



(10) 授权公告号 CN 108603162 B

(45) 授权公告日 2022.06.10

(21) 申请号 201680066260.6

(22) 申请日 2016.09.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108603162 A

(43) 申请公布日 2018.09.28

(30) 优先权数据
10-2015-0130124 2015.09.15 KR
10-2016-0001312 2016.01.06 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2016/009961 2016.09.06

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2017/047962 KO 2017.03.23

(83) 生物保藏信息
KCCM11762P 2015.09.01
KCCM11763P 2015.09.01
KCCM11764P 2015.09.01

(73) 专利权人 庆熙大学校产学协力团
地址 韩国京畿道

(72) 发明人 金东铉 韩明珠

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
专利代理师 崔佳佳 徐迅

(51) Int.Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A61K 35/747 (2006.01)
A61K 35/745 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/24 (2006.01)

(56) 对比文件
JP 2012136436 A, 2012.07.19
JP 2011518570 A, 2011.06.30
WO 2014130540 A1, 2014.08.28
CN 104781390 A, 2015.07.15
JP 2015526085 A, 2015.09.10
CN 104427989 A, 2015.03.18
Gerald W Tannock et al., "Resource partitioning in relation to cohabitation of Lactobacillus species in the mouse forestomach".《The ISME Journal》.2011, 第6卷第927-938页. (续)

审查员 樊艳爽

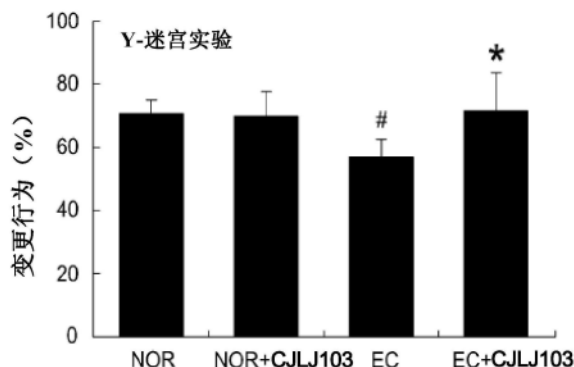
权利要求书2页 说明书22页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

预防、改善或治疗退行性脑病或认知功能障碍的新型乳酸菌和组合物

(57) 摘要

本发明提供了一种新型乳酸菌及其用途,该乳酸菌是从泡菜中分离出来的,因此安全性高,并且它具有各种类型的生物活性如记忆改善活性、紧密连接蛋白表达诱导活性、抗氧化活性、脂多糖(LPS)产量抑制活性和 β -葡萄糖醛酸苷酶抑制活性。本发明提供的新型乳酸菌可以用作预防、改善或治疗退行性脑疾病或认知功能障碍的功能性食品药物材料。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Li Wen et al..“Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes”.《Nature》.2008,第455卷第1109-1113页.

Pan.W..“Lactobacillus johnsonii strain Sun 16S ribosomal RNA gene, partial sequence,Accession No: HQ641209.1”.《GenBank》.2010,第1页.

1. 一种约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsoni*), 所述约氏乳杆菌是以保藏号: KCCM 11763P 保藏的约氏乳杆菌 CJLJ103。

2. 如权利要求1所述的以保藏号: KCCM 11763P 保藏的约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsoni*) CJLJ103, 其特征在于, 所述约氏乳杆菌具有记忆改善活性、紧密连接蛋白表达诱导活性、抗氧化活性、脂多糖 (LPS) 产生抑制活性或 β -葡萄糖醛酸糖苷酶抑制活性。

3. 如权利要求1所述的以保藏号: KCCM 11763P 保藏的约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsoni*) CJLJ103, 其特征在于, 所述约氏乳杆菌利用D-葡萄糖, D-果糖, D-甘露糖, N-乙酰葡萄糖胺, 麦芽糖, 乳糖, 蔗糖或龙胆二糖作为碳源。

4. 一种用于预防或治疗退行性脑疾病或认知功能障碍的药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物包含权利要求1至3中任一项所述的以保藏号: KCCM 11763P 保藏的约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsoni*) CJLJ103或其培养物作为活性成分。

5. 如权利要求4所述的药物组合物, 其特征在于, 所述退行性脑疾病是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病或痴呆。

6. 如权利要求5所述的药物组合物, 其特征在于, 所述痴呆选自下组: 老年性痴呆症、血管性痴呆症、路易体痴呆症、额颞痴呆症、阿尔茨海默病型痴呆症、帕金森病型痴呆症、亨廷顿舞蹈病型痴呆症、克罗伊茨费尔特-雅各布病型痴呆、皮克氏病型痴呆、常压脑积水引起的痴呆和头部损伤引起的痴呆。

7. 一种用于预防或缓解退行性脑疾病或认知功能障碍的食物组合物, 其特征在于, 所述食物组合物包含权利要求1至3中任一项所述的以保藏号: KCCM 11763P 保藏的约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsoni*) CJLJ103或其培养物作为活性成分。

8. 如权利要求7所述的食物组合物, 其特征在于, 所述退行性脑疾病是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病或痴呆。

9. 如权利要求8所述的食物组合物, 其特征在于, 所述痴呆选自下组: 老年性痴呆症、血管性痴呆症、路易体痴呆症、额颞痴呆症、阿尔茨海默病型痴呆症、帕金森病型痴呆症、亨廷顿舞蹈病型痴呆症、克罗伊茨费尔特-雅各布病型痴呆、皮克氏病型痴呆、常压脑积水引起的痴呆和头部损伤引起的痴呆。

10. 一种用于提高记忆力或学习能力的食物组合物, 其特征在于, 所述食物组合物包含权利要求1至3中任一项所述的以保藏号: KCCM 11763P 保藏的约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsoni*) CJLJ103或其培养物作为活性成分。

11. 一种用于预防或治疗退行性脑疾病或认知功能障碍的药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物包含红豆发酵物作为活性成分, 并且所述红豆发酵物是由权利要求1至3中任一项所述的以保藏号: KCCM 11763P 保藏的约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsoni*) CJLJ103发酵的产物。

12. 如权利要求11所述的药物组合物, 其特征在于, 所述退行性脑疾病是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病或痴呆。

13. 如权利要求12所述的药物组合物, 其特征在于, 所述痴呆选自下组: 老年性痴呆症、血管性痴呆症、路易体痴呆症、额颞痴呆症、阿尔茨海默病型痴呆症、帕金森病型痴呆症、亨廷顿舞蹈病型痴呆症、克罗伊茨费尔特-雅各布病型痴呆、皮克氏病型痴呆、常压脑积水引起的痴呆和头部损伤引起的痴呆。

14. 一种用于预防或缓解退行性脑疾病或认知功能障碍的食物组合物, 其特征在于, 所述食物组合物包含红豆发酵物作为活性成分, 并且所述红豆发酵物是由权利要求1至3中任一项所述的以保藏号: KCCM 11763P保藏的约氏乳杆菌CJLJ103 (*Lactobacillus johnsoni*) 发酵的产物。

15. 如权利要求14所述的食物组合物, 其特征在于, 所述退行性脑疾病是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病或痴呆。

16. 如权利要求15所述的食物组合物, 其特征在于, 所述痴呆选自下组: 老年性痴呆症、血管性痴呆症、路易体痴呆症、额颞痴呆症、阿尔茨海默病型痴呆症、帕金森病型痴呆症、亨廷顿舞蹈病型痴呆症、克罗伊茨费尔特-雅各布病型痴呆、皮克氏病型痴呆、常压脑积水引起的痴呆和头部损伤引起的痴呆。

17. 一种用于改善记忆或学习能力的食物组合物, 其特征在于, 所述食物组合物包含红豆发酵物作为活性成分, 并且所述红豆发酵物是由权利要求1至3中任一项所述的以保藏号: KCCM 11763P保藏的约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsoni*) CJLJ103发酵的产物。

预防、改善或治疗退行性脑病或认知功能障碍的新型乳酸菌和组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及新型乳酸菌及其用途,更具体地涉及从(朝鲜)泡菜(kimchi)分离的新型乳酸菌,其具有各种生理活性,如记忆改善活性,诱导紧密连接蛋白表达的活性,抗氧化剂活性,抑制脂多糖(LPS)产生的活性或抑制 β -葡糖醛酸糖苷酶的活性;并且涉及新型乳酸菌用于预防,缓解或治疗退行性脑疾病或认知功能障碍的食用和药用用途。

背景技术

[0002] 随着社会老龄化的加重,阿尔茨海默病、帕金森病、痴呆症等退行性脑疾病患者的数量迅速增加。导致痴呆的最常见的退行性脑疾病--阿尔茨海默病,发展缓慢并逐渐恶化包括记忆力在内的认知功能。尽管尚未发现阿尔茨海默病的确切原因,但已经知道它与衰老密切相关,而且随着老年人数量的增加而增加。

[0003] 帕金森病是由多巴胺神经元丢失引起的神经系统的慢性进行性退行性疾病,表现为肌肉痉挛,运动迟缓(运动缓慢)和姿势不稳定的症状。阿尔茨海默病患者表现出语言障碍,执行功能障碍等痴呆症状,而帕金森病患者表现出,如注意力无法集中和视觉/空间判断失常,执行功能障碍和思维迟缓等痴呆症状。

[0004] 痴呆症可以定义为,生理稳定的人遭受由于各种原因而导致的脑功能损伤并且整体认知能力逐渐恶化的情况,这种情况极大地影响了日常生活活动。这里的认知能力是指记忆,言语,视觉空间能力,判断力和抽象思维等各种智力能力。每种认知能力都与大脑的某个部位密切相关。大约50%的痴呆是阿尔茨海默病型痴呆,20~30%的痴呆是血管型痴呆,还有其他类型的痴呆,如酒精相关性痴呆,路易体痴呆,额颞叶痴呆和帕金森病型痴呆。最近有研究发现包括痴呆在内的各种退行性脑病与肠道通透性综合征或肠道菌群紊乱有关。

[0005] 肠道通透性综合征和痴呆

[0006] 人体的胃肠道由粘液和绒毛组成,它们有效地吸收营养成分,并阻止高分子量病原微生物或由这些微生物产生的毒素的吸收。另外,人体具有能够保护身体免受高分子量的外部抗原侵袭的免疫系统。然而,由于感染了许多致病微生物或毒素、过度的压力、摄入食物(如能够增殖胃肠道中的有害细菌的高脂肪饮食)、过量饮酒、滥用药物(例如抗生素)和其他类似因素,肠道菌群受到干扰,胃肠道免疫系统出现异常,并且紧密连接蛋白的表达受到抑制。如果紧密连接蛋白的表达被抑制,则肠粘膜的紧密连接变得松散,并且由于间隙松弛和免疫系统异常,大分子得以侵入体内。肠通透性综合征也称为漏肠综合征,是指由于形成胃肠道上皮细胞的紧密连接屏障系统不畅通,导致诸如消化不足的食物、致病微生物、毒素等外部致病因子连续导入血液中。当肠道通透性综合征发生时,通常不会被体内吸收的外部抗原进入体内,从而引起溃疡性结肠炎、克罗恩病、肝损伤、肝功能障碍、过敏性疾病(包括哮喘)、特应症、自身免疫性疾病、脂肪泻、消化吸收座疮、加速老化、内毒素血症、肠道感染、湿疹、肠易激综合征、慢性疲劳综合征、牛皮癣、类风湿性关节炎、胰腺功能不全、炎性

关节疾病等。最近有研究表明肠道通透性综合征与帕金森病或衰老引起的痴呆有关。

[0007] 肠道菌群紊乱和痴呆

[0008] 生活在人体胃肠道中的细菌很多。人体约有10万亿个正常细胞,却有100万亿个细菌,比正常细胞大10倍左右。这些细菌可分为有助于人体肠道健康的有益细菌和对人体健康有害的有害细菌。当有益细菌例如乳酸杆菌、双歧杆菌、链球菌、明串珠菌、片球菌、芽孢杆菌等在胃肠道中比有害细菌更占优势时,人体健康得以维持。否则,可能引起肥胖、肠渗透综合征、肝脏疾病、加速老化、肠炎、加速老化、痴呆等疾病。肠道菌群中的有害微生物(如肺炎克雷伯菌、大肠杆菌、奇异变形杆菌等)的增加提高了肠细胞中NF- κ B的活性,这可以显著增加退行性脑病例如阿尔茨海默病、帕金森病和痴呆的风险。

[0009] 益生菌统称为活微生物,可改善宿主(包括人类)胃肠道的微生物环境,并对宿主的健康有益。为了保持益生菌的有效性,它需要具有优异的耐酸性、抗胆汁性和对上皮细胞的粘附性,因为大多数这些益生菌在口服时需要到达小肠并且必须粘附到肠表面。乳酸菌被用作益生菌,因为它们寄居在人体消化系统中时起到分解纤维和复杂蛋白质以制造重要营养素的作用。据报道,乳酸菌具有维持肠道正常菌群、改善肠道菌群、抗糖尿病和抗高脂血症的作用,它还具有抑制癌变、抑制结肠炎以及宿主免疫系统的非特异性活性的作用。在这些乳酸菌中,乳酸杆菌(*Lactobacillus sp.*)是寄居在人体肠部的正常微生物群落的主要成员,并且早已知道它们在维持健康的消化道和阴道环境中是重要的。目前,根据美国公共卫生服务准则,所有保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)的乳酸杆菌均被归类为“生物安全性1级”,它们被认为没有已知的导致人类或动物疾病的潜在风险。同时,参与泡菜发酵的乳酸菌已被报道具有免疫增强作用、抗菌作用、抗氧化作用、抗癌作用、抗肥胖作用、高血压预防作用或便秘预防作用。[Hivak P, Odrska J, Ferencik M, Ebringer L, Jahnova E, Mikes Z.: 益生菌菌株肠球菌膜M-74的一年应用降低了血清胆固醇水平, Bratisl lek Listy 2005, 106(2), 67-72; Agerholm-Larsen L, Bell ML, Grunwald GK, Astrup A.: 益生菌奶制品对血浆胆固醇的影响: 短期干预研究的荟萃分析, Eur J Clin Nutr, 2000, 54(11) 856-860; Renato Sousa, Jaroslava Helper, 张健, Stephen J Lewis 和 Wani O Li: 嗜酸乳杆菌超微粉对大鼠体重和瘦素表达的影响, BMC 补充和替代药物, 2008, 8(5) 1-8]

[0010] 由于已知乳酸菌的各种生物活性,近来越来越多的研究旨在为人体开发安全和高功能的乳酸菌菌群,并使其成为药品或功能性食品的成分。例如,登记号为10-1476236的韩国专利公报公开了一种用于预防或治疗痴呆的药物组合物,其包含戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌(*Lactobacillus pentosus var. plantarum*) C29 KCCM11291P菌群作为活性成分。韩国专利公报第10-1087972号公开了一种有效预防和治疗痴呆的乳酸菌发酵物的制备方法,该方法包括:(a)在含有牛奶的培养物中接种、培养和发酵选自乳杆菌属(*Lactobacillus sp.*)、肠球菌属(*Enterococcus sp.*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium sp.*)的乳酸菌;(b)从上述发酵物中除去乳酸菌;以及(c)向除去了乳酸菌的发酵液中添加含有丙酮和碳原子数为1~6的醇的溶剂,使分离出的活性成分沉淀。并且,登记号为10-1424547的韩国专利公报公开了一种用于预防或治疗退行性脑病的药物组合物,其包含十全大补汤的发酵乳杆菌 KFRI(韩国食品研究所) 164的乳酸菌发酵物作为活性成分。此外,韩国专利公报第10-2015-0047687号公开了用于预防或改善健忘或促进记忆力的组合物,其包含植物提取物,通过向

植物提取物中添加0.1-10wt%的葡萄糖和0.1-5wt%酵母提取物,远志(*Polygala tenuifolia*),白茯苓和石菖蒲(*Acoris gramineus*)的热水提取物,然后接种培养所得的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)来发酵。

[0011] 然而,现有技术中公开的乳酸菌或由其发酵的产品不足以用作商业治疗,因为它在治疗包括痴呆在内的退化性脑疾病方面不是非常有效。因此,需要筛选出一种乳酸菌,它对脑疾病的治疗效果,和能够改善肠道菌群紊乱和肠道通透性综合征的效果与商业治疗相当,从而开发药品或功能性食品。

发明内容

[0012] 技术问题

[0013] 本发明是在上述背景技术下完成的,本发明的一个目的是提供具有益生菌所需的各种生理活性或功能的新型乳酸菌。

[0014] 本发明的另一个目的是提供一种组合物,其包含新型乳酸菌或其发酵物,并且可用于缓解、预防或治疗退行性脑疾病。

[0015] 技术方案

[0016] 为达到上述目的,本发明的一个实施例是包含SEQ ID NO:2所示的16S rDNA核苷酸序列的约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*),其提供具有记忆改善活性、紧密连接蛋白表达诱导活性、抗氧化活性、脂多糖(LPS)产生抑制活性或 β -葡萄糖醛酸苷酶抑制活性的乳酸菌。

[0017] 为了实现上述目的,本发明的一个实施例提供用于预防或治疗退行性脑疾病或认知功能障碍的药物组合物,其包含对应于约氏乳杆菌的乳酸菌,所述乳酸菌包含SEQ ID NO:2所示的16S rDNA核苷酸序列;该实施例还提供这种乳酸菌的培养物,乳酸菌的裂解物或乳酸菌的提取物作为活性成分。本发明的又一个实施方案提供用于预防或缓解退行性脑疾病或认知功能障碍的食物组合物,其包含对应于约氏乳杆菌的乳酸菌,所述乳酸菌包含SEQ ID NO:2所示的16S rDNA核苷酸序列;该实施例还提供这种乳酸菌的培养物,乳酸菌的裂解物或乳酸菌的提取物作为活性成分。本发明的另一个实施例提供一种用于提高记忆力或学习能力的食物组合物,其包含对应于约氏乳杆菌的乳酸菌,所述乳酸菌包含SEQ ID NO:2所示的16S rDNA核苷酸序列;该实施例还提供这种乳酸菌的培养物,乳酸菌的裂解物或乳酸菌的提取物作为活性成分。

[0018] 为了实现上述目的,本发明的另一个实施例提供了一种用于预防或治疗退行性脑疾病或认知障碍的药物组合物,其包含红豆发酵物或红豆发酵物提取物作为活性成分。另外,本发明的另一个实施例提供一种用于预防或缓解退行性脑疾病或认知功能障碍的食物组合物,其包含红豆发酵物或来自红豆发酵物的提取物。此外,本发明的另一个实施例提供了一种用于改善记忆或学习能力的食物组合物,其包含红豆发酵物或来自红豆发酵物的提取物。在本发明的另一个实施例的组合物中,上述红豆发酵物是用包含SEQ ID NO:2所示的16S rDNA核苷酸序列并对应于约氏乳杆菌的乳酸菌发酵的产物。

[0019] 有益效果

[0020] 本发明的这种乳酸杆菌的菌株是从泡菜分离得到的,因此安全性高,并且具有各种生理活性,例如记忆改善活性、紧密连接蛋白表达诱导活性、抗氧化活性、脂多糖(LPS)生

成抑制活性或 β -葡萄糖醛酸苷酶抑制活性等。相应地,通过将本发明的这种乳酸杆菌菌株的减轻肠渗透性的第一效果和提高学习能力或记忆的第二效果相结合,这种菌株可以被用作减轻或治疗各种疾病的药品或功能性食品的组成成分。

附图说明

[0021] 图1显示了施用约氏乳杆菌CJLJ103对由大肠杆菌K20引起记忆障碍的模型动物的Y-迷宫测试的影响。

[0022] 图2显示了施用约氏乳杆菌CJLJ103对由大肠杆菌K20引起记忆障碍的模型动物的被动回避试验的影响。

[0023] 图3显示了施用约氏乳杆菌CJLJ103对由大肠杆菌K20引起记忆障碍的模型动物的神经生长促进因子的表达水平的影响。

[0024] 发明方式

[0025] 如本文所用,本发明中使用的术语如下定义。

[0026] 如本文所用,术语“认知功能障碍”是指认知功能如记忆程序、认知或解决问题功能不全面的症状或疾病,具体包括工作记忆、注意力和警惕性、语言学习和记忆、视觉学习和记忆、推理和问题解决(即执行功能、处理速度或社会认知)的减退。

[0027] 如本文所用,术语“脑疾病”是指由于破坏的颅神经细胞而在脑中产生的所有类型的疾病。

[0028] 如本文所用,术语“培养物”是指通过在已知的液体培养基或固体培养基中培养微生物而获得的产物,并且因此包括微生物。

[0029] 如本文所用,术语“发酵物”是指通过将原料、发酵主体与微生物一起发酵所得的产物,并且是包括微生物的概念。

[0030] 如本文所用,术语“乳酸菌等”是指乳酸菌,以及乳酸菌的培养物,裂解物或提取物。

[0031] 如本文所用,术语“红豆发酵物等”是指红豆发酵物或发酵物的提取物。

[0032] 如本文所用,术语“药学上可接受的”和“在医学上可接受的”意指既不显著刺激生物体也不抑制所施用的活性物质的生物学活性和特性。

[0033] 如本文所用,术语“预防”是指通过施用本发明的组合物来抑制症状或延缓特定疾病进展的所有行为。

[0034] 如本文所用,术语“治疗”是指通过施用本发明的组合物减轻或有益地改变特定疾病症状的所有行为。

[0035] 如本文所用,术语“减轻”是指至少减少与待治疗的病症有关的参数,例如症状程度的所有行为。

[0036] 如本文所用,术语“施用”是指通过任何合适的方法将本发明的组合物提供给受试者。如本文所用,术语“受试者”是指具有特定疾病的所有动物,包括人,猴,狗,山羊,猪或大鼠,其症状可通过施用本发明的组合物而缓解。

[0037] 如本文所用,术语“药学有效量”是指以适用于任何医学治疗的合理的利益/风险比,足以治疗疾病的量。药物有效量取决于的因素包括受试者疾病的种类、疾病的严重程度、药物的活性、对药物的敏感性、给药时间、给药途径、排泄速率、持续时间、与组合物联用

的治疗方法和药物,以及医学领域已知的其他因素。

[0038] 在下文中,将详细描述本发明。

[0039] 本发明的一个方面涉及一种具有各种生理活性的新型乳酸菌。

[0040] 本发明的一个实施例的乳酸菌是包含SEQ ID NO:2所示的16SrDNA核苷酸序列的约氏乳杆菌,其具有记忆改善活性、紧密连接蛋白表达诱导活性、抗氧化活性、脂多糖(LPS)产生抑制活性或 β -葡糖醛酸糖苷酶抑制活性。约氏乳杆菌是一种从泡菜中分离出来的厌氧菌,对革兰氏染色呈阳性,可在较宽的温度范围和较低的pH下存活,并产生葡萄糖苷酶。此外,约氏乳杆菌利用D-葡萄糖,D-果糖,D-甘露糖,N-乙酰葡萄糖胺,麦芽糖,乳糖,蔗糖,龙胆二糖等作为碳源。另外,约氏乳杆菌优选为约氏乳杆菌CJLJ103(登记号:KCCM11763P)。

[0041] 本发明的一个方面涉及包含特定乳酸菌等作为活性成分的组合。本发明的一个实施例的组合包含由SEQ ID NO:2表示的16S rDNA核苷酸序列,并且还包含对应于约氏乳杆菌的乳酸菌,其培养物,裂解物或提取物作为活性成分。约氏乳杆菌是从泡菜中分离出来的一种厌氧芽孢杆菌,对革兰氏染色呈阳性,在PH值较低的环境中能够在很宽的温度范围内存活并产生葡萄糖苷酶。此外,约氏乳杆菌使用D-葡萄糖,D-果糖,D-甘露糖,N-乙酰葡萄糖胺,麦芽糖,乳糖,蔗糖,龙胆二糖等作为碳源。另外,约氏乳杆菌优选为约氏乳杆菌CJLJ103(登记号:KCCM11763P)。

[0042] 在本发明中,乳酸菌培养物是通过在培养基中培养某种菌株或菌株混合物而产生的。培养基可以选自己知的液体培养基或固体培养基,并且可以是例如MRS液体培养基,MRS琼脂培养基或BL琼脂培养基。

[0043] 本发明的一个实施例的组合可以用于预防、减轻或治疗退行性脑疾病或认知功能障碍,因为乳酸菌等作为活性成分具有多种类型的生理活性,例如记忆力改善活性、紧密连接蛋白表达诱导活性、抗氧化活性、脂多糖(LPS)产生抑制活性或 β -葡糖醛酸糖苷酶抑制活性。退行性脑疾病可以是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病或特别是痴呆。此外,痴呆可以选自老年痴呆症、血管性痴呆症、路易体痴呆症、额颞痴呆症、阿尔茨海默病型痴呆症、帕金森病型痴呆症、亨廷顿病型痴呆症、克罗伊茨费尔特-雅各布病型痴呆症、皮克氏病型痴呆、常压脑积水引起的痴呆和头部损伤引起的痴呆。而且,本发明的一个实施例的组合可以用于改善记忆或学习能力。

[0044] 本发明的另一方面涉及一种组合,包含由乳酸菌等发酵的产物作为其活性成分。本发明另一个实施例中的组合包含红豆发酵物或其提取物。在本发明的另一实施例的组合中,所述红豆发酵物是用对应于约氏乳杆菌的乳酸菌发酵红豆的产物,并且该乳酸菌包含SEQ ID NO:2所示的16SrDNA核苷酸序列。在本发明的另一个实施例的组合中,约氏乳杆菌的技术特征如上所述,因此省略其描述。

[0045] 本发明另一实施例中的组合物的活性成分红豆发酵物具有比乳酸细菌更高的生理活性,并且在用作功能性食品和药物成分方面更有效,因为发酵物同时包含红豆发酵产生的次级代谢物和红豆发酵中使用的乳酸菌。本发明的另一个实施例中的组合可用于预防、缓解或治疗退行性脑疾病或认知功能障碍。退行性脑疾病可以是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病或具体地痴呆。此外,痴呆可以选自老年性痴呆、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞痴呆、阿尔茨海默病型痴呆、帕金森氏病型痴呆、亨廷顿舞蹈病型痴呆、克雅氏病型痴呆、皮克氏病型痴呆、常压脑积水引起的痴呆和头部损伤引起的痴呆。而且,本发明另一

实施例中的组合物可以用于改善记忆或学习能力。

[0046] 在本发明中,所述组合物可以是一种药物组合物、食品添加剂、食品组合物(特别是功能性食品组合物)、饲料添加剂等,这取决于预期用途或方面。另外,作为有效成分的乳酸菌等或红豆发酵物等的含量也可以根据组合物的具体的种类、用途、形态等在宽范围内进行调整。

[0047] 本发明的药物组合物中作为有效成分的乳酸菌等或红豆发酵物等的含量没有特别限制。例如,基于组合物的总重量,其含量可以是0.01-99wt%,优选0.5-50wt%,更优选1-30wt%。另外,本发明的药物组合物中除了活性成分之外,可以进一步含有添加剂,如药学上可接受的载体,赋形剂或稀释剂。可用于本发明药物组合物中的载体、赋形剂和稀释剂包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油。另外,本发明的药物组合物中除了乳酸菌等或红豆发酵物等之外,还可以含有具有预防或治疗退行性脑疾病或认知功能障碍的效果的一种或多种活性成分。本发明中的药物组合物可以制备成用于口服给药的制剂或用于肠胃外给药的制剂,并且可以使用常用的稀释剂或赋形剂如填充剂、增量剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等制备制剂。用于口服给药的固体制剂包括片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂等,并且这样的固体制剂可以通过将活性成分与至少一种赋形剂混合,例如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖或明胶来制备。除了简单的赋形剂外,还可以使用润滑剂如硬脂酸镁或滑石粉。用于口服给药的液体制剂除了常用的简单稀释剂如水和液体石蜡之外,还包括悬浮液、溶液、乳液和糖浆,并且可以含有各种赋形剂,例如润湿剂、调味剂、芳香剂、防腐剂等。用于肠胃外给药的制剂包括无菌水溶液、非水溶液、悬浮液、乳剂、冷冻干燥制剂和栓剂。丙二醇,聚乙二醇,植物油如橄榄油,可注射酯如油酸乙酯等可用作非水溶剂或悬浮剂。作为栓剂的基质,可以使用合成脂肪酸酯、聚乙二醇、吐温61、可可脂、月桂脂肪、甘油明胶等。此外,组合物可以优选根据每种疾病或组分通过本领域已知的合适方法或宾夕法尼亚州伊斯顿的麦克出版公司出版的《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Science)(最新版)中公开的方法配制。根据所需的方法,本发明的药物组合物可以口服或肠胃外施用在包括人在内的哺乳动物。用于肠胃外给药的途径包括皮肤外用、腹膜内注射、直肠内注射、皮下注射、静脉注射、肌内注射、胸腔内注射等。本发明药物组合物的剂量只要是药物有效量就可以,没有特别限制。剂量可以根据患者的体重、年龄、性别、健康状况、饮食、给药时间、给药方式、排泄率和疾病的严重程度而变化。本发明药物组合物的日剂量没有特别限制,但基于活性成分优选为0.1-3000mg/kg,更优选基于活性成分为1-2000mg/kg,并且可以给药一天一次或几次。

[0048] 此外,作为本发明食品组合物中的活性成分的乳酸菌等或红豆发酵物等的含量基于组合物的总重量为0.01-99wt%,优选为0.1-50wt%,更优选为0.5-25wt%,但不限于此。本发明的食品组合物可以是丸剂、散剂、颗粒剂、输液剂、片剂、胶囊剂、液体等的形式,并且食品的具体实例可以包括肉类、香肠、面包、巧克力、糖果、小吃、糕点、比萨饼、拉面、其他面条、食品胶、包括冰淇淋的乳制品、各种汤、饮料、茶、功能水、饮料、酒精饮料、维生素复合物等,并且可以包括一般意义上的所有健康食品。除了活性成分之外,本发明的食物组合物可进一步含有作为附加成分的膳食可接受的载体、各种调味剂或天然碳水化合物。此外,本发

明的食品组合物可以含有各种营养素、维生素、电解质、调味剂、着色剂、果胶酸及其盐、海藻酸及其盐、有机酸、保护胶体状增稠剂、pH调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、醇、用于碳酸饮料的碳酸化剂等。此外,本发明的食物组合物可以含有用于制备天然果汁、果汁饮料和蔬菜饮料的果肉。这些成分可以独立使用或作为混合物使用。上述天然碳水化合物可以包括单糖如葡萄糖和果糖,二糖如麦芽糖和蔗糖,多糖如糊精和环糊精以及糖醇如木糖醇,山梨糖醇和赤藓糖醇。作为调味剂,可以使用天然香味剂,例如奇异果甜蛋白或甜叶菊提取物,或合成调味剂,例如糖精或阿斯巴甜。

[0049] 在下文中,将参照实施例进一步详细描述本发明。然而,应该理解,这些实施例仅仅是为了清楚地说明本发明的技术特征,并不限制本发明的范围。

[0050] 1. 乳酸菌的分离和鉴定

[0051] (1) 从泡菜中分离乳酸菌

[0052] 将中国大白菜泡菜,萝卜泡菜和大葱泡菜各自粉碎,并将粉碎的液体悬浮在MRS液体培养基(MRS肉汤; Difco,美国)中。接下来,收集上清液,转移到MRS琼脂培养基(Difco,美国)中并在37℃下厌氧培养约48小时,然后分离形成菌落的菌株。

[0053] (2) 人粪便中分离乳酸菌

[0054] 将人粪便悬浮于GAM液体培养基(GAM肉汤; Nissui制药,日本)中。然后收集上清液,转移至BL琼脂培养基(Nissui制药,日本),并在37℃下厌氧培养约48小时,然后将形成菌落的双歧杆菌属物种分离出。

[0055] (3) 筛选出的乳酸菌的鉴定

[0056] 分析从泡菜或人粪便中分离的菌株的生理特征和16S rDNA序列,以鉴定菌株的种类,并给菌株命名。下表1列出了从中国大白菜泡菜、萝卜泡菜、大葱泡菜和人类粪便中分离出的乳酸菌的对照编号和菌株名称。

[0057] 表1

编号	菌株名称	编号	菌株名称
1	嗜酸乳酸菌(<i>Lactobacillus acidophilus</i>)CH1	31	清酒乳酸杆菌 CH31
2	嗜酸乳酸菌 CH2	32	约氏乳杆菌 CJLJ103
3	嗜酸乳酸菌 CH3	33	清酒乳酸杆菌 CH33
4	短乳杆菌(<i>Lactobacillus brevis</i>)CH4	34	清酒乳酸杆菌 CH34
5	弯曲乳酸菌(<i>Lactobacillus curvatus</i>)CH5	35	植物乳杆菌 CH35
6	短乳杆菌 CH6	36	旧金山乳酸杆菌(<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>)CH36
7	干酪乳酸菌(<i>Lactobacillus casei</i>)CH7	37	假链状双歧杆菌(<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>)CH37
8	植物乳酸菌(<i>Lactobacillus planantrum</i>)CH8	38	假链状双歧杆菌 CH38
9	清酒乳酸菌(<i>Lactobacillus sakei</i>)CH9	39	青春双歧杆菌(<i>Bifidobacterium adolescentis</i>)CH39
10	弯曲乳酸菌 CH10	40	青春双歧杆菌 CH40
11	清酒乳酸菌 CH11	41	青春双歧杆菌 CH41
12	弯曲乳酸菌 CH12	42	动物双歧杆菌(<i>Bifidobacterium animalis</i>)CH42
13	植物乳酸菌 CH13	43	动物双歧杆菌 CH43
14	发酵乳酸菌(<i>Lactobacillus fermentum</i>)CH14	44	双歧双歧杆菌(<i>Bifidobacterium bifidum</i>)CH44
15	发酵乳酸菌 CH15	45	双歧双歧杆菌 CH45
16	加氏乳酸菌(<i>Lactobacillus gasseri</i>)CH16	46	短双歧杆菌(<i>Bifidobacterium breve</i>)CH46
17	类干酪乳酸菌(<i>Lactobacillus paracasei</i>)CH17	47	短双歧杆菌CH47
18	瑞氏乳酸菌(<i>Lactobacillus helveticus</i>)CH18	48	短双歧杆菌 CH48
19	瑞氏乳酸菌 CH19	49	链状双歧杆菌(<i>Bifidobacterium catenulatum</i>)CH49
20	约氏乳杆菌(<i>Lactobacillus johnsonii</i>)CH20	50	链状双歧杆菌 CH50
21	约氏乳杆菌 CH21	51	齿双歧杆菌(<i>Bifidobacterium dentium</i>)CH51

22	约氏乳杆菌 CH22	52	婴儿双歧杆菌(<i>Bifidobacterium infantis</i>)CH52
23	短乳杆菌 CH23	53	婴儿双歧杆菌 CH53
24	类干酪乳酸菌 CH24	54	婴儿双歧杆菌 CH54
25	泡菜乳酸菌(<i>Lactobacillus kimchi</i>)CH25	55	长双歧杆菌(<i>Bifidobacterium longum</i>)CH55
26	加氏乳酸菌 CH26	56	长双歧杆菌CH56
27	类干酪乳酸菌 CH27	57	长双歧杆菌CH57
28	戊糖乳酸菌(<i>Lactobacillus pentosus</i>)CH28	58	长双歧杆菌CH58
29	戊糖乳酸菌 CH29	59	长双歧杆菌CH59
30	罗伊乳酸菌(<i>Lactobacillus reuteri</i>)CH30	60	长双歧杆菌CH60

[0059] 在表1中显示的菌株中,短乳杆菌CH23是革兰氏阳性厌氧芽孢杆菌,不形成孢子,即使在需氧条件下也能存活。此外,短乳杆菌CH23在10℃至42℃下存活并且是在pH2的条件下稳定2小时的耐酸菌株。此外,短乳杆菌CH23即使在2%氯化钠溶液中也能存活并积极生成葡糖苷酶。此外,为了对短乳杆菌CH23进行化学分类,对其16S rDNA进行了分析,结果表明短乳杆菌CH23具有SEQ ID NO:1的核苷酸序列。短乳杆菌CH23的16S rDNA核苷酸序列是在基因库的BLAST中鉴定的(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),结果未发现具有与短乳杆菌CH23相同的16S rDNA核苷酸序列的短乳杆菌菌株,并且短乳杆菌CH23与短乳杆菌菌株FJ004的16S rDNA序列显示出99%的同源性。

[0060] 在表1中显示的菌株中,约氏乳杆菌CJLJ103是革兰氏阳性厌氧芽孢杆菌,不形成孢子,并且可以在需氧条件下存活。此外,约氏乳杆菌CJLJ103在10℃至45℃的温度下稳定存活,并且是在pH 2的条件下稳定2小时的耐酸菌株。此外,约氏乳杆菌CJLJ103积极产生葡糖苷酶,但不产生β-葡糖醛酸糖苷酶。此外,为了对约氏乳杆菌CJLJ103进行化学分类,分析其16S rDNA,结果显示约氏乳杆菌CJLJ103具有SEQ ID NO:2的核苷酸序列。约氏乳杆菌CJLJ103的16S rDNA核苷酸序列是在基因库的BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中鉴定,结果未发现具有与约氏乳杆菌CJLJ103相同的16S rDNA核苷酸序列的约氏乳杆菌菌株,并且发现约氏乳杆菌CJLJ103与约氏乳杆菌菌株JCM 2012的16S rDNA序列显示出99%的同源性。

[0061] 在表1所示的菌株中,长双歧杆菌CH57是革兰氏阳性厌氧杆菌,不形成孢子,并且在需氧条件下显示非常低的存活力。此外,长双歧杆菌CH57是热不稳定的。此外,长双歧杆菌CH57主动产生葡糖苷酶,但不产生β-葡糖醛酸糖苷酶。另外,为了对长双歧杆菌CH57进行化学分类,分析其16S rDNA,结果显示长双歧杆菌CH57具有SEQ ID NO:3的核苷酸序列。长双歧杆菌CH57的16S rDNA核苷酸序列是在基因库的BLAST中鉴定的(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),结果未发现具有与长双歧杆菌CH57相同的16S rDNA核苷酸序列的长双歧杆菌菌株,并且长双歧杆菌CH57与长双歧杆菌菌株CBT-6的16S rDNA序列显示出99%的同源性。

[0062] 此外,在短乳杆菌CH23、约氏乳杆菌CJLJ103和长双歧杆菌CH57的生理特性中,通过API试剂盒(型号:API 50 CHL;由梅里埃,美国制造),采用糖发酵对其碳源的利用进行分析。下表2显示了分析短乳杆菌CH23的碳源利用的结果;下表3显示了分析约氏乳杆菌CJLJ103的碳源利用的结果;下表4显示了分析长双歧杆菌CH57的碳源利用的结果。在表2、3和4中,“+”表示碳源利用率为正的情况;“-”表示碳源利用率为负的情况;“±”表示碳源利用不明确的情况。如表2、3和4所示,对于一些碳源,短乳杆菌CH23、约氏乳杆菌CJLJ103和长双歧杆菌CH57表现出与同一物种的其他菌株不同的碳源利用。

[0063] 表2

[0064]

碳源	菌株名称		碳源	菌株名称	
	短乳杆菌 ¹¹	短乳杆菌 CH23		短乳杆菌 ¹¹	短乳杆菌 CH23
甘油	-	-	水杨苷	+	+
赤藓糖醇	-	-	纤维二糖	+	-
D-阿拉伯糖	-	-	麦芽糖	+	+
L-阿拉伯糖	+	-	乳糖	+	-
D-核糖	+	+	蜜二糖	-	+
D-木糖	+	+	蔗糖	+	-
L-木糖	-	-	海藻糖	+	-
D-戊五醇	-	-	菊粉	+	-
甲基-β-D-吡喃木糖苷	-	-	松三糖	+	-
D-半乳糖	+	-	蜜三糖	-	-
D-葡萄糖	+	+	淀粉	-	-
D-果糖	+	+	动物淀粉	-	-
D-甘露糖	+	-	木糖醇	-	-
L-山梨糖	-	-	龙胆二糖	+	-
L-鼠李糖	-	-	D-松二糖	+	-
半乳糖醇	+	-	D-来苏糖	-	-
肌醇	-	-	D-塔格糖	+	-
甘露醇	+	-	D-海藻糖	-	-
山梨醇	+	-	L-海藻糖	-	-
α-甲基-D-甘露糖苷	-	-	D-阿拉伯醇	-	-
α-甲基-D-葡萄糖苷	-	-	L-阿拉伯醇	-	-
N-乙酰基-葡萄糖胺	+	±	葡萄糖酸盐	+	±
扁桃苷	+	-	2-葡萄糖酸酐	-	-
熊果苷	+	-	5-葡萄糖酸酐	-	+
秦皮甲素	+	+			

[0065] ¹⁾ Suriasih K., Aryanta WR, MahardikaG, Astawa NM. 巴豆奶牛乳的微生物和化学特性。食品科学和质量管理2012;6:112-22。

[0066] 表3

[0067]

碳源	菌株名称		碳源	菌株名称	
	约氏乳杆菌 21	约氏乳杆菌 CJLJ103		约氏乳杆菌 ²¹	约氏乳杆菌 CJLJ103
甘油	-	-	水杨苷	-	-
赤藓糖醇	-	-	纤维二糖	+	-
D-阿拉伯糖	-	-	麦芽糖	-	+
L-阿拉伯糖	-	-	乳糖	-	+
D-核糖	-	-	蜜二糖	+	-
D-木糖	-	-	蔗糖	+	+
L-木糖	-	-	海藻糖	+	-
D-戊五醇	-	-	菊粉	-	-
甲基-β-D-吡喃木糖苷	-	-	松三糖	-	-
D-半乳糖	-	-	蜜三糖	+	-
D-葡萄糖	-	+	淀粉	-	-
D-果糖	-	+	动物淀粉	-	-
D-甘露糖	+	+	木糖醇	-	-
L-山梨糖	-	-	龙胆二糖	-	+
L-鼠李糖	-	-	D-松二糖	-	-
半乳糖醇	-	-	D-来苏糖	-	-
肌醇	-	-	D-塔格糖	-	-
甘露醇	-	-	D-海藻糖	-	-
山梨醇	-	-	L-海藻糖	-	-
α-甲基-D-甘露糖苷	-	-	D-阿拉伯醇	-	-
α-甲基-D-葡萄糖苷	-	-	L-阿拉伯醇	-	-
N-乙酰基-葡萄糖胺	+	+	葡萄糖酸盐	-	-
扁桃苷	-	-	2-葡萄糖酸酐	-	-
熊果苷	-	-	5-葡萄糖酸酐	-	-
秦皮甲素	-	-			

[0068] ²⁾ Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, Pittet AC, Zwahlen MC, Rouvet M, Altermann E, Barrangou R, Mollet B, Mercenier A, Klaenhammer T, Arigoni F, Schell MA. 益生菌肠道细菌约氏乳杆菌NCC 533的基因组序列。Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Feb 24;101(8):2512-7。

[0069] 表4

[0070]

碳源	菌株名称		碳源	菌株名称	
	长双歧杆菌 a1	长双歧杆菌 CH57		长双歧杆菌 a1	长双歧杆菌 CH57
甘油	±	—	水杨苷	±	—
赤藓糖醇	—	—	纤维二糖	±	±
D-阿拉伯糖	—	—	麦芽糖	—	—
L-阿拉伯糖	—	—	乳糖	—	—
D-核糖	±	—	蜜二糖	—	—
D-木糖	—	—	蔗糖	+	±
L-木糖	—	—	海藻糖	±	—
D-戊五醇	—	—	菊粉	—	—
甲基-β-D-吡喃木糖苷	—	—	松三糖	—	—
D-半乳糖	+	+	蜜三糖	—	—
D-葡萄糖	+	+	淀粉	—	—
D-果糖	+	+	动物淀粉	—	—
D-甘露糖	—	—	木糖醇	—	—
L-山梨糖	—	—	龙胆二糖	—	—
L-鼠李糖	—	—	D-松二糖	—	—
半乳糖醇	—	—	D-来苏糖	—	—
肌醇	—	—	D-塔格糖	—	—
甘露醇	+	—	D-海藻糖	—	—
山梨醇	—	—	L-海藻糖	—	—
α-甲基-D-甘露糖苷	—	—	D-阿拉伯醇	—	—
α-甲基-D-葡萄糖苷	—	—	L-阿拉伯醇	—	—
N-乙酰基-葡萄糖胺	±	—	葡萄糖酸盐	±	—
扁桃苷	—	—	2-葡萄糖酸酐	—	—
熊果苷	±	—	5-葡萄糖酸酐	—	—
秦皮甲素	—	—			

[0071] ³⁾ Lukacova D, Karovucova J, Greifova M, Greif G, Sovcikova A, Kohhajdova Z. 植物乳杆菌和长双歧杆菌的选定益生菌特征的体外测试。食品与营养研究杂志2006; 45: 77-83。

[0072] (4) 乳酸菌的保藏信息

[0073] 本发明人于2015年9月1日向国际保藏机构韩国微生物培养中心(地址:韩国首尔西大门区弘济洞2街45号友林大厦)保藏了短乳杆菌CH23, 登记号KCCM 11762P。此外, 本发明人于2015年9月1日向国际保藏机构韩国微生物培养中心(地址:韩国首尔西大门区弘济洞2街45号友林大厦)保藏了约氏乳杆菌CJLJ103, 登记号KCCM 11763P。此外, 本发明人于2015年9月1日向国际保藏机构韩国微生物培养中心(地址:韩国首尔西大门区弘济洞2街45

号友林大厦)保藏了长双歧杆菌CH57,登记号KCCM 11764P。

[0074] 2. 乳酸菌对减轻肠损伤或肠道通透性影响的评估

[0075] 为了评估从泡菜或人粪便中分离的乳酸菌对减轻肠损伤或内渗透性,测试了乳酸菌的抗氧化剂活性、脂多糖(LPS)生成抑制活性、 β -葡萄糖醛酸酶(有害肠内酶)抑制活性、紧密连接蛋白表达诱导活性和记忆改善活性。

[0076] (1)实验方法

[0077] * 抗氧化活性

[0078] 将DPPH(2,2-二苯基-1-苦基肼基)溶解于乙醇中至0.2mM的浓度以制备DPPH溶液。在0.1ml DPPH溶液中加入乳酸菌悬浮液(1×10^8 CFU/ml)或维生素C溶液(1g/ml),并在37°C下培养20分钟。将培养物以3000rpm离心5分钟,收集上清液。然后测定上清液在517nm处的吸光度,算出乳酸菌的抗氧化活性。

[0079] * 脂多糖(LPS)产生抑制活性

[0080] 从老年受试者中分离出致病菌如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumonia*)和奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)等并进行培养。然后,将致病细菌(分别为 1×10^5 CFU和乳酸菌(1×10^5 CFU)移植到10ml无菌通用厌氧培养基(GAM肉汤; Nissui 制药,日本)中并厌氧培养24小时。

[0081] 接下来,将培养物超声处理约1小时以破坏细菌的外细胞膜,并以 $5000 \times g$ 离心并收集上清液。然后,通过LAL(鲎变形细胞溶解物)测定试剂盒(由Cape Cod Inc.,美国制造)测量上清液中的LPS(脂多糖)(其是典型的内毒素)的含量。另外,为了评估乳酸菌的大肠杆菌增殖抑制活性,将通过如上所述的相同实验获得的培养物稀释1000倍和100000倍并在DHL培养基中培养,然后计数大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌和奇异变形杆菌的数量。

[0082] * β -葡萄糖醛酸酶抑制活性

[0083] 将0.1ml的0.1mM对硝基苯基- β -D-葡萄糖醛酸苷溶液、0.2ml的50mM磷酸缓冲生理食盐水和0.1ml的乳酸菌悬浮液(将乳酸菌培养物悬浮于5ml生理盐水中制备)置于反应器中并进行 β -葡萄糖醛酸糖苷酶酶促反应,并加入0.5ml的0.1mM NaOH溶液以终止反应。接着,将反应溶液以3000rpm离心5分钟,收集上清液。然后测定405nm处的上清液的吸光度。

[0084] * 紧密连接蛋白表达诱导活性

[0085] 从韩国细胞系库获得的Caco2细胞在RPMI 1640培养基中培养48小时,然后将培养的Caco2细胞以 2×10^6 个细胞/孔的密度分配到12孔板的每个孔中。接下来,将各孔用1 μ g的LPS(脂多糖)或1 μ g LPS(脂多糖)和 1×10^4 CFU的乳酸菌的组合处理并培养24小时。接下来,从各孔收集培养的细胞,并通过免疫印迹方法测量细胞中紧密连接蛋白ZO-1的表达水平。

[0086] * 改善记忆活性

[0087] 从韩国细胞系库获得的SH-SY5Y细胞在DMEM培养基中培养,其中添加10%的FBS和1%的抗生素,并以 2×10^6 个细胞/孔的密度分配到12孔板的每个孔。接下来,将与奇异变形杆菌分离的LPS(脂多糖)与乳酸菌(1×10^4 CFU/ml)一起以0.2mg/ml的浓度添加到各孔中并培养,然后通过免疫印迹方法测量NF- κ B(活化的B细胞的核因子 κ -轻链增强剂)抑制活性和 α -突触核蛋白的表达水平。已知NF- κ B是一种通过炎症反应和衰老相关疾病如阿尔茨海默病引起组织损伤的物质,而 α -突触核蛋白被认为是导致帕金森病的物质。

[0088] (2)实验结果

[0089] 测量从泡菜或人粪便分离的乳酸菌的抗氧化活性、脂多糖 (LPS) 产生抑制活性、 β -葡萄糖醛酸苷酶抑制活性和紧密连接蛋白表达诱导活性, 测量结果示于下表5、6和7。如下表5、6和7所示, 弯曲乳杆菌CH5、清酒乳杆菌CH11、短乳杆菌CH23、约氏乳杆菌CJLJ103、假链状双歧杆菌CH38和长双歧杆菌CH57具有优异的抗氧化活性, 强烈的抑制脂多糖 (LPS) 产生活性和 β -葡萄糖醛酸酶抑制活性, 强烈诱导紧密连接蛋白的表达, 强烈抑制NF- κ B活性, 并强烈抑制 α -突触核蛋白的表达。这些乳酸菌具有优良的抗氧化效果, 对抑制与炎症和致癌相关的肠道菌群有害菌的酶活性、抑制肠道菌群有害菌产生的内毒素LPS (脂多糖) 的产生, 诱导表达紧密连接蛋白具有很好的效果。因此, 这些乳酸菌可以改善肠渗透性综合征。此外, 这些乳酸菌可以抑制阿尔茨海默病和帕金森病, 这是由于乳酸菌不仅抑制肠炎微生物内毒素LPS (脂多糖) 的产生, 如肺炎克雷伯菌、大肠杆菌和奇异变形杆菌的内毒素, 这些均与阿尔茨海默病或帕金森病有关, 上述乳酸菌还可以诱导神经变性物质的产生或活性。特别地, 这些乳酸菌有望通过发挥各种功能的协同效应, 例如缓和肠渗透综合征、抑制内毒素的产生以及诱导神经退行性物质的活性或产生等。

[0090] 表5

[0091]

序号	菌株名称	抗氧化活性	β -葡萄糖苷酶抑制活性	紧密连接蛋白表达诱导活性	SH-SY5Y 细胞		IPS 产生的抑制		
					NF- κ B 抑制	α -突触核蛋白抑制	肺炎克雷伯菌	大肠杆菌	奇异变形杆菌
1	嗜酸乳杆菌 CH1	+	+	-	-	-	-	-	-
2	嗜酸乳杆菌 CH2	+	+	-	-	-	+	+	+
3	嗜酸乳杆菌 CH3	+	+	-	-	-	+	+	+
4	短乳杆菌 CH4	+	+	-	++	+	-	+	+
5	玩去乳酸杆菌 CH5	+++	+	++	++	+	+	+	+
6	短乳杆菌 CH6	+	+	-	+	-	-	-	-
7	干酪乳杆菌 CH7	+	+	-	-	-	-	-	-
8	植物乳杆菌 CH8	+	+	-	+	-	+	+	+
9	清酒乳酸杆菌 CH9	-	+	-	-	-	-	-	-
10	弯曲乳酸杆菌 CH10	-	+	-	+	-	-	-	-
11	清酒乳酸杆菌 CH11	+++	+	++	++	++	++	+	+
12	弯曲乳酸杆菌 CH12	-	+	+	+	+	-	-	-
13	植物乳杆菌 CH13	-	+	-	+	-	-	-	-
14	发酵乳杆菌 CH14	-	+	-	-	+	-	-	-
15	发酵乳杆菌 CH15	+++	+	-	-	-	+	+	+
16	加氏乳杆菌 CH16	+	+	-	-	-	+	+	+
17	粪干酪乳杆菌 CH17	+	+	-	+	-	-	-	-
18	瑞氏乳杆菌 CH18	+	+	-	-	-	-	-	-
19	瑞氏乳杆菌 CH19	+	+	-	-	-	-	-	-
20	约氏乳杆菌	+	+	+	+	+	-	-	-

[0092]

表6

[0093]

序号	菌株名称	抗氧化活性	β -葡萄糖醛酸酶抑制活性	紧密连接蛋白表达诱导活性	SH-SY5Y 细胞		LPS 产生的抑制		
					NE- κ B 抑制	α -突触核蛋白抑制	肺炎克雷伯菌	大肠杆菌	奇异变形杆菌
21	约氏乳杆菌 QH21	+	+	+	+	++	+	+	+
22	约氏乳杆菌 QH22	+	+	+	+	+	-	-	-
23	短乳杆菌 QH23	+++	+	++	++	+	++	++	++
24	粪干酪乳杆菌 QH24	+	+	-	-	-	-	-	-
25	泡菜乳酸菌 QH25	+	+	-	-	-	-	-	-
26	加氏乳杆菌 QH26	+	+	-	-	-	-	-	-
27	粪干酪乳杆菌 QH27	+	+	+	+	-	-	-	-
28	戊糖乳杆菌 QH28	+	+	-	+	+	-	-	-
29	戊糖乳杆菌 QH29	+	+	-	-	-	-	-	-
30	罗伊乳杆菌 QH30	+	-	-	-	-	-	-	-
31	清酒乳杆菌 QH31	-	+	+	+	+	-	-	-
32	约氏乳杆菌 C.JLJ103	+++	+	++	++	+++	++	++	+++
33	清酒乳酸杆菌 QH33	+	+	+	-	+	-	-	-
34	清酒乳酸杆菌 QH34	+	+	+	-	+	+	+	+
35	植物乳杆菌 QH35	+	+	+	+	+	+	+	+
36	Sanfrancisco nsis 乳酸菌 QH36	+	+	+	+	+	+	-	-
37	假链状双歧杆菌 QH37	-	+	+	+	+	-	-	-
38	家链状双歧杆菌 QH38	+++	+	++	+	++	+	+	+
39	青春双歧杆菌 QH39	-	+	+	+	+	-	-	-
40	青春双歧杆菌	-	+	+	+	+	+	+	+

[0094] 表7

[0095]

序号	菌株名称	抗氧化活性	β -葡萄糖醛酸酶抑制活性	紧密连接蛋白表达诱导活性	SH-SY5Y 细胞		LPS 产生的抑制		
					NE- x B 抑制	α -突触核蛋白抑制	肺炎克雷伯菌	大肠杆菌	奇异变形杆菌
41	青春双歧杆菌 QH41	+	+	+	+	+	+	+	+
42	动物双歧杆菌 QH42	+	+	-	+	-	-	-	-
43	动物双歧杆菌 QH43	+	+	-	+	-	-	-	-
44	双歧双歧杆菌 QH44	+	+	-	+	-	-	-	-
45	双歧双歧杆菌 QH45	+	+	-	+	-	-	-	-
46	短双歧杆菌 QH46	+	-	-	-	-	-	+	+
47	短双歧杆菌 QH47	+	+	+	++	+	-	-	-
48	短双歧杆菌 QH48	+	+	+	+	+	-	-	-
49	链状双歧杆菌 QH49	+	+	++	+	++	-	-	-
50	链状双歧杆菌 QH50	-	+	-	+	-	-	-	-
51	齿双歧杆菌 QH51	+	-	-	-	-	-	-	-
52	婴儿双歧杆菌 QH52	-	+	-	-	-	-	-	-
53	婴儿双歧杆菌 QH53	-	+	-	+	-	-	-	-
54	婴儿双歧杆菌 QH54	+	+	-	-	-	-	-	-
55	长双歧杆菌 QH55	+	+	+	+	+	-	-	-
56	长双歧杆菌 QH56	+++	+	+	+	+	++	-	-
57	长双歧杆菌 QH57	+++	+	++	+	++	+++	+	++
58	长双歧杆菌 QH58	+	+	+	+	+	+	+	+
59	长双歧杆菌 QH59	+	+	+	+	+	+	+	+
60	长双歧杆菌	+	-	+	-	+	-	-	-

[0096] * 测定抗氧化活性时乳酸菌的最终浓度： 1×10^4 CFU/ml；用于测量 β -葡萄糖醛酸糖苷酶抑制活性和脂多糖 (LPS) 生成抑制活性的乳酸菌浓度： 1×10^4 CFU/ml；测量紧密连接

蛋白表达诱导活性的乳酸菌的浓度： 1×10^4 CFU/ml。

[0097] * 测量乳酸菌各种活性的标准：非常强(+++；> 90%)；强(++；> 60-90%)；弱(+；> 20-60%)；不低于20%(-；<20%)。

[0098] 3.通过使用具有诱发记忆损伤的模型动物来测量乳酸菌对认知能力的改善效果

[0099] (1)选择乳酸菌进行实验以测定改善认知能力的效果

[0100] 从泡菜或人类粪便分离的总共60种类型的乳酸菌中选择以下13种乳酸菌作为实验用乳酸菌，以测量对认知能力的改善效果。

[0101] *嗜酸乳杆菌CH3,弯曲乳酸杆菌CH5,清酒乳杆菌CH11,发酵乳杆菌CH15,约氏乳杆菌CH21,短乳杆菌CH23,约氏乳杆菌CJLJ103,植物乳杆菌CH35,假链状双歧杆菌CH38,青春双歧杆菌CH41,长双歧杆菌CH56,长双歧杆菌CH57,长双歧杆菌CH59

[0102] (2)被动回避实验和结果

[0103] 在分为第一和第二空间的被动回避测试装置中，有一个连接两个空间的闸式门。通过使用光，第一个空间保持明亮，而第二个空间保持黑暗。在保持黑暗的第二个空间的地板上放置电网，在动物移动到黑暗空间的情况下，电网以0.5秒的电流流动3秒。

[0104] 将选择的13种乳酸菌分别以 1×10^{10} CFU/ml的浓度悬浮于生理盐水中，然后将悬浮液给予试验动物(来自Raonbio的5周龄ICR雄性小鼠)的小鼠，以每天0.1ml的剂量(相当于 1×10^9 CFU的乳酸菌)给药3天。另外，每天给对应于正常组和记忆障碍组的小鼠施用0.1ml生理盐水三天。阳性对照组的小鼠每日给予阳性对照药物多奈哌齐(治疗阿尔茨海默病和阿尔茨海默病型痴呆症) $5 \mu\text{mol/kg}$ (体重)三天。每个实验组的小鼠数为9。

[0105] 在施用药物后的第二天，将上述小鼠置于明亮的第一空间中，观察20秒，并且通过打开闸式门而允许其进入保持黑暗的第二个空间。在门打开后60秒没有移动到第二个空间的小鼠被排除在实验之外。一旦小鼠移动到第二个空间，闸式门就会关闭，小鼠通过地板上的网格接受0.5mA的电击3秒钟。小鼠被强迫记得这次冲击。

[0106] 施用药物后第3天，施用乳酸菌或阳性对照药物1小时后，将1mg/kg(体重)溶于蒸馏水中的东莨菪碱(胆碱的阻滞剂药物，诱导认知能力障碍或记忆损伤)在腹部给药，而正常组在腹部给予生理盐水。在东莨菪碱给药30分钟后，通过使用被动避免实验装置进行实验。在观察10秒钟后，打开闸式门，测量至多300秒内每个实验组中的小鼠将四肢全部移入第二空间内所花时间，其结果示于表8中。表8中的结果表明，较长的等待时间意味着在学习被动回避和恢复短期记忆方面有更好的表现。

[0107] 表8

[0108]

组	潜伏时间 (Latency time); 秒
正常组	240.2
只施用东莨菪碱的记忆损害组	22.6
施用东莨菪碱和多奈哌齐的阳性组	66.4
施用东莨菪碱和嗜酸乳杆菌CH3	33.5
施用东莨菪碱和弯曲乳酸杆菌CH5	57.4
施用东莨菪碱和清酒乳酸杆菌CH11	45.0
施用东莨菪碱和发酵乳杆菌CH15	56.7
施用东莨菪碱和约氏乳杆菌CH21	22.4

施用东莨菪碱和短乳杆菌CH23	61.2
施用东莨菪碱和约氏乳杆菌CJLJ103	71.0
施用东莨菪碱和植物乳杆菌CH35	44.6
施用东莨菪碱和假链状双歧杆菌CH38	49.6
施用东莨菪碱和青春双歧杆菌CH41	35.6
施用东莨菪碱和长双歧杆菌CH56	54.9
施用东莨菪碱和长双歧杆菌CH57	62.1
施用东莨菪碱和长双歧杆菌CH59	48.5

[0109] 如表8所示,受试模型动物被施用东莨菪碱以诱导产生认知能力障碍或记忆障碍,当同时施用短乳杆菌CH23、约氏乳杆菌CJLJ103或长双歧杆菌CH57时,与仅施用东莨菪碱引起记忆障碍组相比,潜伏时间显著增加,特别是约氏乳杆菌CJLJ103的施用显示出比商业治疗药物多奈哌齐的施用具有更好的效果。

[0110] (3) Y迷宫实验及结果

[0111] 用于Y型迷宫实验的仪器由三根臂组成,每根臂长42厘米,宽3厘米,高12厘米。由黑色聚乙烯树脂制成的三个臂以两两120度的角度放置。

[0112] 将选择的13种乳酸菌各自以 1×10^{10} CFU/ml的浓度悬浮于生理盐水中,然后将悬浮液施与试验动物(来自Raonbio的5周龄ICR雄性小鼠)小鼠,以每天0.1ml的剂量(相当于 1×10^9 CFU的乳酸菌)给药3天。另外,每天以0.1ml的量施与对应于正常组和记忆障碍组的小鼠生理盐水,施用三天。阳性对照组的小鼠每日施与阳性对照药物多奈哌齐(治疗阿尔茨海默病和阿尔茨海默病型痴呆症) $5 \mu\text{mol/kg}$ (体重),施用三天。每个实验组的小鼠数目是9。

[0113] 在最终施用乳酸菌或阳性对照药物1小时后,溶解于蒸馏水中的东莨菪碱(胆碱的阻滞剂药物,诱导认知能力障碍或记忆损伤)以 1mg/kg (体重)在腹部给药,而正常组在腹部施用生理盐水。给予东莨菪碱半小时后,将小鼠小心地置于Y-迷宫的三个臂A,B或C中的一个,并允许自由移动八分钟,然后将小鼠移动情况记录下来。在该实验中,只有当小鼠的包括尾巴在内的整个身躯进入另一个臂中,或者回到臂中时,该臂才作为一个例子被记录。在小鼠顺序地移动到每个手臂的情况下,分配为一分(实际变更)。变更行为是指小鼠顺序移动到所有三只手臂的情况。如下表9所示,通过以下公式计算实验结果(Sarter, M. 等人,神经病药理学,94,491-495页,1998)。

[0114] 无意识变更(%) = 实际变更/最多变更 $\times 100$

[0115] (最多变更:进入的总次数-2)

[0116] 下表9显示更多的变更行为(单位:%)意味着学习和空间记忆的恢复更好。

[0117] 表9

[0118]

组	变更行为;%
正常组	74.5
只施用东莨菪碱的记忆损害组	49.9
施用东莨菪碱和多奈哌齐的阳性组	65.8
施用东莨菪碱和嗜酸乳杆菌CH3	53.7
施用东莨菪碱和弯曲乳酸杆菌CH5	51.3
施用东莨菪碱和清酒乳酸杆菌CH11	49.0

施用东莨菪碱和发酵乳杆菌CH15	56.2
施用东莨菪碱和约氏乳杆菌CH21	53.5
施用东莨菪碱和短乳杆菌CH23	59.2
施用东莨菪碱和约氏乳杆菌CJLJ103	63.9
施用东莨菪碱和植物乳杆菌CH35	52.4
施用东莨菪碱和假链状双歧杆菌CH38	52.5
施用东莨菪碱和青春双歧杆菌CH41	54.1
施用东莨菪碱和长双歧杆菌CH56	55.2
施用东莨菪碱和长双歧杆菌CH57	60.3
施用东莨菪碱和长双歧杆菌CH59	55.5

[0119] 如表9所示,当与短乳杆菌CH23、约氏乳杆菌CJLJ103或长双歧杆菌CH57一起施用于被东莨菪碱诱导产生认知能力障碍或记忆障碍的模型动物时,与单独施用的记忆障碍组相比,变更行为显著增加,特别是约氏乳杆菌CJLJ103的施用表现出与施用商业治疗药物多奈哌齐相当的优异效果。

[0120] 4. 使用乳酸菌制备红豆发酵物以及测试红豆发酵物对认知能力的改善效果

[0121] (1) 红豆发酵物的制备

[0122] 将约氏乳杆菌CJLJ103在食用TS培养基中培养并以10,000gf离心20分钟以得到约氏乳杆菌CJLJ103生物质。得到的约氏乳杆菌CJLJ103生物质用生理盐水洗涤两次并悬浮于100ml生理盐水中以制备约氏乳杆菌CJLJ103生物质的悬浮液。接下来,将10g细碎的红豆加入90ml的约氏乳杆菌CJLJ103生物质的悬浮液中,然后培养24小时以发酵红豆。接着,将红豆发酵液冷冻干燥,得到红豆发酵物。

[0123] (2) 被动回避实验和结果

[0124] 除了所给药物的种类和数量之外,被动避免实验采用与本文前面所述相同的方式进行,结果列于下表10中。如表10中所示,施用红豆悬浮液或约氏乳杆菌CJLJ103(日剂量: 2×10^8 CFU /小鼠)未能显著改善受损记忆,而红豆发酵物的施用显著改善了受损记忆。

[0125] 表10

组	变更行为; %
正常组	232.5
只施用东莨菪碱的记忆损害组	23.8
施用东莨菪碱和多奈哌齐的阳性组	65.7
施用东莨菪碱和红豆悬浮液	48.5
施用东莨菪碱和约氏乳杆菌CJLJ103	48.0
施用东莨菪碱和红豆发酵物	64.2

[0127] 1) 将红豆粉悬浮于生理盐水中制备红豆悬浮液,基于红豆粉的量,每只小鼠每日剂量为0.2g。

[0128] 2) 约氏乳杆菌CJLJ103在悬浮于生理盐水中后施用,并且基于约氏乳杆菌CJLJ103的量,每只小鼠每日剂量为 2×10^8 CFU。

[0129] 3) 将红豆发酵物悬浮于生理盐水中后施用,红豆发酵物的量为每只小鼠每日0.2g。0.2g的红豆发酵物含约 2×10^8 CFU的约氏乳杆菌CJLJ103。

[0130] (3)Y迷宫实验结果

[0131] 除了给药药物的类型和数量外,以与上文所述相同的方式进行Y-迷宫实验,结果示于表11中。如表11所示,红豆悬浮液或约氏乳杆菌CJLJ103(日剂量: 2×10^8 CFU/小鼠)对小鼠的施用未能显著改善受损记忆,而红豆发酵物的施用显著改善了受损记忆。

[0132] 表11

[0133]	组	变更行为;%
	正常组	75.2
	只施用东莨菪碱的记忆损害组	45.4
	施用东莨菪碱和多奈哌齐的阳性组	63.2
	施用东莨菪碱和红豆悬浮液	52.4
	施用东莨菪碱和约氏乳杆菌CJLJ103	57.6
	施用东莨菪碱和红豆发酵物	63.3

[0134] 1) 将红豆粉悬浮于生理盐水中制备红豆悬浮液,基于红豆粉的量,每只小鼠每日剂量为0.2g。

[0135] 2) 约氏乳杆菌CJLJ103在悬浮于生理盐水中后施用,并且基于约氏乳杆菌CJLJ103的量,每只小鼠每日剂量为 2×10^8 CFU。

[0136] 3) 将红豆发酵物悬浮于生理盐水中后施用,红豆发酵物的施用量为每只小鼠每日0.2g。0.2g的红豆发酵物含约 2×10^8 CFU的约氏乳杆菌CJLJ103。

[0137] 5.通过使用被大肠杆菌引起记忆障碍的模型动物来测定乳酸菌对认知能力的改善效果

[0138] (1)诱发记忆障碍和施药

[0139] 将从记忆受损的动物分离的大肠杆菌K20对小鼠给药,以诱发记忆障碍,通过进行Y迷宫实验和被动回避实验来测定乳酸菌对认知能力的改善效果。

[0140] 更详细地,将大肠杆菌K20施用于动物实验室中饲养一周的小鼠(来自Raonbio的5周龄ICR雄性小鼠),以 1×10^9 CFU的剂量每日一次,给药5天至诱发记忆障碍。同时,正常组给予生理盐水代替大肠杆菌K20。从大肠杆菌K20的最终给药的第二天开始,将乳酸菌悬浮液(悬浮于生理盐水中的浓度为 1×10^{10} CFU/ml的乳酸菌)施用于被诱导至记忆障碍的小鼠,每日剂量为0.1ml(相当于 1×10^9 CFU的乳酸菌),共5天。另外,正常组和记忆障碍诱导组每天给予0.1ml生理盐水5天。此外,将乳酸菌悬浮液(悬浮于生理盐水中的浓度为 1×10^{10} CFU/ml的乳酸菌)以0.1ml的剂量(相当于 1×10^9 CFU的乳酸菌)施用于正常组,施用5天,用作阳性对照组。每个实验组的小鼠数目是9。

[0141] (2)Y迷宫实验

[0142] 在最后一次给药后一小时,将小鼠小心地置于Y形迷宫中的三个臂A,B和C中的一个中,并允许自由移动八分钟,然后将小鼠在臂中的移动情况记录下来。在该实验中,只有当小鼠的包括尾巴在内的整个身躯进入另一个臂中,或者回到臂中时,该臂才作为一个例子被记录。在小鼠顺序地移动到每个手臂的情况下,分配为一分(实际变更)。变更行为是指小鼠顺序移动到所有三只手臂的情况。实验结果按下式进行计算(Sarter,M.等人,神经药理学,94,491-495页,1998)。

[0143] 无意识变更(%)=实际变更/最多变更X100

[0144] (最多变更:进入的总次数-2)

[0145] (3) 被动回避实验

[0146] 在施用药物后的第二天,将上述小鼠置于明亮的第一空间中,观察20秒,然后通过打开闸式门而使其进入保持黑暗的第二空间。在门打开后60秒没有移动到第二个空间的小鼠被排除在结果之外。一旦老鼠移动到第二个空间,闸式门就会关闭,小鼠通过地板上的电网接受0.5mA的电击3秒钟。小鼠被强迫记得这次冲击。

[0147] 最后一次给药后一小时,通过使用被动回避实验装置进行实验。经过10秒的观察,闸式门被打开,测量至多300秒内每个实验组中的小鼠将四肢全部移入第二空间内所花时间。

[0148] (4) 神经生长促进因子的表达水平的测量

[0149] 最后一次给药2小时后,从各实验组的小鼠中分离海马,检测神经生长促进因子的BDNF(脑源性神经营养因子)的表达水平和CREB(Cyclic AMP响应元件-结合)的活性水平。

[0150] (5) 实验结果

[0151] 图1的图片显示了约氏乳杆菌CJLJ103的施用对由大肠杆菌K20引起记忆障碍的模型动物的Y-迷宫实验的影响。图2的图片显示了施用约氏乳杆菌CJLJ103对由大肠杆菌K20菌引起记忆障碍的模型动物的被动回避实验的影响。图3的照片显示了施用约氏乳杆菌CJLJ103对由大肠杆菌K20引起记忆障碍的模型动物的神经生长促进因子的表达水平的影响。

[0152] 图1-3中,“NOR”是指正常组,“NOR+ CJLJ103”是指在正常组中施用约氏乳杆菌CJLJ103的实验组,“EC”是仅施用大肠杆菌K20的记忆障碍诱导组,“EC+ CJLJ103”是指通过施用大肠杆菌K20诱导记忆障碍然后施用约氏乳杆菌CJLJ103的实验组。如图1-3所示,约氏乳杆菌CJLJ103对正常组的给药结果显示并不起显著作用,此时存在少量记忆。另一方面,给被大肠杆菌K20诱导具有记忆障碍的小鼠施用约氏乳杆菌CJLJ103显著改善了记忆,同时改善了海马中BDNF的表达水平以及CREB的活性(磷酸化)水平。

[0153] 6. 通过使用由奇异变形杆菌引起的记忆障碍的模型动物来测量乳酸菌对认知能力的改善效果

[0154] 将从记忆受损的动物分离的奇异变形杆菌K21向小鼠给药以诱导记忆障碍(与帕金森氏病类似的症状),并进行Y-迷宫实验以测量乳酸菌对认知能力的改善效果。

[0155] 更详细地,将奇异变形杆菌K21施用于动物实验室中饲养一周的小鼠(来自Raonbio的5周龄ICR雄性小鼠),以 1×10^9 CFU的剂量每日一次,给药5天至诱发记忆障碍。同时,正常组给予生理盐水代替奇异变形杆菌K21。从奇异变形杆菌K21的最终给药的第二天开始,将乳酸菌悬浮液(悬浮于生理盐水中的浓度为 1×10^{10} CFU/ml的乳酸菌)施用于被诱导记忆障碍了的小鼠,每天0.1ml(相当于 1×10^9 CFU的乳酸菌),给予5天。另外,正常组和记忆障碍诱导组每天施用0.1ml生理盐水5天。此外,将作为阳性对照药物的多奈哌齐(治疗阿尔茨海默病和阿尔茨海默病型痴呆)以每天5mg/kg(体重)的剂量给予阳性对照组,给予5天。每个实验组的小鼠数目是9。

[0156] 在最后一次给药后一小时,将小鼠小心地置于Y形迷宫中的三个臂A,B和C中的一个中,并允许自由移动八分钟,然后将小鼠的移动情况记录下来。在该实验中,只有当小鼠的包括尾巴在内的整个身躯进入另一个臂中,或者回到臂中时,该臂才作为一个例子被记

录。在小鼠顺序地移动到每个手臂的情况下,分配为一分(实际变更)。变更行为是指小鼠顺序移动到所有三只手臂的情况。实验结果如表12所示,实验结果按下式进行计算(Sarter, M. 等人,神经病药理学,94,491-495页,1998)。

[0157] 无意识变更(%)=实际变更/最多变更 $\times 100$

[0158] (最多变更:进入的总次数-2)

[0159] 下表12显示了更多的交替行为(单位:%)意味着学习和空间记忆的恢复更好。

[0160] 表12

组	变更行为;%
正常组	73.8
只施用奇异变形杆菌K21的记忆损害组	46.4
施用奇异变形杆菌K21和多奈哌齐的阳性组	58.6
施用奇异变形杆菌K21和嗜酸乳杆菌CH3	52.5
施用奇异变形杆菌K21和弯曲乳杆菌CH5	50.2
施用奇异变形杆菌K21和清酒乳杆菌CH11	50.7
施用奇异变形杆菌K21和发酵乳杆菌CH15	55.5
施用奇异变形杆菌K21和约氏乳杆菌CH21	54.7
施用奇异变形杆菌K21和短乳杆菌CH23	53.3
施用奇异变形杆菌K21和约氏乳杆菌CJLJ103	62.8
施用奇异变形杆菌K21和植物乳杆菌CH35	54.1
施用奇异变形杆菌K21和假链状双歧杆菌CH38	51.2
施用奇异变形杆菌K21和青春双歧杆菌CH41	55.3
施用奇异变形杆菌K21和长双歧杆菌CH56	54.8
施用奇异变形杆菌K21和长双歧杆菌CH57	57.3
施用奇异变形杆菌K21和长双歧杆菌CH59	54.9

[0162] 如表12所示,将约氏乳杆菌CJLJ103施用于通过奇异变形杆菌K21菌诱导致记忆障碍的模型动物,与商业治疗药物多奈哌齐的施用相比,表现出更好的效果。

[0163] 尽管以上参照实施例描述了本发明,但是本发明的范围不限于这些实施例,并且在不脱离本发明的范围和构思的情况下可以进行各种修改。因此,本发明的保护范围应被解释为包括落入所附权利要求中的所有实施例。

[0001]	序列表		
[0002]	<110>	庆熙大学校产学协力团	
[0003]	<120>	预防、改善或治疗退行性脑病或认知功能障碍的新型乳酸菌和组合物	
[0004]	<130>	PCT-16-132	
[0005]	<150>	KR 10-2015-0130124	
[0006]	<151>	2015-09-15	
[0007]	<150>	KR 10-2016-0001312	
[0008]	<151>	2016-01-06	
[0009]	<160>	3	
[0010]	<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
[0011]	<210>	1	
[0012]	<211>	1132	
[0013]	<212>	DNA	
[0014]	<213>	短乳杆菌 (<i>Lactobacillus brevis</i> CH23的16S rDNA)	
[0015]	<400>	1	
[0016]		agggataaca cttggaaaca ggtgctaata ccgtataaca acaaaatccg catggatttt	60
[0017]		gtttgaaagg tggcttcggc tatcacttct ggatgatccc gcggcgtatt agttagttgg	120
[0018]		tgaggtaaag gcccaccaag acgatgatac gtagccgacc tgagagggtg atcggccaca	180
[0019]		ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccacaat	240
[0020]		ggacgaaagt ctgatggagc aatgcccgct gagtgaagaa gggtttcggc tcgtaaaact	300
[0021]		ctgttgtaa agaagaacac ctttgagagt aactgttcaa gggttgacgg tatttaacca	360
[0022]		gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtaggtggc aagcgttgtc	420
[0023]		cggatttatt gggcgtaaag cgagcgcagg cggtttttta agtctgatgt gaaagccttc	480
[0024]		ggcttaaccg gagaagtga tcggaaactg ggagacttga gtgcagaaga ggacagtgga	540
[0025]		actccatgtg tagcgggtgga atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc	600
[0026]		tgtctagtct gtaactgacg ctgaggctcg aaagcatggg tagcgaacag gattagatac	660
[0027]		cctgstagtc catgccgtaa acgatgagtg ctaagtgtg gagggtttcc gcccttcagt	720
[0028]		gctgcagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtagc accgcaaggt tgaaactcaa	780
[0029]		aggaattgac gggggccgc acaagcgggt gagcatgtgg tttaattcga agctacgcga	840
[0030]		agaaccttac caggtcttga catcttctgc caatcttaga gataagacgt tcccttcggg	900
[0031]		gacagaatga caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag	960
[0032]		tcccgcaacg agcgcacccc ttattatcag ttgccagcat tcagttgggc actctggtga	1020
[0033]		gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat gcccttatg	1080
[0034]		acctgggcta cacacgtgct acaatggacg gtacaacgag tcgcgaagtc gt	1132
[0035]	<210>	2	
[0036]	<211>	1258	
[0037]	<212>	DNA	
[0038]	<213>	约氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH32的16S rDNA)	
[0039]	<400>	2	
[0040]		gtaacttgcc caagagactg ggataacacc tggaacaga tgctaatacc ggataacaac	60
[0041]		actagacgca tgtctagagt ttgaaagatg gttctgctat cactcttga tggacctgcg	120

[0042]	gtgcattagc tagttggttaa ggtaacggct taccaaggca atgatgcata gccgagttga	180
[0043]	gagactgatac ggccacattg ggactgagac acggcccaaaa ctcctacggg aggcagcagc	240
[0044]	agggaaatctt ccacaatgga cgaaagtctg atggagcaac gccgcgtgag tgaagaagg	300
[0045]	tttcggctcg taaagctctg ttggtagtga agaaagatag aggtagtaac tggccttgat	360
[0046]	ttgacggttaa ttccccagaa agtcacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt	420
[0047]	aggtggcaag cgttgtccgg atttattggg cgtaaagcga gtgcaggcgg ttcaataagt	480
[0048]	ctgatgtgaa agccttcggc tcaaccggag aattgcatca gaaactgttg aacttgagt	540
[0049]	cagaagagga gagtggaaact ccatgtgtag cgggtggaatg cgtagatata tggaagaaca	600
[0050]	ccagtggcga aggcggctct ctggtctgca actgacgtg aggcctgaaa gcatgggtag	660
[0051]	cgaacaggat tagataccct ggtagtccat gccgtaaacg atgagtgcata agtgttggga	720
[0052]	ggtttccgcc tctcagtgtc gcagctaacg cattaagcac tccgcctggg gactacgacc	780
[0053]	gcaaggttga aactcaaagg aattgacggg ggcccgacac agcgggtggag catgtgtgtt	840
[0054]	aattcgaagc aacgcgaaga acctaccag gtcttgacat ccagtgcata cctaagagat	900
[0055]	taggtgttcc cttcggggac gctgagacag gtggtgcatg gctgtcgtca gctcgtgtc	960
[0056]	tgagatgttg ggtaaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg tcattagtgt ccatcattaa	1020
[0057]	gttgggcaact ctaatgagac tgccgggtgac aaaccggagg aagggtggga tgacgtcaag	1080
[0058]	tcacatgcc ccttatgacc tgggtacac acgtgtaca atggacggta caacgagaag	1140
[0059]	cgaacctgcg aaggcaagcg gatctcttaa agccgttctc agttcggact gtaggctgca	1200
[0060]	actgcctac acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgga cagtacgccg cggtgaat	1258
[0061]	<210> 3	
[0062]	<211> 1348	
[0063]	<212> DNA	
[0064]	<213> 长双歧杆菌 (Bifidobacterium longumCH57)的16S rDNA)	
[0065]	<400> 3	
[0066]	cgggctttgc ttggtggtga gagtggcgaa cgggtgagta atgcgtgacc gacctgcccc	60
[0067]	atacaccgga atagctcctg gaaacgggtg gtaatgccg atgctccagt tgatcgcagt	120
[0068]	gtcttctggg aaagctttcg cggatatgga tggggtcgcg tcctatcagc ttgacggcgg	180
[0069]	ggtaacggcc caccgtggct tcgacgggta gccggcctga gagggcgacc ggccacattg	240
[0070]	ggactgagat acggcccaga ctctacggg aggcagcagc ggggaatatt gcacaatggg	300
[0071]	cgcaagcctg atgcagcgac gccgcgtgag ggatggaggc cttcgggttg taaacctctt	360
[0072]	ttatcgggga gcaagcgaga gtgagtttac ccgttgaata agcaccggct aactacgtgc	420
[0073]	cagcagccgc ggtaatacgt aggggtgcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagggc	480
[0074]	tcgtaggcgg ttcgtcgcgt ccggtgtgaa agtccatcgc ttaacgggtg atccgcgccg	540
[0075]	ggtacggcgg ggcttgagtg cggtagggga gactggaatt cccggtgtaa cgggtggaatg	600
[0076]	tgtagatata gggaagaaca ccaatggcga aggcaggtct ctgggccgtt actgacgtg	660
[0077]	aggagcgaac gcgtggggag cgaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg	720
[0078]	gtggatgctg gatgtggggc ccgttccacg ggttccgtgt cggagctaac gcgttaagca	780
[0079]	tcccgcctgg gggagtacgg ccgcaaggct aaaactcaaa gaaattgacg ggggcccgca	840
[0080]	caagcggcgg agcatgcga ttaattcgat gcaacgcga gaaccttacc tgggcttcac	900
[0081]	atgttcccga cggtcgtaga gatacggctt cccttcgggg cgggttcaca ggtggtgcat	960
[0082]	ggtcgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt ggggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctc	1020
[0083]	gccccgtgtt gccagcggat tatgccggga actcacgggg gaccgccggg gttaactcgg	1080

[0084]	aggaaggtgg ggatgacgtc agatcatcat gccccttacg tccagggtt cacgcatgct	1140
[0085]	acaatggccg gtacaacggg atgcgacgcg gcgacgcgga gcggatccct gaaaaccggt	1200
[0086]	ctcagttcgg atcgcagtct gcaactcgac tgcgtgaagg cggagtcgct agtaatcgcg	1260
[0087]	aatcagcaac gtcgcggtga atgcgttccc gggccttgta cacaccgcc gtcaagtcac	1320
[0088]	gaaagtgggc agcacccgaa gccggtgg	1348

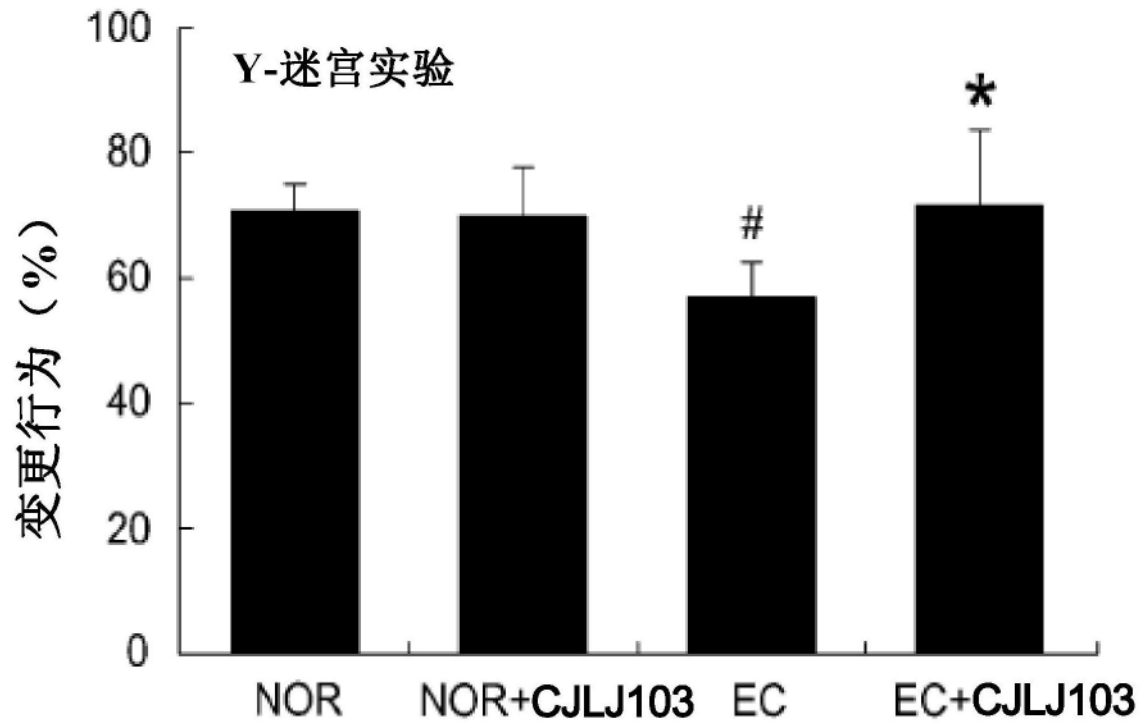


图1

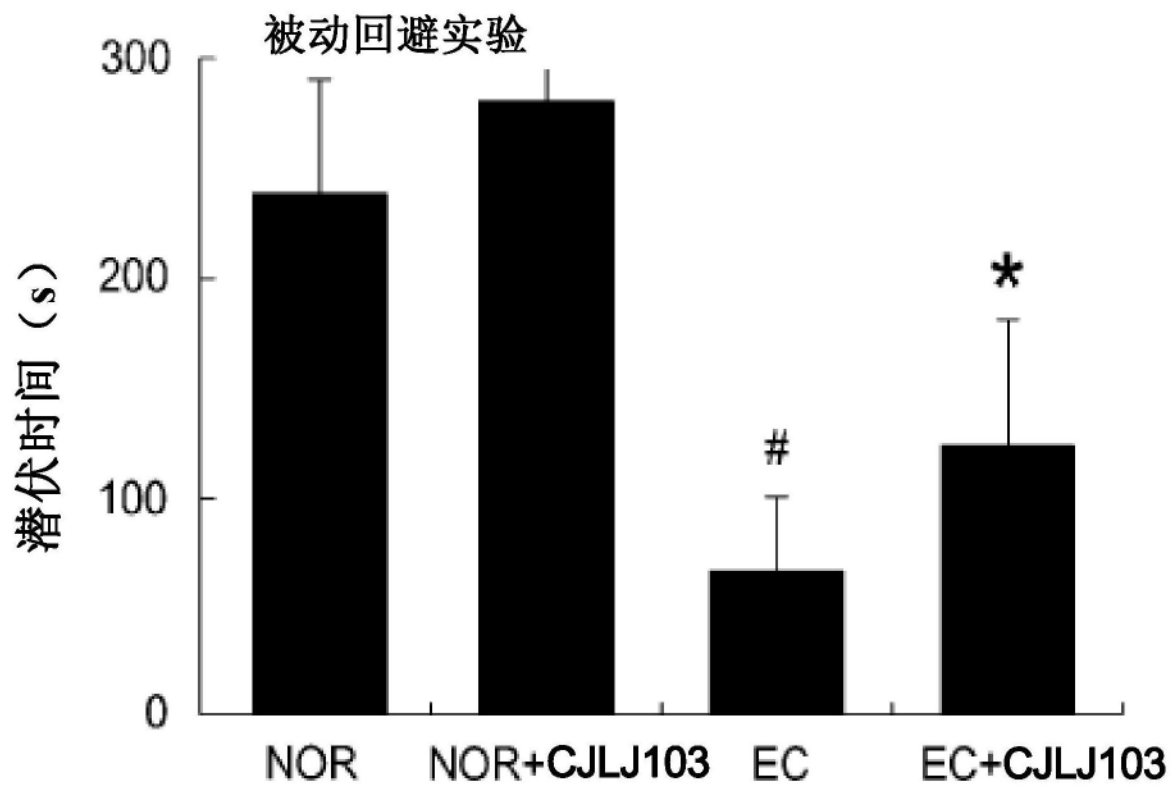


图2

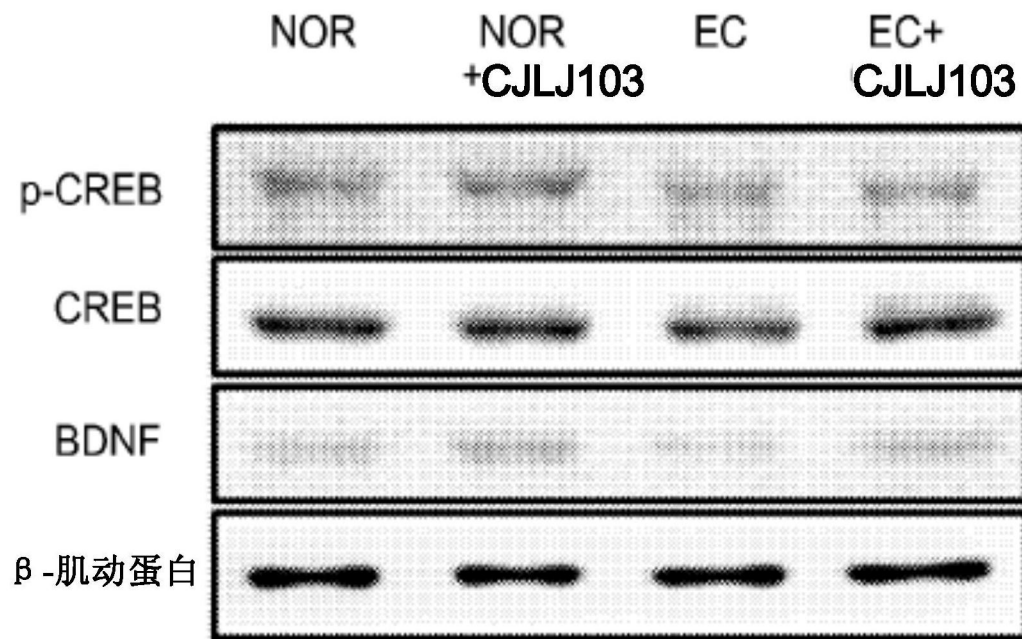


图3