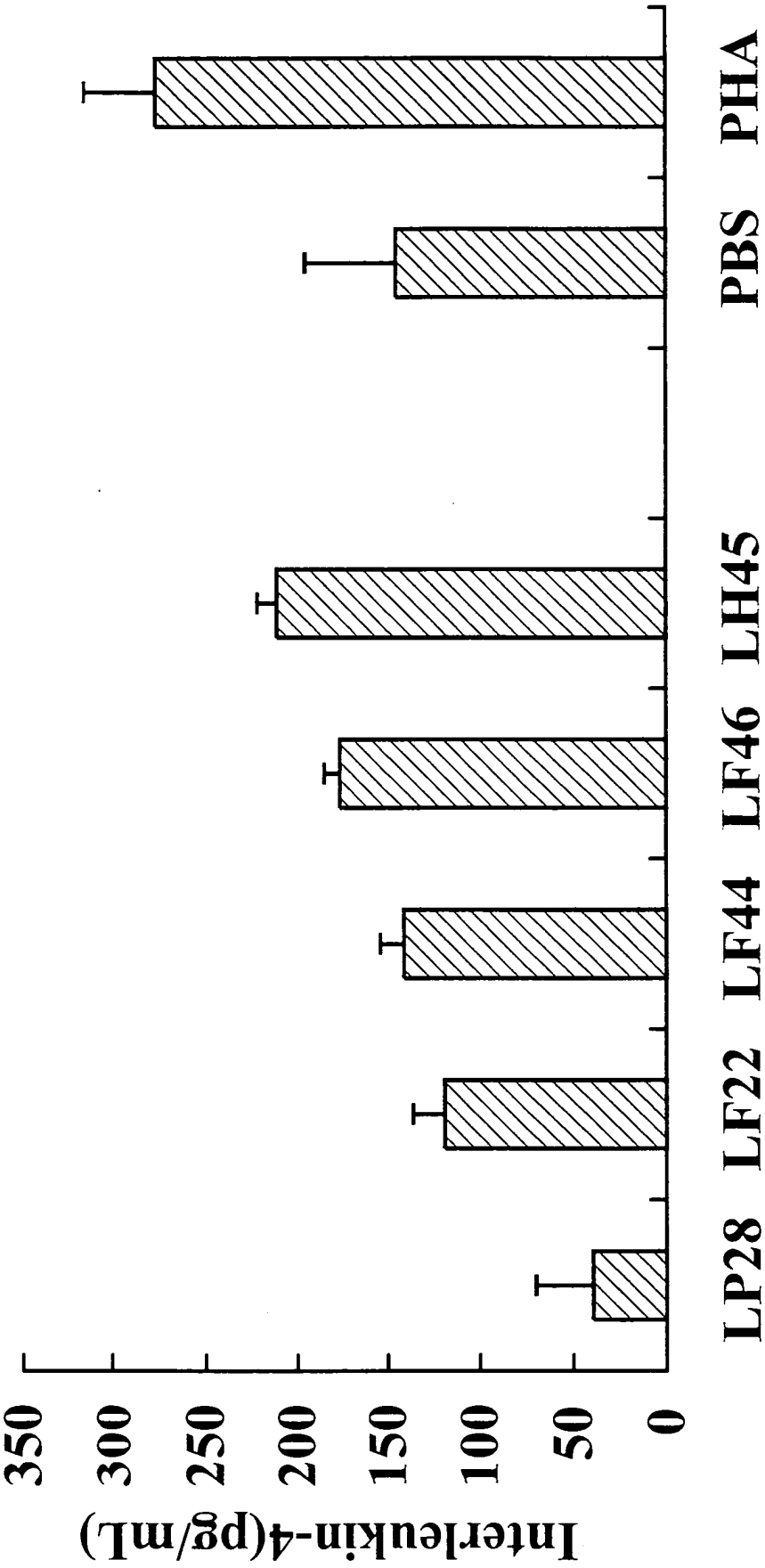
第 2 圖



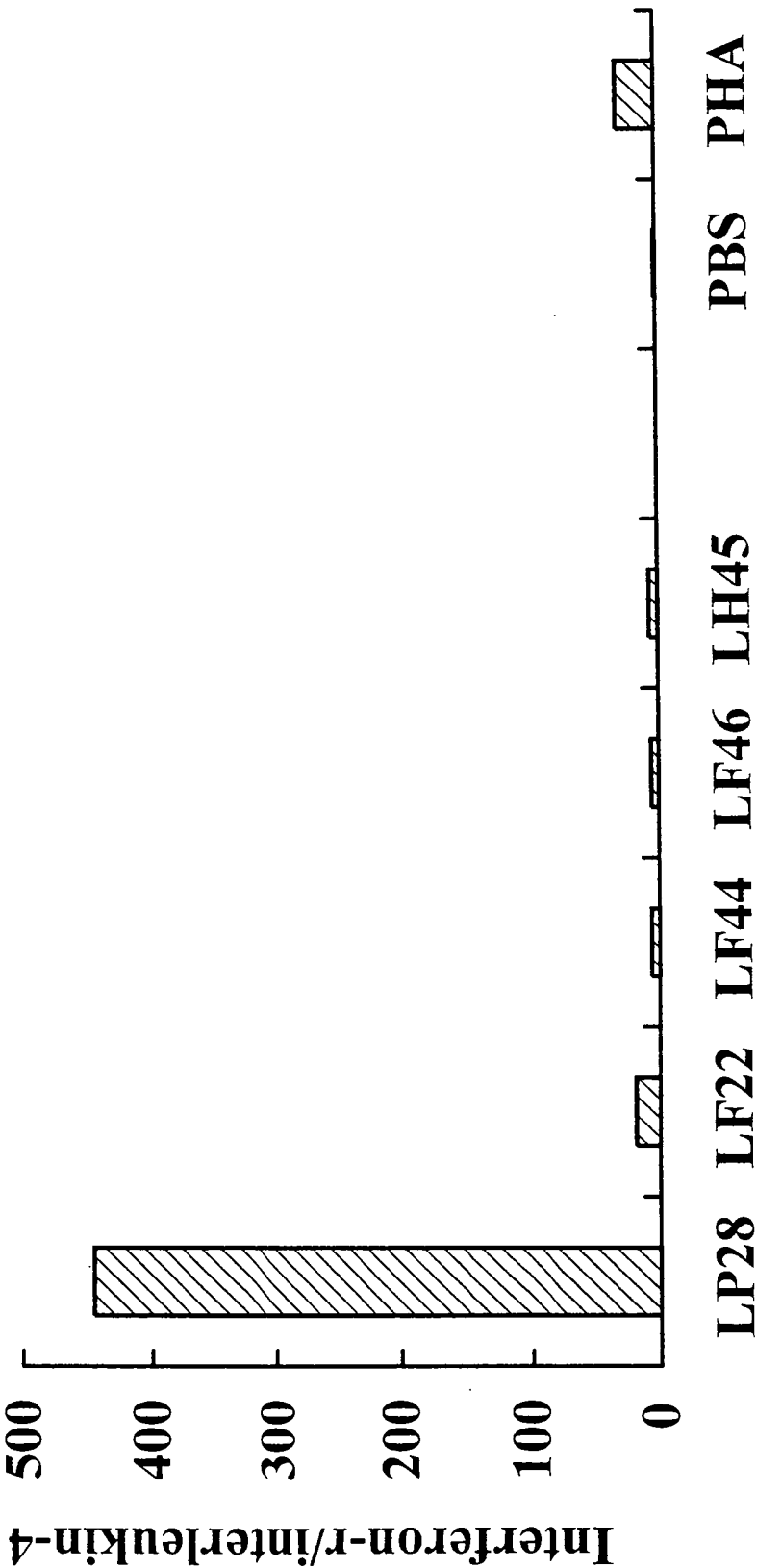
第 3 圖



第 4 圖



第 5 圖



第 6 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (3) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)