



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103298924 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201180050284. X

A61P 31/10(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 08. 17

A61P 1/02(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61Q 11/00(2006. 01)

10173286. 5 2010. 08. 18 EP

A61Q 19/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A23L 1/20(2006. 01)

2013. 04. 18

C12R 1/24(2006. 01)

C12R 1/25(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/EP2011/064173 2011. 08. 17

KR 100780030 B1, 2007. 11. 30,

(87) PCT国际申请的公布数据

KR 100866504 B1, 2008. 11. 11,

W02012/022773 EN 2012. 02. 23

杨颖 等. 植物乳杆菌H0-69的口腔益生性质研究. 《华西口腔医学杂志》. 2008, 第 26 卷 (第 5 期),

(83) 生物保藏信息

DN Della Riccia et al..

CECT 7480 2009. 02. 18

CECT 7481 2009. 01. 28

Anti-inflammatory effects of Lactobacillus brevis (CD2) on periodontal disease. 《Oral Diseases》. 2007, 第 13 卷 (第 4 期),

(73) 专利权人 AB 一生物学有限公司

地址 西班牙巴塞罗那

(72) 发明人 J. 库内卡斯特拉纳

审查员 王子晔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 孔青 李进

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

A61K 35/747(2015. 01)

A61K 8/99(2006. 01)

权利要求书1页 说明书17页

序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

用于口腔健康的益生菌组合物

(57) 摘要

本发明提供包含有效量的植物乳杆菌 CECT 7481 和短乳杆菌 CECT 7480 的组合物。所述菌株表现出多种功能特性,所述功能特性使其适用于其在改善口腔健康方面的应用。这类特性不仅包括对口腔病原体良好的拮抗特性,而且还包括定植口腔的能力以及低酸化特征。本发明亦提供所述组合物作为益生菌和 / 或药剂用于口腔健康应用的用途以及包含所述组合物的制品。

1. 一种组合物,所述组合物包含植物乳杆菌 CECT 7481 和短乳杆菌 CECT 7480。
2. 一种益生菌制品,其包含如在权利要求 1 中定义的组合物。
3. 权利要求 1 所定义的组合物在制备用于预防和 / 或治疗受试者口腔中由口腔病原体引起的病症的药物中的用途。
4. 根据权利要求 3 的用途,其中所述病症为牙菌斑相关的病症。
5. 根据权利要求 4 的用途,其中所述牙菌斑相关的病症为牙龈炎、牙周炎、龋齿或敏感牙。
6. 根据权利要求 3 的用途,其中所述病症为口臭。
7. 根据权利要求 3 的用途,其中所述病症为念珠菌病。
8. 一种药物组合物,所述组合物包含如在权利要求 1 中定义的组合物以及至少一种药学上可接受的赋形剂。
9. 一种可食用制品,其包含如在权利要求 1 中定义的组合物,以及至少一种其它可食用成分。
10. 一种包含根据权利要求 9 的可食用制品的膳食补充剂。
11. 一种美容用组合物,所述组合物包含如在权利要求 1 中定义的组合物以及至少一种美容上可接受的赋形剂。
12. 一种口腔护理制品,所述制品包含有效量的如在权利要求 8 中定义的药物组合物。
13. 根据权利要求 12 的口腔护理制品,所述制品为口香糖、牙膏、口腔喷雾剂、锭剂或口腔分散片。
14. 保藏号 CECT 7481 保藏在西班牙典型培养物保藏中心的植物乳杆菌菌株在制备预防和 / 或治疗受试者口腔中由口腔病原体引起的病症的药物中的用途。
15. 保藏号 CECT 7480 保藏在西班牙典型培养物保藏中心的短乳杆菌菌株在制备预防和 / 或治疗受试者口腔中由口腔病原体引起的病症的药物中的用途。
16. 一种包含根据权利要求 8 的药物组合物的膳食补充剂。
17. 一种口腔护理制品,所述制品包含有效量的如在权利要求 9 中定义的可食用制品。
18. 根据权利要求 17 的口腔护理制品,其为口香糖、牙膏、口腔喷雾剂、锭剂或口腔分散片。
19. 一种口腔护理制品,所述制品包含有效量的如在权利要求 11 中定义的美容用组合物。

用于口腔健康的益生菌组合物

[0001] 本发明涉及医学、微生物学和营养学领域,具体而言,涉及益生乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 菌株的新组合以及用于口腔健康领域的组合物。

背景技术

[0002] 牙菌斑相关的疾病,具体而言牙龈炎、牙周炎和龋齿,代表了大部分全球口腔疾病负担。

[0003] 牙周病(牙龈炎和牙周炎)主要由特定的革兰氏阴性厌氧菌感染引起,导致软结缔组织的初始破坏,并随后导致支持牙齿的基础牙槽骨和韧带的破坏。菌种牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 已作为主要病原体涉及牙周炎的形成和进展。齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、栖牙普雷沃氏菌 (*Prevotella denticola*) 和具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 为亦促成牙龈炎的其它种。基于世界卫生组织调查,大部分儿童具有牙龈炎的体征,以及在成人中初期的牙周病高度流行。例如,在欧洲,预计 15-35% 的成年人口受此多因子疾病所累。

[0004] 龋齿(亦称为蛀牙)为其中细菌过程破坏硬齿结构的疾病。变形链球菌 (*Streptococcus mutans*) 为装备有助于与牙齿表面更好粘附的受体的少数特化的生物体之一,因此成为牙齿表面的早期定植者和龋齿的最重要贡献者。此先锋物种的生长和代谢创造口中的酸性环境,其导致易受腐蚀的高度矿化的牙釉质。

[0005] 除上述之外,认为另一种口腔病症影响大部分人口:口臭。口臭亦称为口腔异味,由来源于含硫氨基酸的细菌降解的许多挥发性化合物导致。涉及的细菌(主要为具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间卟啉单胞菌 (*Porphyromonas intermedia*) 和齿垢密螺旋体)位于口腔中的停滞区,例如舌背面、牙周袋和邻间区。此病变对受其所累的人具有显著影响(在自身和在社交上),并且预计其为继蛀牙和牙周病之后寻求牙科救助的第三个最常见的原因。

[0006] 口腔细菌在全部硬口腔组织和软口腔组织上形成生物膜(牙菌斑),认为其是口腔病理状态中的主要病原体。由不良口腔保健促进的细菌在生物膜内的蓄积,诱发微生物群落中的同种异型转化,导致牙周炎和龋形成的发生,以及促成口臭。

[0007] 酵母,具体而言白色念珠菌 (*Candida albicans*),亦可以是口腔中病症的起因。老年人易受由慢性病、药物治疗、不良口腔卫生、减少的唾液流量或免疫系统损伤引发的念珠菌属 (*Candida*) 感染。尽管念珠菌属的定植可能无症状,但是大量生长通常导致局部念珠菌病,伴随多种类型的粘膜损伤和症状。

[0008] 改变口腔内微生物群的致病可能性会是在对抗这些病症上令人关注的策略。依此方向,引入益生乳杆菌以部分替换致病微生物为用于控制口腔感染的有前景的方法。然而,与胃肠病变相比,几乎未曾研究将益生菌用于口腔健康应用的用途。目前,极少包含这类保健应用的含益生菌的商业产品在售。

[0009] 来自 BioGaia 的 Prodentis® 为这些产品之一。Prodentis 为含益生菌路氏乳杆菌 (*L. reuteri*) ATCC 55730 菌株的口香糖并且已证实在临床试验中减少牙龈炎 (Twetman

S 等,“Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid(含益生菌路氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 的口香糖对龈沟液中炎性介质水平的短期作用)”. *Acta Odontol Scand*, 2009, 第 67 卷, 第 19-24 页)。已报道此同一菌株路氏乳杆菌 ATCC 55730,对致龋的变形链球菌发挥强大的拮抗活性(Caglar E等,“Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets(通过吸管或片剂摄取益生菌路氏乳杆菌 ATCC 55730 之后的唾液变形链球菌水平和乳杆菌水平)”. *Acta Odontol Scand*, 2009, 第 64 卷, 第 314-318 页)。然而,关于路氏乳杆菌 ATCC 55730 对其它口腔病原体的影响知道得甚少。另外,已从肠而非从口腔中分离路氏乳杆菌,并且未知此菌株是否具有形成生物膜或以其它方式定植此环境以具有长期作用的能力。已显示在模拟口腔条件的试验模型系统中,乳杆菌属 (*Lactobacillus* sp.) 在其对唾液覆盖表面的粘附能力上非常不同(Stamatova I 等,“In vitro evaluation of yoghurt starter lactobacilli and *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion to saliva-coated surfaces(酸奶菌母乳杆菌和鼠李糖乳杆菌 GG 对唾液覆盖表面的粘附的体外评价)”. *Oral Microbiol Immunol*, 2009, 第 24 卷, 第 218 - 223 页)。

[0010] 唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*) K12 为预期用于口腔的另一种商业益生菌。唾液链球菌 (*S. salivarius*) K12 分离自健康儿童的唾液并且已显示其对涉及口臭病因学的多种菌种表现出体外抗微生物活性(Burton JP 等,“Preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodor parameters(益生菌唾液链球菌 K12 对口腔恶臭参数的作用的初步研究)”. *J Appl Microbiol*, 2006, 第 100 卷, 第 754-764 页)。然而,此菌株的有益作用受限于口臭症状的改善。

[0011] 因此益生菌具有在口腔中提供有益效应的可能性,只要鉴定出合适的益生菌株即可。在此尝试中,必须考虑对宿主的假定益处,而言还要考虑菌株的安全性,以及在口腔中可能的不利效应。在考虑口腔乳杆菌的用途时后者取得特别的相关性,这是因为因其偏爱降解硬组织(例如釉质和齿质)的高产酸潜能所致,已将某些口腔乳杆菌描述为致龋的。

[0012] 尽管在口腔益生菌领域有进展,但从上文中清楚的是,需要在口腔中具有广谱益处、不表现不利效应的新益生菌株。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明人已从人口腔微生物群中分离新菌株。此菌株植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CECT 7481 和短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) CECT 7480 表现出多种功能特性,这使它们适于其在口腔健康改善上的应用。这类特性不仅包括对口腔病原体良好的拮抗特性,而且还包括定植口腔的能力以及低酸化特征。如下所论述,亦已发现的是,当两种菌株用于单个组合中时,口腔中的健康益处为显著的。

[0015] 因此,在第一方面,本发明提供包含植物乳杆菌 CECT 7481 和短乳杆菌 CECT 7480 的组合物。

[0016] 显然通过使用保藏菌株作为起始材料,本领域技术人员可常规地通过常见诱变或再分离技术,获得其进一步的突变体或衍生物,所述突变体或衍生物保留或增强形成本发明组合物的菌株的本文所述的相关特征和优点。这类突变体或衍生物可以是已测试修饰的

或天然存在的。本领域技术人员可决定待用于确定菌株的功能活性的适当方法。测定这些活性的可能方法的实例在下文实施例中显示。

[0017] 因此,将“植物乳杆菌 CECT 7481”理解为以保藏号 CECT 7481 保藏在西班牙典型培养物保藏中心 (Spanish Type Culture Collection) 的植物乳杆菌菌株,以及使用保藏菌株作为起始材料,通过现有技术已知的技术获得的突变微生物或衍生微生物,这类突变体或衍生物至少保留菌株植物乳杆菌 CECT 7481 的本文所述的相关特征和优点。将“短乳杆菌 CECT 7480”理解为以保藏号 CECT 7480 保藏在西班牙典型培养物保藏中心的短乳杆菌菌株,以及使用保藏菌株作为起始材料,通过现有技术已知的技术获得的突变微生物或衍生微生物,这类突变体或衍生物至少保留菌株短乳杆菌 CECT 7480 的本文所述的相关特征和优点。

[0018] 本发明的菌株具有以下优点,它们尤其可用作益生菌。

[0019] 现有技术中认为术语“益生菌”为这样的微生物,当以足够的量给予时,其给宿主提供健康益处。益生微生物必需满足与无毒、生存力、粘附和有益效应相关的数个要求。即使在同种的细菌中,这些益生菌特征亦为菌株依赖性的。因此,找到在所有益生菌要求中具有较好性能的那些菌株非常重要。

[0020] 优选将本发明的菌株用作口腔益生菌,即用于增强口腔健康的益生菌。已发现植物乳杆菌 CECT 7481 和短乳杆菌 CECT 7480 对广泛数量的口腔病原体表现出显著的抑制活性,同时对人口腔菌群的常见共生菌株表现出极微的拮抗作用,所述病原体涉及诸如牙龈炎、牙周炎、龋齿和口臭等口腔病症的形成。另外,这两种菌株显示在它们之间无抑制活性,因此允许其组合用于单个配方。此外,如在下文实施例中可见,将这些菌株组合进单个配方(即本发明的组合物)具有以下优势:与单独使用的单个菌株的活性相比,其对口腔病原体表现出更高的拮抗活性。因此,本发明的菌株表现出对口腔病原体的协同活性并且当用于组合时尤其有用。

[0021] 通过拮抗涉及口腔中病理状态的微生物,例如变形链球菌、牙龈卟啉单胞菌、齿垢密螺旋体、栖牙普雷沃氏菌和具核梭杆菌,这些菌株具有将口腔微生物概况改变成更健康概况的作用,从而有益于口腔健康状况。

[0022] 然而,仅菌株拮抗口腔病原体的能力还不足以确保在口腔中的益生作用。本发明组合物的菌株为良好的口腔益生菌,因为除强大的拮抗活性之外,它们亦显示良好的定植口腔的能力。如在下文实施例 7 中可见,植物乳杆菌 CECT 7481 和短乳杆菌 CECT 7480 能够在溶菌酶和过氧化氢存在下生长。有利的是,这些菌株亦具有良好的与口腔组织粘附的能力。

[0023] 此外,本发明的菌株具有以下优点:其显示出强大的形成聚集物的能力。这很重要,因为其使所述菌株能够通过干扰病原体生物膜形成来抑制或减少牙菌斑。已知具有聚集活性的乳酸菌益生菌株可抑制或减少致病菌的牙菌斑形成,所述牙菌斑形成是致病菌彼此之间聚集以及与其它微生物聚集的结果。如上所述,认为口腔病原体在硬口腔组织和软口腔组织上形成的生物膜为口腔病理状态中重要的病原体,其导致牙周炎、龋形成和口臭的发生。在将两种菌株组合进组合物中时,通过本发明菌株的聚集物形成增加,意味着在组合进单个配方时,所述菌株在替换致病菌上更有效。

[0024] 出人意料的是,本发明人亦发现菌株 CECT 7481 和 CECT 7480 显示特别低的酸化

特征。乳杆菌种,如同大多数乳酸菌,因人饮食中糖的发酵所致,以大量产生挥发酸为特征。然而,这些细菌的产酸特性可为口腔中可能的副作用,因为其增加龋齿的风险。事实上,许多乳杆菌已被视为致龋的。因此,形成本发明组合物的乳杆菌属菌株所显示的减少的酸生成,使得它们特别适于口腔中的健康应用。

[0025] 除上述有益特性之外,本发明的菌株亦具有不产生或产生极少量恶臭化合物的优点,所述恶臭化合物例如挥发性硫化物、戊酸、丁酸和腐胺。当在口腔中施用本发明的组合物时,这亦是相关的。

[0026] 此外,正如对应于用作益生菌的菌株,形成本发明组合物的菌株属于具有“安全资格认定”(Qualified Presumption of Safety, QPS) 状态的细菌种类,如通过欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA) 所确定的。另外,本发明人已发现这些菌株未显示对人和 / 或兽医重要的抗生素(氨苄西林、庆大霉素、链霉素、红霉素、四环素、克林霉素和氯霉素) 任何显著的抗药性,因此排除了将抗生素抗药性潜在地传递给致病物种的风险。

[0027] 就以上而言,当与口腔益生菌领域已知的商业菌株相比时,本发明的菌株就与口腔益生菌相关的所有参数而言具有更好的性能。如在下文实施例中所示,与唾液链球菌 K12 和路氏乳杆菌 ATCC 55730 以及短乳杆菌 CD2 相比,新菌株更耐受口腔条件,具有更强的形成聚集物的能力、更高(和更广泛)的拮抗活性、更好的粘附和 / 或更低的酸化特征。用于确定各个所述特性的方案包含在下文中。此外,本发明两种菌株组合进单个组合物通常在相关功能性上产生菌株的协同性能。因此包含两种菌株的组合物特别适于用作口腔益生菌。

[0028] 因在人宿主中发挥数个有益作用,本发明第一方面的组合物可用作药剂。具体而言,当给予包含植物乳杆菌 CECT 7481 和短乳杆菌 CECT 7480 的组合物时,其用于预防和 / 或治疗口腔中的病症,以及优选用于预防和 / 或治疗由口腔中的病原体引起的病症。

[0029] 不希望受理论束缚,形成本发明组合物的菌株的有益作用是改善口腔的微生物概况以得到更健康的口腔菌群的结果。这些有益菌在口腔中的生长诱导环境压力,其抑制常见和 / 或条件性病原微生物的生长。此环境压力来自对粘附位点和营养物的竞争、抗微生物化合物的产生以及通过益生菌聚集的病原体的替换。

[0030] 考虑在内的又一项为益生菌调节免疫反应的能力。已在胃肠结构上广泛研究了益生菌调节免疫的机制。益生菌物种已显示其改变上皮细胞分泌的促炎和抗炎细胞因子的平衡的能力。益生菌亦通过增强先天免疫以及经由 toll 样受体调节的信号转导途径调节病原体诱导的炎症来调节免疫反应。通过益生菌增强局部免疫反应以及全身免疫反应可为益生菌在预防周围粘膜表面上的感染(例如口腔中的那些感染) 方面提供新机会。

[0031] 因此,在第三方面,本发明提供用作药剂的包含本发明菌株的组合物。

[0032] 在第四方面,本发明提供如在本发明第一方面中定义的组合物,其用于在包括人的动物中预防和 / 或治疗由口腔病原体引起的来自口腔的病症。或者,可将此方面阐述为如在本发明第一方面中定义的组合物在制备用于在包括人的动物中预防和 / 或治疗由口腔病原体引起的来自口腔的病症的药剂中的用途。

[0033] 本发明亦提供用于在包括人的动物中预防和 / 或治疗由口腔病原体引起的来自口腔的病症的方法,所述方法包括将如在本发明第一方面中定义的组合物给予有需要的所

述动物。

[0034] 术语“由口腔病原体引起的来自口腔的病症”以其最广泛的含义用于本文，如可在口腔中发现的由诸如细菌、病毒或酵母等口腔病原体引起的任何紊乱或异常。这类病症可以是严重的病理状态以及轻微的病况或不适。“由口腔病原体引起的来自口腔的病症”的说明性非限制性实例为龋齿、牙龈炎、牙周炎、念珠菌病、疱疹和溃疡，以及口臭、染色牙、敏感牙等。

[0035] 在本发明第四方面的一个实施方案中，将所述组合物用于治疗 and / 或预防牙菌斑相关的病症。优选所述牙菌斑相关的病症选自龋齿、敏感牙、牙龈炎和牙周炎。

[0036] 在本发明第四方面的另一个实施方案中，将所述组合物用于治疗 and / 或预防口臭。

[0037] 在本发明第四方面的又一个实施方案中，将所述组合物用于治疗 and / 或预防念珠菌病。

[0038] 可将包含本发明菌株的根据本发明的组合物配制成可食用、美容用或药物制品。除本发明的菌株之外，所述组合物可包含一种或多种其它活性剂和 / 或美容上可接受的赋形剂（在美容用组合物的情况下）、药学上可接受的赋形剂（在药物组合物的情况下）或适当的可食用成分（在可食用组合物的情况下）。在本发明的具体实施方案中，本发明的组合物进一步包含一种或多种活性剂。优选另外的一种或多种活性剂为对形成本发明组合物的菌株无拮抗性的其它益生菌。更优选另外的一种或多种活性剂适于治疗和 / 或预防口臭、念珠菌病、龋齿、敏感牙和 / 或牙周病。根据配方，可将菌株作为纯化的细菌、作为细菌培养物、作为细菌培养物的部分、作为已后处理的细菌培养物添加，以及单独添加或与合适的载体或成分一起添加。亦可添加益生元。

[0039] 所述组合物可呈固体、液体或气体形式，并且可尤其呈散剂、片剂、薄膜制剂、溶液剂、气雾剂、颗粒剂、锭剂、丸剂、混悬剂、乳剂、胶囊剂、糖浆剂、液体剂、酏剂、浸膏、酊剂或流浸膏形式或者呈特别适于口服给予的形式。

[0040] 在其它方面，本发明提供包含本发明的组合物连同药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在这点上，所述药物制品可以任何合适的形式制备，所述形式不会负面地影响形成本发明组合物的菌株的生物利用度。鉴于所述组合物的特定目的来选择赋形剂和最适于配制的方法，在制药工艺学领域技术人员的范围之内。

[0041] 本文所用术语“药学上可接受的”是指这样的化合物、材料、组合物和 / 或剂型，其在合理医学判断的范围内，适于与受试者（人或非人动物）的组织接触使用，而无过度的毒性、刺激、变应性应答或其它问题或并发症，与合理的益处 / 风险比率相称。从与配方的其它成分相容的意义上而言，各载体、赋形剂等亦必须为“可接受的”。合适的载体、赋形剂等可在标准制药课本中找到。

[0042] 本发明的另一个方面提供包含本发明的组合物连同美容上可接受的赋形剂的美容用组合物。在预防和 / 或治疗由致病菌引起的口腔病症中，将本发明的组合物用于改善和 / 或预防由这些病症产生的症状。这类症状包括但不限于口腔异味和染色牙。

[0043] 术语“美容上可接受的”是指这样的化合物、材料、组合物和 / 或剂型，其在合理医学判断的范围内，适于与人皮肤接触使用，而无过渡毒性、不相容性、不稳定性和变应性应答等。从与美容用配方的其它成分相容的意义上而言，各“美容上可接受的”载体、赋形剂

等亦必须为“可接受的”。用于美容用配方的合适的载体、赋形剂等可在标准课本中找到。

[0044] 本发明的菌株亦可包含在多种可食用制品之内，例如乳制品、酸奶、凝乳、乳酪（例如酸奶酪（quark）、奶油，经加工的、软的或硬的）、发酵乳、奶粉、基于奶的发酵制品、冰淇淋、基于发酵谷类的制品、基于奶的粉、饮料、调味品和宠物食品。术语“可食用制品”以其最广泛的含义用于本文，包括可被动物摄取的以任何形式呈现的任何类型的制品，但不包括美容用制品、药物制品和兽医制品。其它可食用制品的实例为肉制品（例如肝酱、法兰克福香肠和意大利腊肠或肉涂味品（meat spread）、巧克力涂味品、馅料（例如松露、奶油）和糖霜、巧克力、糖果（例如焦糖、糖果、软糖或太妃糖）、烘焙食品（蛋糕、糕点）、酱汁和汤、果汁和咖啡增白剂。用于动物食品的饲料亦包含在本发明的范围之内。本发明的组合物亦可用作其它食品中的成分。尤其令人关注的可食用制品为功能性食品和婴儿配方食品。

[0045] 因此，在本发明的另一个方面，提供包含本发明的组合物连同其它可食用成分的可食用组合物。

[0046] 术语“可食用成分”是指适于动物食用（即用作食物）的成分，所述动物优选但不限于人、家畜或宠物。

[0047] 常常将益生菌组合物例如本文所公开的益生菌组合物视为膳食补充剂。膳食补充剂亦称为食品补充剂或营养补充剂，提供正常饮食中通常未摄取的有益成分。通常将膳食补充剂视为食品，但是有时将它们定义为药物、天然保健产品或营养制品。从本发明的意义上而言，膳食补充剂亦包括营养制品。膳食补充剂通常以“非处方药”（即无需处方）销售。

[0048] 在优选的实施方案中，本发明的组合物为膳食补充剂。

[0049] 如果根据本发明的组合物为膳食补充剂，那么其可原样给予，可与诸如水、酸奶、奶或果汁等合适的可饮用液体混合，或者可与固体或液体食物混合。在此情况下所述膳食补充剂可呈片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂、颗粒剂、散剂、混悬剂、囊剂、软锭剂、糖果剂、条剂（bar）、糖浆剂形式和对应的给予形式，其通常呈单位剂量形式。优选将包含本发明组合物的膳食补充剂以片剂、锭剂、胶囊剂或散剂的形式给予，所述形式以制备膳食补充剂的常规工艺制备。

[0050] 如可从上文得出，意图将包含本发明组合物的制品通过预防或治疗口腔病症或者通过改善来自这些病症的症状，来用于口腔健康应用。因此，本发明的另一个方面提供口腔护理制品，其包含如上所述的组合物，连同药用赋形剂或美容上可接受的赋形剂或其它可食用成分。

[0051] 从本发明的意义上而言，可能良好的是所述组合物为这样的口腔制品，其在常规使用过程中，并非为了全身给予特定治疗剂的目的而被有意吞咽，而是为了口腔活性的目的而使其在口腔中保留足以基本上与所有的牙面和 / 或口腔组织接触的时间。这类制品的非限制性实例为牙膏、洁牙剂、牙粉、局部口腔凝胶剂、口腔清洗剂、假牙制品、口腔喷雾剂、口香糖、牙线或洁牙带。所述口腔组合物可以是单相口腔组合物或者可以是两种或更多种口腔组合物的组合。

[0052] 在一个实施方案中，所述口腔护理制品为口香糖、牙膏、口腔喷雾剂、锭剂或口腔分散片。优选所述口腔护理制品呈锭剂或口腔分散片形式。

[0053] 本发明的口腔护理制品亦可包含其它具口腔活性剂，例如牙齿美白活性物，包括

漂白剂或氧化剂,如过氧化物、过硼酸盐、过碳酸盐、过氧酸、过硫酸盐、金属亚氯酸盐及其组合。在可用于本发明的口腔护理活性物中亦可考虑牙齿颜色修饰物质。所述口腔护理制品可另外包含诸如薄荷脑等调味化合物。

[0054] 优选形成本发明组合物的菌株呈活细胞形式。然而,本发明的菌株亦可呈非活细胞形式,例如含有由植物乳杆菌 CECT 7481 和短乳杆菌 CECT 7480 产生的有益因子的灭活培养物或组合物。这可包括热灭活的微生物或者通过暴露给改变的 pH、超声处理、辐照或经受压力来灭活的微生物。由于非活细胞制品制备更简单,因此可容易地将细胞并入商业产品中并且储存要求远不如活细胞受限。

[0055] 当以本发明组合物的形式使用时,菌株可处于适于预期用途的任何浓度比。例如,菌株可处于包括在 3:1 和 1:3 之间的浓度比(植物乳杆菌 CECT 7481:短乳杆菌 CECT 7480)。优选浓度比为 1:1。另外,本发明的菌株以对所需用途有效的量包含在组合物中。

[0056] 本文所用术语“有效量”,对于组合物中的每种菌株而言为这样的菌落形成单位(cfu)的量,其在合理医学判断的范围内高到足以在正方向上显著改善待治疗的病况,并且低至足以避免严重的副作用(处于合理的益处/风险比率)。所述益生微生物的有效量可由本领域技术人员确定,并且可随待实现的具体目标、正被治疗患者的年龄和身体状况、潜在病症的严重性以及最终配方而改变。例如,在口腔健康制品中,一种或多种菌株以约 10^5 cfu/g-约 10^{12} cfu/g 的量存在,优选以约 10^7 cfu/g-约 10^{11} cfu/g 的量存在。将术语“菌落形成单位”(“cfu”)定义为如通过在琼脂平板上的微生物学计数所显示的细菌细胞的数量。在具体的实施方案中,本发明的组合物为包含 10^7 - 10^{10} cfu/g 的口腔护理制品。

[0057] 膳食补充剂通常以范围为 10^5 - 10^{12} cfu/g 的量含有益生菌株。在具体的实施方案中,本发明的组合物为包含 10^7 - 10^{10} cfu/g 的膳食补充剂。

[0058] 通过在合适培养基中以及在合适条件下培养细菌来制备本发明的菌株。所述菌株可单独培养以形成纯培养物,或者作为混合培养物与其它微生物一起培养,或者通过单独培养不同类型的细菌并随后以所需比例将它们组合。培养之后,将细胞悬液回收并原样使用或者以所需方式处理(例如通过浓缩或冷冻干燥),以进一步用于产品的制备。有时使益生菌制备物经过固定化或包裹过程以增进保质期。用于细菌固定化或包裹的数种技术为本领域已知的。在具体的实施方案中,将形成本发明组合物的部分的菌株作为包裹化细菌并入口腔护理制品中。

[0059] 如对本领域技术人员而言显而易见的是,植物乳杆菌 CECT 7481 和短乳杆菌 CECT 7480 不仅在单个组合物中组合时有效,而且亦在独自使用或者在同时给予、序贯给予或在某一时期后分别给予的两种不同的组合物中使用时有效。此外,本领域技术人员应理解的是,可指定将一种菌株与另一种菌株一起用于口腔健康,以预防或治疗口腔病症,尤其是由口腔病原体产生的病症,更优选牙菌斑相关的病症和/或口臭和/或念珠菌病。

[0060] 因此,本发明的又一个方面提供植物乳杆菌 CECT 7481。

[0061] 最后,本发明的另一个方面提供短乳杆菌 CECT 7480。

[0062] 本发明的菌株在本文中第一次描述并因此为新的。如图 1 所示,与诸如植物乳杆菌 299v、植物乳杆菌 VSL#3、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) VSL#3 和干酪乳杆菌 DN 114.001 等密切相关的商业乳杆菌菌株相比,两种菌株(植物乳杆菌 CECT 7481 和短乳杆菌 CECT 7480)均具有不同的脉冲场凝胶电泳图谱。

[0063] 现有技术某些文件描述了包含植物乳杆菌和短乳杆菌菌株的组合物。然而,相对于所述组合物而言,本发明的组合物为新的。

[0064] 具体而言, KR100780030 公开了包含短乳杆菌和植物乳杆菌菌株的发酵豆乳。所公开的菌株分离自朝鲜泡菜(通常来自韩国的存在于发酵蔬菜的膳食)。相比之下,本发明的菌株分离自南美发展中国地区的儿童唾液,该地区不食用朝鲜泡菜。因此,本发明的短乳杆菌(*L. brevis*)和植物乳杆菌(*L. plantarum*)菌株具有完全不同的来源,意味着植物乳杆菌 CECT 7481 或短乳杆菌 CECT 7480 与提及的韩国菌株相同。

[0065] 另一个韩国专利申请 KR100866504 公开了使用植物乳杆菌 P2(微生物保藏号 KCTC11391BP)和/或短乳杆菌 M2(微生物保藏号 KCTC11390BP)的发酵红参。这些菌株分离自人参。再次,所公开的韩国菌株具有与本发明菌株完全不同的来源,因为它们分离自在南美发展中国地区不食用的植物。这使得植物乳杆菌 CECT 7481 或短乳杆菌 CECT 7480 均不可能与提及的韩国菌株相同。

[0066] 国际专利申请 W02005/082157 和 W0 02/39825 再次公开了植物乳杆菌和短乳杆菌菌株的组合。在 W02005/082157 的组合物中公开的短乳杆菌 LBR01 菌株分离自台湾的加芥末的酸泡菜。在 W0 02/39825 的组合物中公开的短乳杆菌 C21 分离自蒙古豆腐。同上,根据这些短乳杆菌菌株完全不同的来源,它们不可能与本发明的菌株相同。此外,所公开的短乳杆菌 LBR01 和短乳杆菌 C21 菌株对公众而言似乎不可获得。

[0067] 另外, W0 2006/080035 公开了包含短乳杆菌 CD2 和非特定植物乳杆菌菌株连同唾液乳杆菌(*L. salivarius*)菌株的妇科组合物。然而,菌株短乳杆菌 CD2 与短乳杆菌 CECT 7480 不同。如表 4 所示,当将菌株植物乳杆菌 CECT 7481 与短乳杆菌 CD2 组合时,就形成聚集物的能力而言观察到拮抗效应。相比之下,植物乳杆菌 CECT 与短乳杆菌 CECT 7480 的组合导致更强的形成聚集物的能力。此外,已证实的是,与商业短乳杆菌 CD2 相比,本发明的短乳杆菌菌株具有显著更低的酸化特征(参见表 5)。因此,短乳杆菌 CECT 7480 不仅与短乳杆菌 CD2 不同,而且还更好地适于口腔健康应用。总的说来,在具有不同作用的同时,本发明的组合与在 W0 2006/080035 中公开的组合不同。

[0068] 最后, W0 02/018542 提到,时常在切达干酪中发现的乳杆菌属菌株包括短乳杆菌和植物乳杆菌菌株,并且专利申请 FR2448865(第 10 页,第 11-17 行)公开了包含植物乳杆菌的组合物,可向所述组合物中添加短乳杆菌。然而,这些文件未公开包含特定短乳杆菌菌株和特定植物乳杆菌菌株的组合物。因此包含特定短乳杆菌菌株(即短乳杆菌 CECT 7480)和特定植物乳杆菌菌株(即植物乳杆菌 CECT 7481)的本发明组合物为新的。

[0069] 在说明书和权利要求各处,不意图单词“包含”及其变动排除其它技术特征、添加物、组分或步骤。在研究本说明书之后,本发明另外的目标、优点和特征对本领域技术人员而言将变得显而易见,或者可通过实施本发明来认识所述目标、优点和特征。此外,本发明涵盖本文所述具体实施方案和优选实施方案的全部可能的组合。下列实施例和附图通过说明的方式提供,并且不意图它们成为本发明的限制。

[0070] 附图简述

[0071] 图 1. 以下菌株的 *Sfi*-I (A, B) 和 *Sma*-I (C, D) 限制的基因组 DNA 的脉冲场电泳图谱: 1, 植物乳杆菌 CECT 7481 (F2096); 2, 植物乳杆菌 299V; 3, 植物乳杆菌 VSL#3; 4, 短乳杆菌 CECT 7480 (I3141); 5, 干酪乳杆菌 VSL#3; 6, 干酪乳杆菌 DN 114.001。M 代表分

子标志物。

实施例

[0072] 下面章节描述了本发明菌株的表征及其关于口腔健康应用的特定益生特征。

[0073] 1. 微生物的分离

[0074] 新菌株 F2096 和 I2141 分离自来自热带南美发展中地区的 0-5 岁儿童的唾液。将唾液溶于 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中, 等分并接种至用 10 μ g/ml 万古霉素 (SIGMA) 补充的 MRS (Man Rogosa Sharp, Sigma-Aldrich Chem, Spain) 琼脂上。在微需氧条件 (5% CO₂) 下于 37°C 培养菌株。一旦生长, 即通过在含 15% 脱脂奶粉的 PBS 0.1X 中冻干来储存分离的菌株。

[0075] 分别将菌株 F2096 和 I3141 鉴定为植物乳杆菌和短乳杆菌 (参见下文章节 2)。两种菌株均保藏在西班牙典型培养物保藏中心 (Universitat de València, Campus de Burjassot, Edif. de Investigación, 46100 Burjassot, València, Spain)。植物乳杆菌 (菌株 F2096) 保藏于 2009 年 1 月 28 日并给予保藏号 7481。短乳杆菌 (菌株 I3141) 保藏于 2009 年 2 月 18 日并给予保藏号 7480。两种保藏的菌株均为活的并且保持与其保藏相关的所有其特征。

[0076] 下文所用菌株 F2096 对应植物乳杆菌 CETC 7481, 菌株 I3141 对应短乳杆菌 CECT 7480。

[0077] 乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) F2019 (后文简称为 *P. acidilactici*)、类干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) I3152 (后文简称为 *L. paracasei*) 和戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) I54 (后文简称为 *P. pentosaceus*) 如上所述分离自人唾液。在 TBS (胰蛋白酶大豆肉汤) 中自商业 BLIS K12[®] 中分离唾液链球菌 K12 并在需氧条件中于 37°C 培养。路氏乳杆菌 ATCC 55730 菌株分离自商业 Reuteri Drops[®], 植物乳杆菌 299v 分离自 Poviva[®], 短乳杆菌 CD2 分离自 Inersan[®], 植物乳杆菌 VSL#3 和干酪乳杆菌 VSL#3 分离自 VSL#3[®], 以及干酪乳杆菌 DN 114.001 分离自 Actimel[®]。所有后面的菌株均在 MRS 上分离, 并且用 5% CO₂ 于 37°C 培养。潜在的致病菌株牙龈卟啉单胞菌 CIP 103683、具核梭杆菌 CIP 104988、齿垢密螺旋体 CIP 103917 和栖牙普雷沃氏菌 CIP 104478T 获自 Institut Pasteur, 并且按照供应商说明书培养。在脑心琼脂 (Brain Heart Agar) 上于 37°C 和 5% CO₂ 下培养临床来源的变形链球菌。菌株的鉴定通过测序来进行。

[0078] 2. 菌株的分类学表征

[0079] 2.1 属和种遗传学鉴定

[0080] A) 方法

[0081] 在含 5% CO₂ 的气氛中, 使本发明的菌株在 MRS 培养基 (pH 6.4) 上于 37°C 生长过夜。将细菌进一步收获、洗涤并重悬浮于预裂解缓冲液 (480 μ l EDTA 50 mM pH 8.0; 120 μ l 溶菌酶 10 mg/ml), 并且进一步于 37°C 孵育 60 min。使用 Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒 (Promega) 提取 DNA。将预处理的细菌以 14000 g 离心 2 min 以去除上清液之后, 接着进行 Promega 的方案。简单说来, 将细菌重悬浮于核裂解溶液中并于 80°C 孵育 5 min, 然后冷却至室温。将细胞裂解物在 RNA 酶溶液于 37°C 孵育 60 min 并通过加入蛋白质沉淀溶液

和高速涡旋来沉淀蛋白质。将样品冷却并以 15000 g 离心 3 min。将含有 DNA 的上清液转移入干净的 1.5 ml 微量离心管 (microfuge tube) 并通过倒转与 600 μ l 异丙醇混合。通过以 15000 g 离心 2 min 并小心倒去上清液来收集 DNA。使用 600 μ l 70% 乙醇通过小心倒转管数次来洗涤 DNA 样品。在以 15000 g 离心 2 min 之后, 通过抽吸去除乙醇。最后, 通过在 65 $^{\circ}$ C 孵育 1h 来将 DNA 沉淀重悬浮于 100 μ l 再水合溶液中。将样品储存于 2-8 $^{\circ}$ C。

[0082] 利用通用引物 Eub27f 和 Eub1492r 通过 PCR 扩增 16S rRNA, 所述引物产生几乎为 16S 全序列的片段 (多于 1000 个核苷酸) (表 1)。然后, 使用试剂盒 Quiaquick (Quiagene) 洗涤如上所述获得的 DNA。

[0083] 利用表1所示引物,用BigDye试剂盒 v. 3.1在Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) 上对每个样品进行四个连续的测序反应。利用DNA序列分析 (DNA Sequence Analysis) v. 5.2 软件 (Applied Biosystems) 构建数据集合和色图谱,并且通过使用Chromas (Technelysium Pty Ltd.) 和BioEdit (Ibis Biosciences) 的目视分析进行核对。

[0084] 属鉴定使用核糖体数据库计划 (Ribosomal Database Project) 工具进行 (Wang Q 等, "Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy (用于将 rRNA 序列快速分入新细菌分类学中的朴素贝叶斯分类器)", *Appl Environ Microbiol*, 2007, 第 73 卷, 第 5261-5267 页)。种鉴定通过将所得序列与来自 RefSeq 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) (通过 BLASTN 的方式) 和来自核糖体数据库计划 (<http://rdp.cme.msu.edu/>, J. R. Cole 等, "The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data (核糖体数据库计划 (RDP-II): 引入 myRDP 空间和质量受控的公开数据)", *Nucl. Acids Res.*, 2007, 第 35 卷, 第 169-172 页) 的已知生物的 16S 序列比较来进行。

[0085] 表 1. 用于扩增 16S 基因和对其进行测序的引物

[0086]

步骤	引物	方向	5' → 3'序列
扩增	Eub27f	正向	GAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID NO: 1)
	Eub1492r	反向	TACGGYTACCTTGTTACGACTT (SEQ ID NO: 2)
测序	27f	正向	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID NO: 3)
	357f	正向	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCCCTA CGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO: 4)
	907r	反向	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT (SEQ ID NO: 5)
	1492r	反向	GGTACCTTGTTACGACTT (SEQ ID NO: 6)

[0087] B) 结果

[0088] RDP（核糖体数据库计划）工具将菌株 F2096 鉴定为属于植物乳杆菌种，将菌株 I3141 鉴定为属于植物乳杆菌种。

[0089] 2.2 菌株基因分型

[0090] A) 方法

[0091] 通过基因组消化和脉冲场凝胶电泳进行表征。使 F2096 和 I3141 菌株经历前述

方案 (Rodas AM 等, "Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications (葡萄酒乳杆菌属菌株的多相研究: 分类学含义)", *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 第 55 卷, 第 197-207 页)。亦将商业菌株植物乳杆菌 299V、植物乳杆菌 VSL#3、干酪乳杆菌 VSL#3 和干酪乳杆菌 DN 114.001 包含在测定中作为对照菌株。使所有菌株生长在 MRS 琼脂平板上并于 37 °C、5% CO₂ 孵育 18 h。收集细胞并用 8 ml PET (10 mM Tris pH 7.6、1 M NaCl) 洗涤 3 次, 然后以 6000 rpm 离心 10 min。将沉淀重悬浮于 700 µl 裂解缓冲液 (6 mM Tris、1 M NaCl、0.1 M EDTA、0.5% SLS、0.2 % 脱氧胆酸; 1 mg/ml 溶菌酶; 40 U/ml 变溶菌素; 20 g/ml RNA 酶) 中。向重悬浮的细胞中加入等体积的 1.6% 低熔点琼脂糖 (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA), 并使其在 4 °C 凝固 1 h。将插入物转移到 2 ml 裂解缓冲液 II (0.5 M EDTA pH 9.2、1% N- 十二烷基肌氨酸和 1 mg/ml 链霉蛋白酶) 中并于 50°C 孵育 48 h。然后在室温下用 TE 缓冲液 (10 mM Tris、1 mM EDTA pH 8.0) 洗涤插入物。总 DNA 消化通过 *Sfi*-I 和 *Sma*-I 限制性内切酶 (Roche Diagnostics) 进行。

[0092] 使用 CHEF DRIII 装器 (BioRad Laboratories) 进行脉冲场电泳。将插入物上样至 1% 琼脂糖凝胶 (SeaKem ME 琼脂糖, FMC BioProducts, ME, USA)。表 2 描述了对于各酶的电泳条件。DNA 分子量标志物为 λ 阶梯 PFG 标志物和低范围 PFG 标志物 (New England Biolabs)。电泳之后, 使用溴化乙锭将凝胶染色并利用 GelDoc System (BioRad) 进行 UV。

[0093] 表 2. 用于来自 F2096 和 I3141 菌株的 *Sfi*-I 和 *Sma*-I 限制的基因组 DNA 的电泳条件。

[0094]

酶	组	起始脉冲(秒)	最终脉冲(秒)	时间(小时)
<i>Sfi</i> -I	1	2	10	10
	2	15	25	6
<i>Sma</i> -I	1	0.5	5	16

[0095] B) 结果

[0096] 如图 1 所示, F2096 菌株的脉冲场电泳 *Sfi*-I 和 *Sma*-I 限制图谱与商业植物乳杆菌 299v 和植物乳杆菌 VSL#3 菌株的限制图谱不同, 而 I3141 的限制图谱与密切相关的商业干酪乳杆菌菌株的限制图谱不同。因此, 可推断 F2096 和 I3141 菌株为新菌株。

[0097] 3. 拮抗病原体的能力

[0098] A) 方法

[0099] 为了评估菌株 F2096 和 I3141 是否显示拮抗活性, 在 Oxoid 培养基中使用接种有细菌病原体的琼脂平板进行 Campbell 方案。在通常存在于人口腔中的那些病原体中选择用于本研究的病原体 (参见表 1)。简单说来, 将 F2096、I3141 和乳酸片球菌 (分离自人唾液的另一种菌株) 各自在上述特定条件下培养过夜。孵育之后, 将培养物标准化为 10⁸ cfu/ml 并制备下列混合培养物: F2096 + I3141、F2096 + 乳酸片球菌以及 I3141 + 乳酸片球菌。所述混合培养物含有等量的每种其组成菌株以及与单菌株培养物相同的总菌浓度, 即 10⁸ cfu/ml。将固定体积的每种单菌株培养物和混合培养物均匀地接种并使其在合适温度下于 5% CO₂ 培养箱中生长至汇合。然后, 将均匀尺寸的汇合琼脂平板的圆柱切片分批 (loan-to-loan) 置于病原体平板上并于 37 °C 孵育过夜。

[0100] 第二天, 通过将琼脂平板放在直尺 (flat rule) 上来测定抑菌圈。将菌株的拮抗特

性测定为生长抑制活性 (GIA), 其按照公式 $GIA = (IZD - CD) / 2$ 通过从抑菌圈直径 (IZD) 中减去圆柱直径 (CD) 并将此差值除以 2 来计算。将本发明菌株的抑制能力与商业口腔益生菌株唾液链球菌 K12 和路氏乳杆菌 ATCC 55730 的抑制能力进行比较。

[0101] B) 结果

[0102] 菌株 F2096 和 I3141 的生长抑制活性在表 3 中显示。结果为一式三份试验的平均值。

[0103] 表 3. 对口腔病原体的生长抑制活性

[0104]

	牙龈卟啉 单胞菌(<i>P.</i> <i>gingivalis</i>)	具核梭杆菌 (<i>F.nucleatum</i>)	齿垢密螺旋 体 (<i>T.denticola</i>)	栖牙普雷沃 氏菌 (<i>P.denticola</i>)	变形链球 菌 (<i>S.mutans</i>)	F209 6	I3141
F2096	1	4	4.5	NI	2	-	NI
I3141	NI	7	1	0.5	2	NI	-
F2096 + I3141	1.5	9	4.5	1	4	-	-
F2096 + 乳酸片球 菌(<i>P.acidilactici</i>)	0.5	1	4	NI	1	-	-
I3141 + 乳酸片球菌	NI	5	0.5	NI	NI	-	-
唾液链球菌	NI	NI	1	0.5	1	-	-
路氏乳杆菌	NI	0.5	NI	0.75	1	-	-

NI, 无抑制

[0105] 如通过本结果可见, P2096 和 I3141 均具有对口腔病原体的广泛抑制谱。这对于牙龈卟啉单胞菌而言尤其相关, 因为初步研究显示, 罕有对此病原体的拮抗活性 (未显示结果)。另外, 值得注意的是, 与单独用作单培养物的单个菌株的活性相比, F2096 和 I3141 在混合培养物中的组合显示出对口腔病原体更高的拮抗活性——要注意的是, 混合培养物中各菌株的浓度为单培养物中浓度的一半, 因此组合的拮抗作用高于这些菌株的个体作用的总和。在将各种所述菌株与口腔的另一种栖居者乳酸片球菌组合时, 未出现此协同作用。因此, 本发明的菌株表现出对口腔病原体的协同活性并且在用于单一配方时尤其有用。

[0106] 当与商业益生菌株唾液链球菌 K12 和路氏乳杆菌 ATCC 55730 比较时, 本发明的菌株具有显著更高的拮抗能力。最后, F2096 和 I3141 对彼此或者对常见的人口腔菌群的共生菌株显示出极微的拮抗作用。

[0107] 4. 聚集物的形成

[0108] A) 方法

[0109] 形成聚集物的能力通过监测过夜培养物在 620 nm 处光密度的减少来评价, 所述减少因聚集物和沉淀的形成所致。利用以下公式获得聚集能力百分比 (%AC) 值: $\%AC = (1 - (OD_{tf} / OD_{t0}) / 100$, 其中 OD_{tf} 和 OD_{t0} 分别为最终时间和初始时间的光密度。调整初始时间的 OD 以使所有培养物含有等量的 cfu/ml。通过混合适量的单菌株以获得含 50% 各菌株的所需总 cfu/ml, 来制备组合培养物。

[0110] B) 结果

[0111] 形成聚集物的能力对具有口腔健康应用的益生菌株而言很重要,因为其使所述菌株能够通过干扰病原体生物膜形成来抑制或减少牙菌斑。

[0112] 与对照菌株相比,新菌株及其彼此的组合或者与乳酸片球菌或短乳杆菌 CD2 的组合的聚集能力平均值在表 4 中显示。这些结果清楚地证实,新隔离群显示非常好的聚集活性,显著高于两种商业对照唾液链球菌 K12 和路氏乳杆菌 ATTC 55730。另外,当两种菌株在混合培养物中组合时,通过本发明菌株的聚集物形成增加,意味着所述菌株在组合进单个组合物时在替换致病菌方面更有效。然而,当本发明的菌株分别与具有良好聚集能力的其它菌株(例如乳酸片球菌和短乳杆菌 CD2)组合时,不存在此协同。此外,当本发明的菌株与短乳杆菌 CD2 组合时,观察到拮抗作用,意味着本发明的菌株在与短乳杆菌 CD2 组合时在替换致病菌方面更不有效。

[0113] 表 4. 聚集能力 (%)

[0114]

菌株	聚集能力(%)
F2096	56.00
I3141	22.73
F2096 + I3141	64.73
F2096 + 乳酸片球菌	55.50
I3141 + 乳酸片球菌	23.30
短乳杆菌 CD2	24.70
F2096 + 短乳杆菌 CD2	36.31
I3141 + 短乳杆菌 CD2	28.50
唾液链球菌	16.67
路氏乳杆菌	0.00

[0115] 5. 酸的产生

[0116] A) 方法

[0117] 评价了当生长在用存在于人饮食中的不同糖补充的培养基中时,新菌株产酸的能力。在 18 h 期间使菌株于 37℃ 和 5% CO₂ 下生长在以下培养基中:用 4% 葡萄糖、4% 果糖、4% 乳糖或 4% 蔗糖补充的 MRS 和基本培养基。基本培养基含有 2 g/L 蛋白胨水、2 g/L 酵母提取物、0.1 g/L NaCl、0.04 g/L K₂HPO₄、0.04 g/L KH₂PO₄、0.01 g/L MgSO₄*7H₂O、0.01 g/L CaCl₂*6H₂O、2 g/L NaHCO₃、0.05 g/L 氯化血红素(hemina)(溶于少量 1mol/L NaOH 液滴)、0.5 g/L 半胱氨酸 HCl、0.5 g/L 胆汁盐、2 g/L Tween 80 和 10 μl 维生素 K1(所有组分获自 Sigma-Aldrich Chem, Spain)。用 HCl 将培养物调至 pH 7。在孵育时间结束时测定 pH 和活细胞数量(cfu/ml)。通过下式获得各培养基的产酸值:PA 值 = pH * log(cfu/ml)。

[0118] B) 结果

[0119] 根据上述公式,低值对应高产酸菌株。高产酸对于口腔益生菌而言为不合乎需要的副作用,因为其促进龋齿形成。生长在不同糖上的 F2096 和 I3141 以及数种益生菌对照菌株的产酸值连同对商业菌株获得的值可见于表 5。MM 代表基本培养基。

[0120] 表 5. 酸的产生

[0121]

菌株	MRS	MM+葡萄糖	MM+果糖	MM+乳糖	MM+蔗糖
F2096	32.7	30.34	28.56	31.45	31.67
I3141	42.04	48.28	45.24	58.24	59.12
短乳杆菌 CD2	26.45	31.24	24.24	21.45	24.20
唾液链球菌	41.37	29.69	31.31	28.03	29.85
路氏乳杆菌	36.75	49.19	45.67	34.01	57.39
类干酪乳杆菌	27.38	19.53	8.21	5.98	20.52
戊糖片球菌	24.7	11.34	13.23	12.56	17.45
乳酸片球菌	22.6	15.61	11.10	16.45	22.14

[0122] 这些结果证实,与亦分离自口腔的其它菌株(即类干酪乳杆菌、戊糖片球菌和乳酸片球菌)相比,菌株 F2096 和 I3141 在不同糖中的生长导致显著少的产酸。与商业口腔益生菌唾液链球菌 K12 相比,本发明的菌株亦产酸更少。另外,与已知尤其低产酸的并作为防龋益生菌销售的路氏乳杆菌 ATCC 55730 相比,菌株 I3141 具有更低的酸化特征。亦值得注意的是,与商业短乳杆菌 CD2 相比,本发明的短乳杆菌菌株 I3141 具有显著更低的酸化特征。因此,菌株 F2096 和 I3141 具有低酸化特征,因此适于口腔健康应用。

[0123] 6. 恶臭挥发性化合物的产生

[0124] A) 方法

[0125] 通过感官评价的方法,测定当生长在类似于人饮食的培养基中时新菌株的恶臭挥发性化合物的产生。简单说来,在 48 h 期间,于 37℃ 和 5% CO₂ 下使菌株生长在含有葡萄糖 (0.5% w/v)、果糖 (0.5% w/v)、酵母提取物 (1% w/v)、肉浸膏 (1% w/v)、真核细胞 (200 个细胞 /ml) 和果胶 (0.5% w/v) 的培养基中。所述菌株得到介于 1-5 之间的恶臭值的产生,其中 1 为无气味,5 为非常不良的气味。

[0126] B) 结果

[0127] 恶臭化合物的产生对于口腔益生菌而言非常不合乎需要。然而,当生长在类似于人饮食的培养基中时,本发明的菌株未产生不良气味。

[0128] 表 6. 不良气味的产生

[0129]

菌株	恶臭值
F2096	2
I3141	2
唾液链球菌	2
路氏乳杆菌	3

[0130] 7. 针对口腔条件的存活

[0131] A) 方法

[0132] 通过使其经受口腔应力条件来研究菌株在口腔中的存活。在 F2096、I3141 和路

氏乳杆菌 ATCC 55730 的情况下,将 5×10^7 cfu 各菌株接种在 96 孔培养板中的 200 μ l MRS 培养基上,或者在唾液链球菌 K12 的情况下则接种在胰蛋白酶大豆肉汤 (TSB, Oxoid) 上。用生理浓度的溶菌酶 (Sigma-Aldrich Chem, Spain) 或过氧化氢 (Sigma-Aldrich Chem, Spain) 补充培养物。将平板于 37°C 和 5% CO_2 下孵育 6 小时。通过测定 620 nm 处的光密度来定量细菌生长。通过与用相同菌株在无补充剂的标准 MRS 培养基中达到的生长比较,获得细菌生长值。

[0133] B) 结果

[0134] 如下计算总存活值百分比 (%SV) : $\%SV = [(OD_{tf} - OD_{t0} (\text{有补充剂})) / (OD_{tf} - OD_{t0} (\text{无补充剂}))] \times 100$, 其中 OD 为光密度, 以及 tf 和 t0 分别为最终时间和初始时间。下列值为一式三份结果的平均值:

[0135] 表 7. 针对口腔条件的存活

[0136]

菌株	MRS/TSB	MRS/TSB	MRS/TSB
	溶菌酶 2×10^8 U/ml	H_2O_2 1mM	H_2O_2 2.5mM
F2096	44.41	98.78	62.60
I3141	0.58	42.06	84.28
唾液链球菌	0.50	18.89	28.78
路氏乳杆菌	-17.46	31.32	-8.03

[0137] 与商业菌株唾液链球菌 K12 和路氏乳杆菌 ATCC 55730 相比,新菌株 F2096 和 I3141 显示对口腔应力更好的抗性。

[0138] 8. 与口腔组织粘附的能力

[0139] A) 方法

[0140] 进行了 F2096、I3141 和商业对照菌株对肠内猪舌、Caco-2 细胞 (以模拟齿龈) 和羟磷灰石 (HA) 珠粒 (以模拟牙齿) 的体外粘附测定。将各菌株与 10 μ l/ml 5-[3H] 胸苷 (1.0 μ Ci/ml, Amersham Biosciences, UK) 一起孵育过夜。将所述制备物离心并将沉淀在 PBS 缓冲液中重悬浮至 10^8 cfu/ml 的浓度。用闪烁计数器 (Wallac 1410) 由初始氚信号和上清液氚信号计算并入微生物的氚信号。此数量 (并入生物量的信号) 与培养物中的微生物总数之间的比率得到 cpm/cfu (信号 / 细菌)。

[0141] 通过向 ELISA 板中的猪舌的 1.05×0.5 cm 碎片或预孵育的 Caco-2 细胞或 50 mg HA 珠粒 (80 μ m 直径) 中加入 3.3 ml 放射性标记的 10^8 cfu 各菌株,进行粘附测定。45 min 之后,小心地去除上清液。通过离心回收 HA 珠粒 (连同粘附的细菌)。从 ELISA 孔中取出与粘附细菌一起的舌或 Caco-2 细胞。最后,将复原的细菌裂解以计算比放射性 (cpm/cfu)。

[0142] 所有测定一式三份进行并且结果表示为粘附细菌数量 / cm^2 。由于唾液链球菌对于大部分研究的特性显示出更好的结果 (参见上述结果),因而将此菌株用作粘附测定的对照菌株。

[0143] B) 结果

[0144] 表 8. 与口腔组织的粘附

[0145]

菌株	舌(cfu/cm ²)	Caco-2 (cfu/cm ²)	HA 珠粒(cfu/cm ²)
F2096	8.84E+06	1.00E+06	2.30E+06
I3141	2.70E+06	3.78E+04	5.51E+05
唾液链球菌	1.72E+06	8.83E+04	2.34E+05

[0146] 这些结果证实,在与口腔益生菌株唾液链球菌 K12 相比时,菌株 F2096 和 I3141 具有与口腔组织总体更好的粘附能力。与口腔组织粘附的能力为待用作益生菌的菌株的相关特征,因为在与病原体竞争粘附位点和助于在口腔中的持久性时,其给这些细菌提供竞争优势。因此,显示出与口腔组织良好粘附的菌株有助于替换来自口腔的病原体并且促进更健康的口腔菌群。

[0147] 9. 抗生素敏感性

[0148] A) 方法

[0149] 按照欧洲食品安全局 (EFSA) 给出的技术指导研究菌株 F2096 和 I2141 的抗生素敏感性 (“Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance (用于评估对具有人或兽医重要性的抗生素的细菌抗药性的标准更新)”。*The EFSA Journal*, 2008, 第 732 卷, 第 1-15 页)。用于所述菌株的培养条件如下:于 37 °C 和 5% CO₂ 下,在含有 EFSA 推荐的抗生素浓度的 MRS 琼脂平板的表面上生长。

[0150] B) 结果

[0151] 菌株在含抗生素培养基上的生长在表 9 显示。待如 EFSA 所推荐地测定的各抗生素的浓度以 mg/ml 给出。对于短乳杆菌种,EFSA 未规定抗生素浓度的指定值,因此,短乳杆菌菌株 I3141 中的抗生素抗药性使用对专性异型发酵乳杆菌(此种所属类群)推荐的浓度测定。

[0152] 结果指出,F2096 和 I2141 未显示抗生素抗药性。因此它们适于人使用。

[0153] 表 9. 菌株 F2096 和 I2141 的抗生素抗药性

[0154]

	植物乳杆菌的 EFSA 浓度	F2096 的 生长	专性异型发酵乳杆菌的 EFSA 浓度	I3141 的 生长
氯霉素	2	无	2	无
庆大霉素	16	无	16	无
卡那霉素	64	无	16	无
链霉素	n.r.	无	64	无
红霉素	1	无	1	无
克林霉素	1	无	1	无
奎奴普丁(Quinupristin)/奈	4	无	4	无
福普汀				
四环素	32	无	8	无
氯霉素	8	无	4	无

n.r., EFSA 未推荐

[0155] 参考文献

[0156] Twetman S 等,“Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid(含益生菌路氏乳杆菌的口香糖对龈沟液中炎性介质水平的短期作用)”. *Acta Odontol Scand*, 2009, 第 67 卷, 第 19-24 页。

[0157] Caglar E 等,“Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets(通过吸管或片剂摄取益生菌路氏乳杆菌 ATCC 55730 之后的唾液变形链球菌水平和乳杆菌水平)”. *Acta Odontol Scand*, 2009, 第 64 卷, 第 314-318 页。

[0158] Stamatova I 等,“In vitro evaluation of yoghurt starter lactobacilli and *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion to saliva-coated surfaces(酸奶菌母乳杆菌和鼠李糖乳杆菌 GG 对唾液覆盖表面的粘附的体外评价)”. *Oral Microbiol Immunol*, 2009, 第 24 卷, 第 218 - 223 页。

[0159] Burton JP 等,“Preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodor parameters(益生菌唾液链球菌 K12 对口腔恶臭参数的作用的初步研究)”. *J Appl Microbiol*, 2006, 第 100 卷, 第 754-764 页。

[0160] Wang Q 等,“Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy(用于将 rRNA 序列快速分入新细菌分类学中的朴素贝叶斯分类器)”, *Appl Environ Microbiol*, 2007, 第 73 卷, 第 5261-5267 页。

[0161] Ribosomal Database Project(核糖体数据库计划): <http://rdp.cme.msu.edu/>。

[0162] J.R. Cole 等,“The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data(核糖体数据库计划 (RDP-II): 引入 myRDP 空间和质量受控的公开数据)”, *Nucl. Acids Res.*, 2007, 第 35 卷, 第 169-172 页。

[0163] Rodas AM 等,“Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications(葡萄酒乳杆菌属菌株的多相研究:分类学含义)”, *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 第 55 卷, 第 197-207 页。

[0164] “Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance(用于评估对具有人或兽医重要性的抗生素的细菌抗药性的标准更新)”. *The EFSA Journal*, 2008, 第 732 卷, 第 1-15 页。

[0001]

CPCH1360233P

序 列 表

<110> AB BIOTICS S. A.

<120> 用于口腔健康的益生菌组合物

<130> P1755PC00

<160> 6

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向 Eub27f 引物

<400> 1

gagtttgac ctggctcag

19

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向 Eub1492r 引物

<400> 2

tacggytacc ttgttacgac tt

22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0002]

<223> 正向 27f 引物

<400> 3

agagtttgat cctggctcag

20

<210> 4

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向 357f 引物

<400> 4

cgcccgccgc gccccgcgcc cgcccgccgc ccccccccc cctacgggag gcagcag

57

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向 907r 引物

<400> 5

ccgtcaattc ctttgagttt

20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向 1492r 引物

<400> 6

ggttaccttg ttacgactt

19

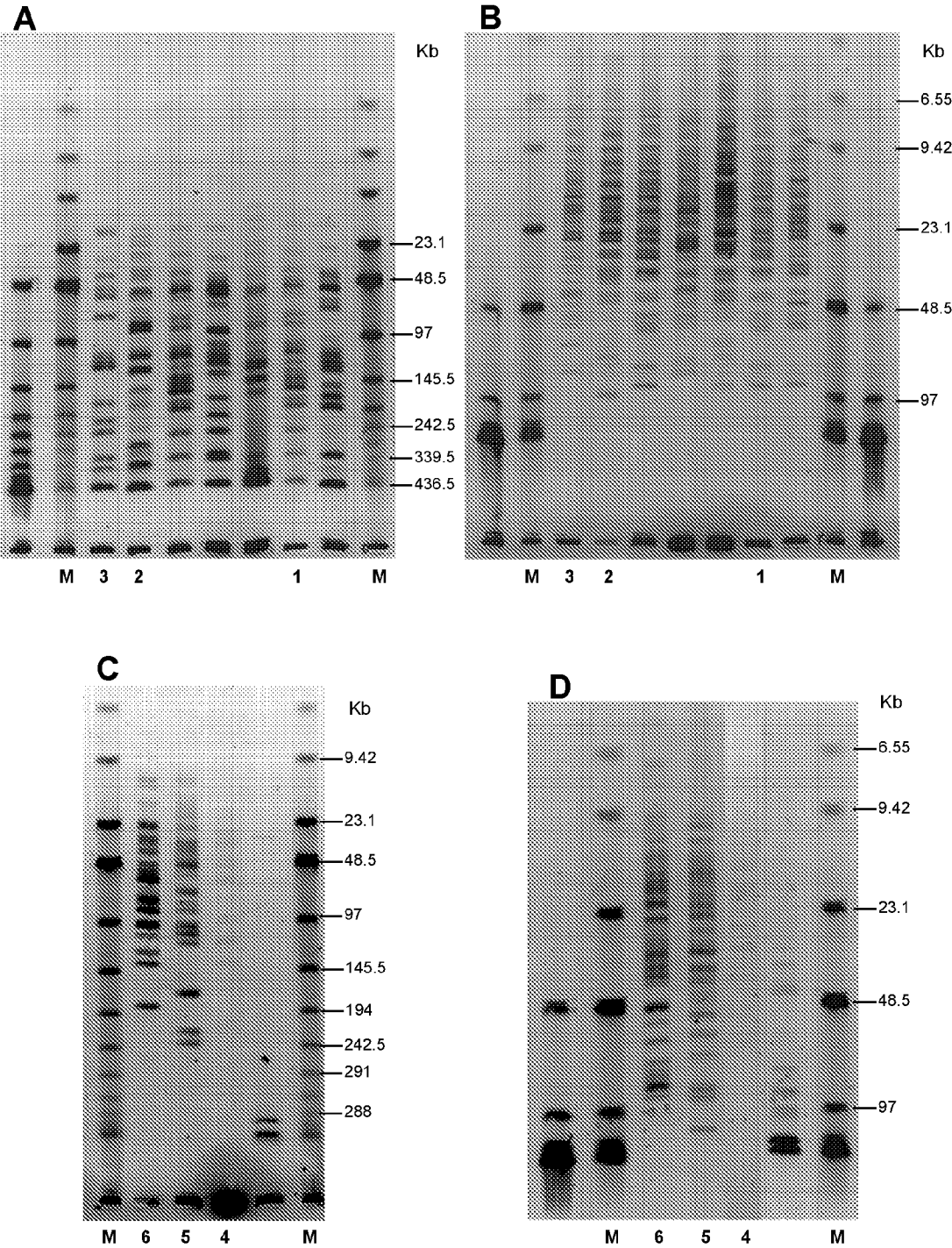


图 1