

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1380902 B

(45) 授权公告日 2010.10.27

(21) 申请号 01801286.8

A61P 3/10(2006.01)

(22) 申请日 2001.02.23

C12R 1/225(2006.01)

(30) 优先权数据

2000/0026379 2000.05.17 KR

C12R 1/02(2006.01)

2000/0049805 2000.08.26 KR

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/225(2006.01)

C12R 1/02(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2002.01.16

(56) 对比文件

CN — 1105883 — A, 1995.08.02, 说明书摘要和权利要求 1 — 5.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2001/000269 2001.02.23

审查员 宋智刚

(87) PCT申请的公布数据

W001/88095 EN 2001.11.22

(73) 专利权人 株式会社百尼尔

地址 韩国大田广域市大德区文坪洞 49-3

(72) 发明人 朴翰溶 方英培 丁海重 金峰徹
金恒来

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 樊卫民

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A61K 35/74(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 5 页

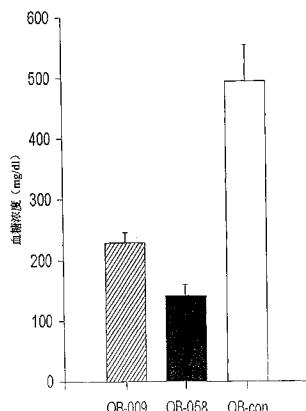
(54) 发明名称

治疗或预防肥胖症和糖尿病的微生物及含有
所述微生物的药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗或预防肥胖症和糖尿病的微生物，这些微生物通过将单糖如葡萄糖、果糖和半乳糖等和二糖转化为聚合物，而这些聚合物不能被肠道吸收，因此可减少被吸收入人体中单糖或二糖的量，本发明还涉及含有所述微生物的药物组合物。

CN 1380902 B



1. 一种用于治疗和预防肥胖症或糖尿病的药物组合物,包括可药用载体和药物有效量的微生物,所述微生物选自醋杆菌 (Acetobacter) KCTC 0773BP 和乳杆菌 (Lactobacillus) KCTC 0774BP。

2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于所述微生物被肠衣物质所包衣。

治疗或预防肥胖症和糖尿病的微生物及含有所述微生物的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗或预防肥胖症和糖尿病的微生物,这些微生物通过将能被人体吸收的单糖如葡萄糖、果糖和半乳糖等或二糖转化为不被肠道吸收的多聚体,因此可减少被吸收入人体中单糖或二糖的量,本发明还涉及含有所述微生物的药物组合物。

背景技术

[0002] 众所周知,肥胖症被报道为一种慢性病,许多因素都会导致肥胖,其发病起源至今未研究清楚。而肥胖已知为一系列疾病的诱导因子,如高血压、糖尿病、冠心病、胆囊病、骨关节炎、睡眠中呼吸窒息、呼吸失调、子宫瘤 (endometrial)、前列腺癌、乳腺癌和结肠癌等等。

[0003] 根 据 NIH 报 告 (The Evidence Report :clinical guideline on the identification, evalation, and trentment of overweight and obesity in adults, 1999, NIH), 约有 9700 万美国人超重和过度肥胖,其中与过度肥胖相关的 II 型糖尿病人数达到约 1570 万人。甚至,有报道每年约有 20 万人死于与肥胖症相关的疾病 (Dan Ferber, Science, 283, pp1424, 1999)。

[0004] 糖尿病是在全世界传播最广泛的慢性病之一,其对社会公众、糖尿病病人和他们的家属都是相当大的花费。

[0005] 此外,有许多病原因子导致几种类型糖尿病,因此其致病原因也各不相同。例如,真正的糖尿病具有高血糖和高尿糖双重特征,其是由胰岛素的生成或其作用不适当而引起的一种碳水化合物代谢失调。

[0006] 非胰岛素依赖性糖尿病 (NIDDM) 或 II 型糖尿病为一种成人病,他们尽管胰岛素生成和作用都正常,但在外周靶组织中具有胰岛素耐受性。

[0007] 三种重要的代谢失调会发生非胰岛素依赖性糖尿病 (NIDDM),如胰岛素耐受性、被营养物刺激的胰岛素分泌功能失调和肝脏中葡萄糖的过量合成。非胰岛素依赖性糖尿病 (NIDDM) 的治疗 (控制血糖水平) 失败会由于动脉粥样硬化导致死亡,还可能导致糖尿病晚期并发症,如视网膜病、肾病或神经病。

[0008] 磺酰脲和双胍化合物治疗以及饮食 -- 锻炼疗法都包括在对非胰岛素依赖性糖尿病 (NIDDM) 的治疗中以控制血糖水平。近来,治疗化合物如甲福明或阿卡波糖可用于治疗非胰岛素依赖性糖尿病 (NIDDM)。但某些糖尿病人的高血糖通过饮食和 / 或锻炼疗法或使用上述治疗化合物仍然不能得到适当控制。对于这些病人,应使用外源胰岛素。

[0009] 对病人来说,使用外源胰岛素是很昂贵和痛苦的方法。而且还会给病人带来多种有害的现象和并发症。例如,由于没有吃饭或不正常锻炼,胰岛素剂量的计算错误会导致胰岛素响应 (低血糖),而有时并找不到具体的原因。此外,胰岛素注射可能发生对胰岛素的局部或全身过敏或免疫抗性。

[0010] 有几种方法可用来预防或治疗肥胖症和糖尿病,如饮食 -- 锻炼疗法、手术或化疗

等。饮食—锻炼疗法为一种方法,即吃低热量、低脂肪食物和进行有氧锻炼,但这种方法一般认为对普通大众不成功,因为其需要长期地经常性地坚持这种疗法。

[0011] 去除体内脂肪手术能达到立竿见影的效果,但存在诸多限制,如手术风险、除脂效果难持久和花费高等。

[0012] 采用药物疗法能降低血糖水平,抑制葡萄糖的吸收,加强胰岛素的作用或者诱导减少食欲等,是一种目前在该领域最积极开发的方法。至今开发出的治疗和预防肥胖症和糖尿病的药物利用了多种生理机理。

[0013] 已经开发出了提高胰岛素作用的一些药物,如磺酰脲、甲福明、pioglitazone 或 thiazolidindione 衍生物等。磺酰脲具有刺激胰腺 β 细胞分泌胰岛素的效果,但会产生副作用引起低血糖,即使血糖值低于正常水平。

[0014] 甲福明主要用于胰岛素非依赖性糖尿病人,这些病人用饮食或锻炼疗法效果不佳。该药抑制肝中葡萄糖异生,促进葡萄糖在肌肉和脂肪组织中的储存。但该药已知会产生恶心、呕吐和腹泻等副作用。

[0015] pioglitazone 由日本 TAKEDA 开发,通过增加细胞对胰岛素的敏感性来促进胰岛素的作用 (Kobayashi M. et al, Diabetes, 41(4), PP476-483, 1992)。

[0016] β -3-肾上腺素受体抑制剂 (BRL-35135) 为一种刺激体内脂肪分解的药物,能特异性作用于脂肪细胞分解体内脂肪,并将他们转化为热量,同时降低血糖水平。

[0017] 胰脂肪酶抑制剂 (Orlistat, 瑞士罗氏生产) 是一种已知的抑制脂肪吸收的药物,通过抑制胰脂肪酶的作用从而抑制脂肪吸收,但它也抑制脂溶性维生素的吸收,从而导致乳腺癌。

[0018] 通常,抑制食欲的药物作用于大脑中的儿茶酚胺而降低食欲。但右芬佛拉明和芬佛拉明具有神经毒性和引起瓣心脏病的副作用。同样,细布曲明有增加心跳速率和提高血压的副作用。

[0019] α -葡萄糖苷酶抑制剂 (阿卡波糖, 德国拜尔生产) 为一种已知的葡萄糖吸收抑制剂药物。阿卡波糖是假单糖,能竞争性的抑制存在于胃肠道微绒毛上的多种 α -葡萄糖苷酶的作用。但如摄入量过大则导致腹泻 (W. Puls et al., Front. Horm. Res. 2, 235, 1998)。

[0020] 淀粉酶抑制剂已被开发出来,通过抑制淀粉酶作用将碳水化合物转化为低聚糖,防止源自过量摄取营养物所产生的代谢失衡 (Sanches-Monge R. et al. J. Biochem., 183, 0037-40, 1989)。

[0021] 摄取食用性纤维是获得抑制肥胖效果最简易的方法,通过食用多量蔬菜纤维,降低吸收到肠道中葡萄糖和脂肪的量。但这种方法存在一些问题,生产食用性纤维需要大量的设备和人工,其生产效率很低。

[0022] 多聚物如异麦芽三糖,葡聚糖和普鲁兰 (支链淀粉) 抑制源自吸收葡萄糖而导致的血糖水平增加。但这些物质也有严重的副作用。例如,葡聚糖可延迟血液凝结时间而导致过量出血。

[0023] 在上述的多种药物中,食用性纤维被认为是预防或治疗肥胖症最有用的药物,因为其不破坏人代谢平衡,是一个天然物质。

[0024] 微生物食用性纤维由微生物产生,如葡糖杆菌种 (Gluconobacter sp.), 土壤杆菌种 (Agrobacterium sp.), 木醋杆菌 (Acetobacter xylinum,), 汉氏醋杆菌 (A. hansenii),

巴氏醋杆菌 (*A. pasteurianus*)，醋化醋杆菌 (*A. aceti*)，根瘤菌种 (*Rhizobium sp.*)，产碱菌种 (*Alcaligenes sp.*)，八叠球菌种 (*Sarcina sp.*)，嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)，乳脂乳球菌 (*Lactococcus cremoris*)，瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)，保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)，清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sake*)，路氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)，乳乳杆菌 (*Lactobacillus lactis*)，乳杆菌德氏亚种 (*Lactobacillus delbrueckii subsp.*)，瑞士葡萄糖乳杆菌 *jugurti* 变种 (*Lactobacillus helveticusglucose var. jugurti*)，明串珠菌葡聚糖保加利亚种 (*Leuconostoc dextranicum Bulgariscus sp.*)，*Campestrisspp.*，鞘氨醇单胞菌种 (*Sphingomonas sp.*)。

[0025] 这些微生物生产的食用性纤维用作多种食品的稳定剂、增稠剂、乳化剂、吸湿剂以及化妆品和药品原料。微生物纤维素、黄原胶、*acetan* 等、瓜尔豆胶、次槐豆胶、卡拉胶、藻胶酸 (alginate)、来自海草的琼脂等都已商品化。

[0026] 乳杆菌种 (*Lactobacillus sp.*) 菌株是人体肠内正常微生物菌群的主要成分。它对健康消化器官的维持和阴道环境的重要作用很早以前即已知晓 (Bible, D. J., ASM News, 54 :661-665, 1988; Reid G. and A. W. Bruce, In H Lappin-Scott (ed.), *Bacterial biofilms*, Cambridge University Press, Cambridge, England, p. 274-281, 1995; Reid G., A. W. Bruce, J. A. McGroarty, K. J. Cheng, and J. W. Costerton, Clin. Microbiol. Rev., 3 :335-344, 1990)。通常, 乳杆菌菌株生存在消化器官 [嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)，肠乳杆菌 (*L. intestinalis*)，约氏乳杆菌 (*L. johnsonii*)，路氏乳杆菌 (*L. reuteri*) 等]，阴道粘膜 [阴道乳杆菌 (*L. vanginals*)，加氏乳杆菌 (*L. gasseri*)]，食品 [希氏葡萄酒乳杆菌 (wine-*L. hilgardii*)]，乳杆菌饮料 [高加索乳杆菌 (*L. Kefir*)，马乳酒样乳杆菌 (*L. Kefiranofaciens*)]，奶酪 [干酪乳杆菌 (*L. casei*)]，醋 [耐酸乳杆菌 (*L. acetotolerance*)]，口腔 [口乳杆菌 (*L. oris*)]，酵母 [清酒乳杆菌 (*L. sake*)]，同型腐酒乳杆菌 (*L. homohiochi*)，果汁 [*L. Kunkeei*，苹果乳杆菌 (*L. mali*)，猪双白乳杆菌 (*L. suebicus*)]，发酵过的香肠或鱼 [香肠乳杆菌 (*L. farciminis*)，消化乳杆菌 (*L. alimentarius*)] 等。

[0027] 为维持健康的肠道和预防尿生殖道感染, 许多人服用含乳杆菌种 (*Lactobacillus sp.*) 菌株的健康补充食品。近来, 乳杆菌的多种微生态调节活性被公开, 且其受关注程度与日俱增, 这些活性如免疫控制, 血液中胆固醇水平控制, 癌症预防, 风湿病治疗, 对乳糖的敏感性缓解, 遗传过敏性皮炎影响的减轻, 以及腹泻、便秘、尿生殖道感染等的预防。

[0028] 根据美国公共健康服务指引, 所有 262 种存放在 ATCC 里的乳杆菌都被划分为“生物安全性 1 级”, 其表示至今所知这些菌种绝无潜在危险会给人类和动物带来疾病。在大约 60 种乳杆菌菌株中无一对对人体有毒。

[0029] 近来, 用乳杆菌生产胞外食用性纤维的研究正积极推進。据报道, 用这些菌生产食用性纤维的方法很复杂, 因有许多基因介入到所述方法中, 并且食用性纤维生产量很小 (Int. J. Food Microbiol., Mar 340 :1-2, 87-92, 1998; Current Opinion in Microbiology, 2 :598-603, 1999; Appl. Environ. Microbiol., Feb 64 :2, 659-64, 1998; FEMS Microbiol. Rev. Apr 23 :2153-77, 1999; FEMS Microbiol. Rev. Sep 7 :1-2, 113-30, 1990)。

[0030] 利用众所周知的生产食用性纤维的微生物醋酸杆菌 (*Acetobacter* sp.) 进行纤维素合成也已进行了多种研究 (Aloni Y., cohen R., Benziman M., Delmer D., J. Biological chemistry 171 :6649–6655, 1989; Ascher M., J. Bacteriology, 33 :249–252, 1937; Benziman M., Burger-RachamimvH., J., Bacteriology, 84 :625–630, 1962; Brown AM, Journal of Polymerscience, 59 :155–169, 1962; Brown AM, Gascoigne JA, Nature, 187 :1010–1012, 1960; Calvin JR, Planta DP, Benziman M., Padan E, PANSUSA, 79 :5282–5286, 1982; Dehmer DP, Brown RM Jr., Cooper JB, Lin FC, Science, 230 :82–825, 1985)。

[0031] 醋酸杆菌是一种严格需氧菌,但具有两个特征,其一是在极其稀少的氧条件下仍能生存并存活,其二在该条件下通过自身合成纤维素食用性纤维悬浮于表面寻求氧气。根据有关醋酸杆菌将葡萄糖转化为纤维素食用性纤维的量和速率的研究 (Brown et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 73(12), 4565–4569), 醋酸杆菌以 400amol/ 细胞 / 小时的速率将葡萄糖转化为纤维素。此速率相当于 4×10^{15} 个细胞每小时将大约 200g 葡萄糖转化为纤维素。

[0032] 偶有报道醋酸杆菌能代谢蔗糖。但自然界中确存在着能将蔗糖转化为葡萄糖的醋酸杆菌 (PNAS, 9 :pp14–18)。如今,美国 FDA 已经批准木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum*) 用于合成乙酸和山梨糖,并被分类为一般安全性微生物 (GRAS :一般认为安全)。

[0033] 如上所述,到目前为止,已有多种研究和努力来开发治疗或预防肥胖症和糖尿病的药物,但结果还不太令人满意。上述的多种化学物质已被开发为治疗肥胖症和糖尿病的药,但都有几种副作用。这些药物使体内脂肪和有价值的蛋白质一起流失。结果,没有任何一种药物能单独从源头治疗或抑制肥胖症和糖尿病。

发明内容

[0034] 因此,本发明目的是提供微生物,这些微生物能在肠道中生存并将由消化酶制备的寡糖转化为不能被消化的多糖,因而能显著降低被肠道吸收的寡糖量。

[0035] 本发明的另一个目的是提供药物组合物,该组合物含有药物有效剂量的所述微生物,通过从源头降低吸入人体肠道中的寡糖量,从而治疗或预防肥胖症和糖尿病。

[0036] 本发明中用作药物组合物活性成分的微生物优选属于醋酸杆菌属 (*Acetobacter* genus), 葡糖杆菌属 (*Gluconobacter* genus), 乳杆菌属 (*Lactobacillus* genus) 和无色杆菌属 (*Acrobacterium* genus)。这些微生物生活在肠道中,对人体无害,能将寡糖转化为不被人体吸收的多糖。尤其下列微生物可作为本发明药物组合物的微生物,如木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum*), 汉氏醋杆菌 (*A. hansenii*), 巴氏醋杆菌 (*A. pasteurianus*), 醋化醋杆菌 (*A. aceti*), 乳脂乳球菌 (*Lactococcus cremoris*), 瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*), 保加利亚乳杆菌 (*L. bulgaricus*), 清酒乳杆菌 (*L. sake*), 路氏乳杆菌 (*L. reutari*), 乳乳杆菌 (*L. lactis*) 以及德氏乳杆菌 (*L. delbrueckii*)、德氏乳杆菌亚种 (*L. delbrueckii* subsp.) 和瑞士葡萄糖乳杆菌 (*L. helveticus* glucose) 变种。用作本发明药物组合物活性成分的微生物优选为乳杆菌种 (*Lactobacillus* sp.) BC-Y009 (KCTC0774BP) 株和醋酸杆菌 (*Acetobacter* sp.) BC-Y058 (KCTC0773BP) 株。

[0037] 本发明药物组合物可以药物制剂片剂或胶囊的任一种形式给药,所述药物制剂包括赋形剂、药物允许的媒介和载体,这些物质可根据给药途径进行选择。本发明中药物制剂

可进一步包含辅助的活性组份。

[0038] 乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、treguhkense latex, 明胶、硅酸钙、细结晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯, 滑石、硬脂酸镁或矿物油等都可用作本发明中药物组合物的载体、赋形剂或稀释剂等。

[0039] 此外, 本发明的药物组合物可进一步包括润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮液稳定剂、防腐剂、甜味剂和香料等。本发明的药物组合物可通过多种公知的方法以肠衣制剂生产, 以便于药物组合物的活性成分即微生物能顺利通过胃而不被胃酸所破坏。

[0040] 另外, 本发明的微生物可以常规方法制备的胶囊形式使用。例如, 标准赋形剂和本发明的冷干微生物混合制成小球药丸, 然后将药丸装填入硬的明胶胶囊中。此外, 本发明的微生物和药物允许使用的赋形剂如液体胶、纤维素、硅酸盐或矿物油等混合制作悬浮液或分散液, 这种悬浮液或分散液可装入软的明胶胶囊中。

[0041] 本发明的药物组合物可制成肠衣片供口服使用。本申请中的术语“肠衣”, 包括所有常规药物允许使用的包衣, 这些包衣不被胃酸降解, 但在小肠中能充分分解并快速释放出本发明的微生物。

[0042] 本发明的肠衣能在合成胃酸如 pH 1 的 HCl 溶液中在 36–38°C 维持 2 小时以上, 并优选在合成肠液如 pH 6.8 的 KH₂PO₄ 缓冲液中在 0.5 小时内分解。

[0043] 本发明的肠衣为以每片约 16–30mg, 理想的为 16–25mg, 更理想的为 16–20mg 的量进行包衣。本发明中肠衣厚度为 5–100 μm, 理想的厚度为 20–80 μm。肠衣成分选自己公开知晓的常规聚合物。本发明中肠衣使用的这些聚合物在下列文章中列举和描述 [The Theory and Practices of Industrial Pharmacy, 3rd Edition, 1986, pp. 365–373 by L. Lachman, Pharmazeutische Technologie, thieme, 1991, pp. 355–359 by H. Sucker, Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, 4th Edition, Vol. 7, pp. 739, 742, 766, and 778, (SpringerVerlag, 1971), and Remington's Pharmaceutical Sciences, 13th Edition, pp. 1689 and 1691 (Mack Publ., Co., 1970)]。例如, 纤维素酯衍生物、纤维素醚以及丙烯基和丙烯酸甲酯或马来酸或磷苯二甲酸衍生物的共聚物在本发明的肠衣中可使用。

[0044] 本发明优选的肠衣由纤维素乙酸邻苯二甲酸酯聚合物或偏苯三酸酯聚合物以及异丁烯酸的共聚物 (例如, 含有 40% 以上异丁烯酸和含有甲基纤维素邻苯二甲酸羟丙酯或其酯类衍生物的异丁烯酸的共聚物) 制备。

[0045] 由德国 Rohm GmbH 生产的 Endragit L 100–55 可被用作本发明中肠衣的原料。

[0046] 本发明中肠衣所使用的纤维素乙酸邻苯二甲酸酯粘度为约 45–90cp, 乙酰含量 17–26%, 邻苯二甲酸含量 30–40%。用于肠衣中的纤维素乙酸偏苯三酸酯粘度为约 15–21cs, 乙酰含量 17–26%, trimelityl 含量 25–35%。纤维素乙酸偏苯三酸酯由 Eastman 科达公司生产, 可用于本发明中的肠衣材料。

[0047] 用于本发明肠衣中的羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯, 分子量一般为 20,000–130,000 道尔顿, 理想分子量为 80,000–100,000 道尔顿, 羟丙基含量为 5–10%, 甲氧基含量为 18–24%, 邻苯二甲酰基含量为 21–35%。纤维素乙酸邻苯二甲酸酯由 Eastman 科达公司生产, 可用作本发明中的肠衣材料。

[0048] 用于本发明肠衣中的羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯为 HP50, 由日本 Shin-Etsu

Chemidnl Co. Ltd. 生产。HP50 含有 6-10% 羟丙基含量, 20-24% 甲氧基含量, 21-27% 的丙基含量, 其分子量为 84,000 道尔顿。另一种肠衣物质为 HP55, 也是由日本 SHIN-ETSU Chemidnl Co. Ltd. 生产。HP55 能被用作本发明的肠衣材料。HP55 含有 5-9% 的羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯含量, 18-22% 甲氧基含量, 27-35% 的邻苯二甲酸含量, 其分子量为 78,000 道尔顿。

[0049] 本发明肠衣如下制备: 使用常规方法将肠衣溶液喷雾到核心上。该肠包衣方法中所有溶剂为醇类如乙醇, 酮类如丙酮, 卤代烃化合物如二氯甲烷, 或其混合物也可使用。将软化剂如二-正丁基邻苯二甲酸酯和三乙酸甘油酯加入到肠衣溶液中, 其比例为 1 份包衣物对约 0.05 份或约 0.3 份软化剂。

[0050] 喷雾方法优选连续执行和所喷雾的料量可根据包衣所采用的条件进行控制。喷雾压力可随意调节, 一般而言, 能在平均 1-1.5 巴压力下获得理想的结果。

[0051] 本说明书中“药物有效量”表示本发明中微生物的最小量, 也即是能够降低吸收进哺乳动物体内肠道中的寡糖量时所需采用的微生物的量。根据使用方法和被给药个体的不同, 可对以本发明药物组合物形式给药的微生物的量进行调整。

[0052] 可将本发明组合物施用给所述个体, 每天给药 1 次或多次。给药剂量单位表示其形式上能分开且适用于人类或其他所有哺乳动物个体的剂量。每一单位含有药物允许的载体和有效治疗量的本发明微生物。

[0053] 对成人口服单位剂量, 本发明微生物理想用量为 0.1g 或更多, 而本发明组合物每次给药为 0.1-10g, 理想为 0.5-5.0g。本发明微生物的药物有效剂量为每天 0.1g。

[0054] 但给药量随病人的体重和肥胖严重程度、所包括的补充活性组份和所使用的微生物而变化。此外如可能可分开日给药量并且如需要可连续给药。因此, 所述给药量无论如何都不对本发明的范围造成限制。

[0055] 本发明中的“组合物”不仅意味着药品而且表示可作为功能性食品和健康补充食品。

[0056] 在周期性地使用本发明组合物情况下, 微生物在肠道内形成菌群并竞争性地阻止寡糖在体内吸收。同时, 由微生物产生的非消化性纤维为肠道内其他有益微生物创造了一个健康环境并刺激了肠道活性。结果, 本发明组合物就具备了治疗和预防肥胖症和糖尿病的功能。

[0057] 附图简述

[0058] 参照附图通过优选实施方案的详尽描述, 本发明的上述目的和其他优势将变得更加清楚:

[0059] 图 1 显示了本发明微生物对葡萄糖的吸收速率。

[0060] 图 2 显示了使用本发明微生物后血糖水平的变化。

[0061] 图 3 显示了使用过本发明微生物的肥胖鼠其能量代谢效率的变化。

[0062] 图 4 是以 16s rRNA 核苷酸序列为为基础的本发明乳杆菌 (Lactobacillus) BC-Y009 系统发育分析图表。

[0063] 图 5 是以 16s rRNA 核苷酸序列为为基础的本发明乳细菌 (Lactobacter) BC-Y058 系统发育分析图表。

[0064] 实施发明的最佳方式

[0065] 在下文中,本发明将进一步详尽描述。

[0066] 为预防和治疗肥胖症和糖尿病,能被用于本发明药物组合物的微生物须满足下列要求:1)能在肠道层内增殖;2)能快速吸收寡糖并将它们转化成可能消化或难消化的高分子量物质如纤维状物质;3)对人体和动物无害。能满足上述条件的所有微生物都可用作本发明药物组合物的活性成分,并且可从世界上众多的微生物保藏机构获得。

[0067] 因此,本发明药物组合物中的微生物为下列产多糖的菌:木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum*), 醋杆菌 (*Acetobacter*) BC-Y058, 汉氏醋杆菌 (*Acetobacter hansenii*), 巴氏醋杆菌 (*Acetobacter pasteurianus*), 醋化醋杆菌 (*Acetobacter aceti*), 明串珠菌种 (*Leuconostoc* sp.), 芽孢杆菌种 (*Bacillus* sp.), 乳杆菌 (*Lactobacillus*) BC-Y009, 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*), 瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*), 保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*), 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*), 高加索 (*Lactobacillus kefir*), 马乳酒样乳杆菌 (*Lactobacillus Kerirnnofaciens*), 双歧乳杆菌 (*Lactobacillus bifidus*), 清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sake*), 路氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*), 乳乳杆菌 (*Lactobacillus lactis*), 德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*), 瑞士葡萄糖乳杆菌 *jugurti* 变种 (*Lactobacillus helveticusglucos* var. *jugurti*), 乳脂乳球菌 (*Lactococcus cremoris*), 双歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*), 嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 或片球菌种 (*Pediococcus* sp.)。这些微生物在下列文章中进行描述,

[0068] Bart Degeest and Luc De Vuyst, “氮源影响嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) LY03 生产外多糖的量和大小指征以及细菌生长和外多糖在丰富培养基中外多糖生产模型” (*Appl. Envir. Microbiol.* 1999, 65 :2863-2870.) ;

[0069] Stacy A. Kimmel, Robert F. Roberts and Gregory R. Ziegler, “生长在半合成培养基中的保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) RR 最佳产外多糖条件” (*Appl. Envir. Microbiol.* 1998, 64 :659-664.) ;

[0070] P. L. Pham, I. Dupont, D. Roy, G. Lapointe and J. Cerning, “鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) R 外多糖的生产及延长发酵过程中其酶降解的分析” (*Appl. Envir. Microbiol.* 2000, 66 :2302-2310.) ;

[0071] Petronella J. Looijesteijn, Ingeborg C. Boels, Michiel Kleerebezem and Jeroen Hugenoltz, “葡萄糖源对乳酸乳球菌乳脂亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) 生产外多糖的调节” (*Appl. Envir. Microbiol.* 1999, 65 :5003-5008.) ;

[0072] G. H. Van Geel-Schutten, E. J. Faber, E. Smit, K. Bonting, M. R. Smith, B. Ten Brink, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart and L. Dijkhuizen, “用路氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 野生株和突变株合成的葡聚糖和果聚糖的生化和结构特征” (*Appl. Envir. Microbiol.* 1999, 65 :3008-3014.) ;

[0073] G. J. Grobben, I. Chin-Joe, V. A. Kitzen, I. C. Boels, F. Boer, J. Sikkema, M. R. Smith and J. A. M. de Bont, “采用德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) NCFB 2772 和简单合成培养基提高外多糖产量” (*Appl. Envir. Microbiol.* 1998, 64 :1333-1337.) ;

[0074] Sandrine Petry, Sylviane Furlan, Marie-Jeanne Crepeau, JuttaCerning

and Michel Desmazeaud, “生长于化学合成培养基上的德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 生产外胞多糖的影响因素” (Appl. Envir. Microbiol. 2000, 66 :3427–3431.) ;

[0075] Richard van Kranenburg, Iris I. Van Swam, Joey D. Marugg, Michiel Kleerebezem and Willem M. de Vos, “乳球菌 (*Lactococcus lactis*) NIZOB40 中外多糖生物合成 : 参与多糖骨架合成的糖基转移酶基因的功能分析” (J. Bacteriol. 1999, 181 :338–340.) ;

[0076] Deborah Low, Jeffrey A. Ahlgren, Diane Home, Donald J. McMahon, Craig J. Oberg and Jeffery R. Broadbent, “嗜热链球菌 (*Streptococcusthermophilus*) MR-1C 胶囊外多糖在奶酪水分保持中的作用” (Appl. Envir. Microbiol. 1998, 64 :2147–2151.) ;

[0077] Richard van Kranenburg and Willem M. de Vos, “参与编码乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 生产外多糖的质粒 pNZ4000 复制和转移的多区域的特征” (J. Bacteriol. 1998, 180 :5285–5290.) ;

[0078] F Stingele, JR Neeser, and B Mollet, “来自嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) Sfi6 外多糖基因簇的鉴定和特征” (J. Bacteriol. 1996, 178 :1680–1690.) ;

[0079] M Kojic, M Vujsic, A Banina, P Cocconcelli, J Cerning and LTopisirovic, “从奶酪分离的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) CG11 生产外多糖的分析” (Appl. Envir. Microbiol. 1992, 58 :4086–4088.) ;

[0080] Christian Chervaux, S. Dusko Ehrlich and Emmanuelle Maguin, “在一种新型化学合成培养基中德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 菌株的生理学研究” (Appl. Envir. Microbiol. 2000, 66 :5306–5311.) ;

[0081] J Lemoine, F Chirat, JM Wieruszkeski, G Strecker, N Favre and JR Neeser, “由嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) SFi39 和 Sfi12 生产外胞多糖的结构特征” (Appl. Envir. Microbiol. 1997, 63 :3512–3518.) ;

[0082] Bart Degeest and Luc De Vuyst, “葡萄糖磷酸变位酶、UDP- 半乳糖 4- 差向异构酶和 UDP- 葡萄糖焦磷酸化酶的活性与嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) LY03 外多糖生物合成之间的相互关系” (Appl. Envir. Microbiol. 2000, 66 :3519–3527.) ;

[0083] Petronella J. Looijesteijn, Ingeborg C. Boels, Michiel Kleerebezem and Jeroen Hugenholtz, “葡萄糖源对乳酸乳球菌乳脂亚种 (*Lactococcus Lactis* subsp. *cremoris*) 生产外多糖的调节” (Appl. Envir. Microbiol. 1999, 65 :5003–5008.) ;

[0084] Williams WS and Cannon RE, “对木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum*) 纤维素生产的交替环境作用” (Appl. Envir. Microbiol. 1989, 55 :2448–2452.) ;

[0085] Brown AM and Gascoigne JA, “产醋酸杆菌 (*Acetobacter Acetigenum*) 纤维素的生物合成” (Nature 1960, 187 :1010–1012.) ;

[0086] Carr JG, “一株呈现阳性纤维素反应的醋化醋杆菌 (*acetobacter acetii*)” (Nature 1958, 182 :265–266.) ;

[0087] Carr JG and Shimwell JL, “新旧产纤维素醋酸杆菌 (*Acetobacter*) 菌株” (J. Inst. Brew. 1958, 64 :477–484.) ;

[0088] Colvin JR and Leppard GG, “木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum*) 和产醋酸杆菌

- (*Acetobacter acetigenus*) 纤维素的生物合成”(Can. J. Microbiol. 1977, 23 :701-709.) ;
- [0089] Colvin JR and Webb TE,“氧消耗与木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum*) 纤维素合成间的变化关系”(Can. J. Microbiol. 1964, 10 :11-15.) ;
- [0090] Cook KE and Colvin JR,“纤维素生产对木醋杆菌 (*Acetobacterxylinum*) 在液体培养基中生长有利影响的证据”(Curr. Microbiol. 1980, 3 :203-205.) ;
- [0091] Fiedler S, Fussel M and Sattler K,“细菌纤维素的生产和应用”(Zentralbl Mikrobiol. 1989, 144 :473-484.) ;
- [0092] Kauri T, Vladuttalor M and Kushner DJ,“生长在有纤维素存在下的细菌糖亏的生产”(Abstract ASM Meeting 1986, 273) ;
- [0093] Mounter LA,“细菌纤维素的结构和形成的观察”(Biochemical Journal 1951, 50 :128-132.) ;
- [0094] Valent BS and Albersheim P,“pH 对木葡聚糖结合到纤维素上的影响”(Plant Physiol. 1973, 51supp. :60) ;
- [0095] Valla S and Kjosbakken J,“一种来自纤维素阴性菌株木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum*) 新型胞外多糖的分离和特征”(Can. J. Microbiol. 1981, 27 :599-603.) ;
- [0096] Valla S, Kjosbakken J and Coucheron DH,“木醋杆菌 (*Acetobacterxylinum*) 含有几种质粒 :参与纤维素形成的证据”(Archives ofMicrobiology 1983, 134 :9-11.) ;
- [0097] Walker TK and Kaushal R,“产醋酸杆菌 (*Acetobacter acetigenus*) 纤维素的形成”(Nature 1947, 160 :572-573.) ;
- [0098] Walker TK and Kaushal R,“醋杆菌 (*Acetobacter*) 某种的纤维素形成”(Biochemical J. 1951, 48 :618-621.) ;
- [0099] Webb TE and Colvin JR,“氧消耗与株木醋杆菌 (*Acetobacterxylinum*) 纤维素合成间的变化关系”(Can. J. Microbiol. 1964, 10 :11-15.) ;
- [0100] Webb TE and Colvin JR,“株木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum*) 胞外蛋白以及与纤维素合成间的关系”(Can. J. Biochemistry 1966, 45 :465-476.) ;
- [0101] Wong HC, et al,“株木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum*) 中纤维素的遗传结构”(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87 :8130-8134.) ;
- [0102] Higashimura M, Mulder-Bosman BW, Reich R, Iwasaki T and RobijnGW,“来自乳酸乳杆菌乳脂亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SBT0495外多糖, 维利亚的溶液特征”(Biopolymers 2000, Aug 54 :2143-158.) ;
- [0103] Knoshaug EP, Ahlgren JA and Trempy JE,“与乳酸乳杆菌乳脂亚种 (*Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*) Ropy352 外多糖表达相关联的生长”(J. Dairy Sci. 2000, Apr 83 :4633-640.) ;
- [0104] Micheli L, Uccelletti D, Palleschi C and Crescenzi V,“一种产外多糖 - 酸乳酒胞外多糖的粘液乳杆菌 (*Lactobacillus*) 菌株的分离和特征”(Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999, Dec 53 :169-74.) ;
- [0105] Smitinont T, Tansakul C, Tanasupawat S, Keeratipibul S, Navarini L, Bosco M and Cescutti P,“来自传统泰国发酵食品产外多糖的乳酸菌菌株 :分离、鉴定和外多糖特征”(Int. J. Food Microbiol. 1999, Oct 1551 :2-3105-111.) ;

- [0106] Breedveld M, Bonting K and Dijkhuizen L,“清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*)0-1 的外多糖生物合成突变分析”(FEMS Microbiol. Lett. 1998, Dec 15169 : 2241-249.) ;
- [0107] De Vuyst L, Vanderveken F, Van de Ven S and Degeest B,“来自生长在牛奶培养基嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 外多糖的分离和生产以及与生长相关的生物合成的证据”(J. Appl. Microbiol. 1998, Jun 84 :61059-1068.) ;
- [0108] Kimmel SA and Roberts RF,“一种适用于产外多糖德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* ssp.*Bulgaricus*)RR 生长培养基的开发”(Int. J. Food Microbiol. 1998, Mar 340 :1-287-92.) ;
- [0109] Duenas-Chasco MT, Rodriguez-Carvajal MA, Tejero-Mateo P, Espartero JL, Irastorza-Iribas A and Gil-Serrano AM,“产自乳杆菌 spp. (*Lactobacillus spp.*)G-77 外多糖的结构分析”(Carbohydr. Res. 1998, Feb 307 :1-2 125-133.) ;
- [0110] Espartero JL, Irastorza-Iribas A, Gil-Serrano AM, Duenas-Chasco MT, Rodriguez-Carvajal MA, Tejero Mateo P and Franco-Rodriguez G,“产自有害片球菌 (*Pediococcus damnosus*)2.6 外多糖的结构分析”(Carbohydr. Res. 1997, Oct 7303 : 4453-458.) ;
- [0111] Stingle F, Lemoine J and Neeser JR,“瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)Lh59 分泌一种与产自瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)TN-4 相同的外多糖,瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)TN-4 推测为一个瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)TY1--2 自发突变株”(Carbohydr. Res. 1997, Aug 7302 :3-4197-202.) ;
- [0112] Bubb WA, Urashima T, Fujiwara R, Shinnai T and Ariga H,“产自嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)OR901 胞外多糖的结构特征”(Carbohydr. Res. 1997, Jun 11301 :1-241-50.) ;
- [0113] Staaf M, Widmalm G, Yang Z and Huttunen E,“一种产自瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) 胞外多糖的结构阐明”(Carbohydr. Res. 1996, Sep 23291 : 155-164.) ;
- [0114] Robijn GW, Gutierrez Gallego R, van den Berg DJ, Haas H, Kamerling JP and Vliegenthart JF,“产自嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)LMG9433 外多糖的结构特征”(Carbohydr. Res. 1996, Jul 19288 :203-218.) ;和
- [0115] Robijn GW, Wienk HL, van den Berg DJ, Haas H, Kamerling JP and Vliegenthart JF,“产自类干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*)34-1 外多糖的结构研究”(Carbohydr. Res. 1996, May 14285 :129-139.)
- [0116] 这些文章包括附图,引入本文作为参考,如同全文在此列入一样。
- [0117] 另外,本发明人已经分离和获得了能用作本发明药物组合物中活性成分的新型微生物。
- [0118] 为了分离和获得微生物,满足作为本发明药物组合物活性成分的条件,本发明人进行了如下研究。
- [0119] 从糖厂污水和其他地点微生物取样收集,接种在含环己酰亚胺(放线菌酮)的MRS

和 BHS 琼脂培养基中进行培养。然后将琼脂培养基上形成的菌落接种到 MRS 和 BHS 的液体培养基中，静置培养。选择在培养基顶层能形成基质或膜状的微生物。分离所形成的膜并测试是否被肠道中的消化酶分解。测定结果决定是否产生了不可消化或难消化的高分子量的化合物。在这些微生物中，因其高产胞外多糖（食用性纤维），BC-Y009 和 BC-Y058 被筛选出来。

[0120] 通过观察 BC-Y009 和 BC-Y058 形态和比较 16s rRNA 的部分 DNA 序列，证实与乳杆菌 (*Lactobacillus*) 和醋酸杆菌 (*Acetobacter*) 每种都显示了高比例的同源性序列。根据表型和 16s rRNA 的序列分析，可确认 BC-Y009 为一种新型微生物，隶属于乳杆菌属 (*Lactobacillus genus*)，而 BC-Y058 为醋酸杆菌属 (*Acetobacter genus*) 中的一种新型微生物。

[0121] 本发明中的乳杆菌 BC-Y009 和醋酸杆菌 BC-Y058 给已被诱导为肥胖症和糖尿病的小鼠施用。在给药后，给药小鼠的血糖水平已经降低了近 70%。

[0122] 根据这些结果，证明本发明的微生物具有降低血糖水平的效果，因此对治疗和预防糖尿病有效。

[0123] 当本发明的微生物 BC-Y009 和 BC-Y058 在已诱导为糖尿病和肥胖症的小鼠身上使用时，与对照组小鼠比较，饲料的消耗速率增加了 17-24%。但是，体重增重与饲料消耗量的比例则下降了。结果表明人类可以使用本发明的微生物组合物而无需担心肥胖症和糖尿病。

[0124] 在服用这些微生物的情况下，血脂量也比对照组低，由此得知本发明微生物能控制糖尿病、肥胖症和循环疾病（如动脉硬化、心肌梗塞）的发生。

[0125] 在下文中，本发明将参照下列例子作进一步解释。所给出的这些例子只解释发明，而不是限制本发明的范围。

[0126] 实施例 1.

[0127] 从样本中选择可产胞外多糖的微生物

[0128] 为了分离出能产食用性纤维的微生物，从糖厂污水和其他地点收集样本。从收集的样本中取出 10g 混合物破裂后悬浮于 90ml 的生理盐水 (0.85% NaCl)。所述的悬浮样本用生理盐水稀释为 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} 。然后将这些稀释样品分别涂抹在每 100ml 培养基含 1mg 环己酰亚胺（放线菌酮）的 MRS 琼脂培养基 (1% 蛋白胨, 1% 牛肉膏, 0.5% 酵母粉, 2% 葡萄糖, 0.1% Tween-80, 0.2% 柠檬酸铵, 0.5% 乙酸钠, 0.01% MgSO₄, 0.005% MnSO₄, 0.2% 磷酸钠 pH6.5) 和 BSH 琼脂培养基 (2% 葡萄糖, 0.5% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 0.27% Na₂HPO₄, 0.115% 柠檬酸 pH5.0) (Hestirin and Schramm, J. Gen. Microbiol., 11:123, 1954) 中，30°C 培养 72 小时。大约 2000 个菌落被分离出来并首先接种到 5ml MRS 液体培养基和 BSH 液体培养基中 30°C 静置培养 72 小时。将能在液体培养基上层形成膜状或形成胶囊状胞外多糖且其培养基透明澄清的微生物挑选出来。这些微生物再次转接到 5ml MRS 液体培养基和 BSH 液体培养基中 30°C 震荡培养，其吸光度在 600nm 处用分光光度计测定。微生物用 BSH 液体培养基稀释直至吸光度达到 0.2。10ml 经过稀释的微生物接种到 100ml 的 BSH 液体培养基中，30°C 静置培养 72 小时。

[0129] 为了测定所产胞外多糖（食用性纤维）量，每种培养基 4°C、6000rpm 离心获得微生物沉淀。细胞膜用 0.1N NaOH 溶液碱性裂解破裂，放置于 80°C 30 分钟，然后 4°C、6000rpm

离心,上述过程完整地重复多次。象白色丝线样缠绕的胞外多糖分离出来冻干以测定其量。挑选出高产胞外多糖的微生物,并对胞外多糖产率相互比较(表1.)。

[0130] 表1. 胞外多糖产率的比较

[0131]

筛选号	胞外多糖产出量 (干重 g/l BSH)
BC-Y009	3.8
BC-Y002	4.2
BC-Y015	3.2
BC-Y026	4.1
BC-Y058	4.8
BC-Y112	3.0
BC-Y130	3.4
BC-Y201	3.3

[0132] 实施例2.

[0133] 挑选的BC-Y009和BC-Y058的特征和形态学鉴定

[0134] 从实施例1中挑选出的高产多糖的微生物是BC-Y009, BC-Y002, BC-Y015, BC-Y026, BC-Y058, BC-Y112, BC-Y130和BC-Y201。通过观察部分DNA序列, BC-Y009, BC-Y002, BC-Y015和BC-Y026为乳杆菌属(*Lactobacillus* genus)微生物,而BC-Y058, BC-Y112, BC-Y130和BC-Y201为醋酸杆菌属(*Acetobacter* genus)微生物。

[0135] 在上述微生物中, BC-Y009和BC-Y058表现为高的多糖产率,将它们接种到MRS和BSH的液体培养基中,30℃悬浮培养72小时。培养液4℃、6000rpm离心收集微生物,其核酸采用CTAB/NaCl方法分离。通过使用16s rRNA共有序列引物,采用PCR方法扩增16srRNA,测定所得序列。采用BLAST分析(NCBI,美国)对序列进行测定,其结果显示了与希氏乳杆菌(*Lactobacillus hilgardii*),木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*),葡萄球菌种(*Gluconobacter* sp.),众多其他的乳杆菌种(*Lactobacillus* sp.)和醋酸杆菌种(*Acetobacter* sp.)有高百分比的序列同源性(表2.和表3.)。

[0136] 表2. 乳杆菌种(*Lactobacillus* sp.)BC-Y00916s rRNA核苷酸序列比较

[0137]

	BC-Y009	德氏乳杆菌亚种(L. delbrueckii subsp.)ATCC 9649	瑞士乳杆菌 (L.helveticu s)NCDO27 12T	嗜酸乳杆 菌 (L. acidophilu s)ATCC4 356	希氏乳杆 菌 (L. hilgardii) NCDO264	乳杆菌种 (Lactobacillus sp.)ATCC13 133
BC-Y009	---	145	136	146	3	4
德氏乳杆菌 亚种(L. delbrueckii subsp.) ATCC9649	88.93	---	76	73	142	143
瑞士乳杆菌 (L.helveticu s)NCDO27 12T	89.16	93.94	---	21	134	134
嗜酸乳杆菌 (L. acidophilus)ATCC4356	88.85	94.43	98.33	----	144	144
希氏乳杆菌 (L. hilgardii)N CDO264	99.77	89.07	89.26	88.93	----	1
乳杆菌种 (Lactobacill us sp.)ATCC1 3133	99.69	88.97	89.21	88.90	99.92	----

[0138] 在所包括比较的 1400 个碱基对中, 表的右上方表示的是有差异的碱基对数, 而左下方表示的是序列同源性的百分比。

[0139] 表 3. 醋杆菌种 (Acetobacter sp.) BC-Y05816s rRNA 核苷酸序列比较

[0140]

	BC-Y058	重氮营养醋 杆菌(A. diazotrophicus)	液化醋杆 菌(A. liqfaciens)	汉氏醋 杆菌(A. hansenii)	木醋杆 菌(A. xylinum)	鸥罗巴醋 杆菌(A. europaeus)
BC-Y058	----	37	34	10	13	14

[0141]

重氮营养 醋杆菌 (<i>A.diazotri ficus</i>)	97.20	----	17	37	35	36
液化醋杆 菌(<i>A. liqfaciens</i>)	97.42	98.71	----	34	32	33
汉氏醋杆 菌(<i>A. hansenii</i>)	99.24	97.20	97.42	----	15	16
木醋杆菌 (<i>A. xylinum</i>)	99.02	97.35	97.58	98.86	----	3
鸥罗巴醋 杆菌(<i>A. europaeus</i>)	98.94	97.27	97.50	98.79	99.77	----

[0142] 在所包括比较的 1320 个碱基对中, 表的右上方表示的是有差异的碱基对数, 而左下方表示的是序列同源性的百分比。

[0143] BC-Y009 是一种革兰氏阳性菌, 大小为 0.5–3.0 μm。它是一种非游动的短杆状菌, 不产生孢子, 为兼性厌氧菌。生长温度为 20–37°C, pH 范围为 2.0–8.0, 最适 pH 为 4.0–7.0。实验结果显示该菌在牛奶中凝结, 对过氧化氢酶表现为阴性反应(不反应), 在丰富培养基中形成白色菌落。它在 MRS 和 BSH 液体培养基中以白色胶囊沉淀出来。液体培养基的浊度清亮, 微生物产生的胞外多糖在透明的培养基中, 如震荡液体培养基, 则胞外多糖(食用性纤维)碎成小颗粒。

[0144] BC-Y058 是革兰氏阴性菌, 杆状, 大小为 0.6–0.8 μm, 以单个或成对存在。也是非游动不产生孢子。其生长速率慢, 需要 5–7 天培养时间, 所形成的菌落既小又硬。在液体培养基中可形成透明的纤维素菌膜。乙醇, 乙酸或乳酸能用作底物, 对过氧化氢酶表现为阳性反应。该种微生物可利用葡萄糖产酸, 但在 Hoyer 培养基中不生长。

[0145] 考虑到表型和 16S rRNA DNA 序列分析的结果, BC-Y009 命名为乳杆菌种 (*Lactobacillus* sp.) BC-Y009, BC-Y058 命名为醋酸杆菌种 (*Acetobacter* sp.) BC-Y058。它们于 2000 年 5 月 30 日被保藏于 KCTC(韩国典型培养物保藏中心), 保藏号分别为: KCTC BC-Y009, KCTCBC-Y058。

[0146] 实施例 3.

[0147] 肠道消化酶降解胞外多糖(食用性纤维)的程度

[0148] 为了测定所述微生物产生的食用性纤维是否被肠道消化酶降解, 1g 猪胰酶制剂 (sigma 公司生产) 显示 3 倍的美国药典活性, 其包含了淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶和核酸酶, 将其悬浮在 1g 干的食用性纤维的缓冲液 (pH7.5) 中。该悬浮液 40°C 培养 7 天, 悬浮液每天收集一次, 其中的葡萄糖使用 DNS(3,5-二硝基水杨酸) 定量测定。测定结果显示食用性纤维根本不被分解。

[0149] 因此可证实本发明的微生物所产生的食用性纤维在肠道内不降解。

[0150] 实施例 4.

[0151] 细菌对葡萄糖的吸收速率

[0152] 已知为微生态调节菌的嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) (KCTC3140) 和希氏乳杆菌 (*L. hilgardii*) (KCTC3500) 以及所述乳杆菌 (*Lactobacillus*) BC-Y009, 醋酸杆菌 (*Acetobacter*) BC-Y002, 醋酸杆菌 (*Acetobacter*) BC-Y058 和大肠杆菌 (*E. coli*) 的葡萄糖吸收速率在肠道条件下进行测定。结果表示在图 1 和表 4 中。

[0153] 如图 1 和表 4 所阐明, 根据葡萄糖的吸收速率, 本发明的微生物优于其他乳酸菌。

[0154] 表 4. 每单位 O. D. 每单位时间的菌葡萄糖浓度的降低

[0155]

	初始 O.D.600nm	初始葡萄糖浓度	一小时后的葡萄糖	每单位时间单位 O.D. 葡
--	--------------	---------	----------	----------------

[0156]

		(mM)	浓度(mM)	葡萄糖浓度的降低值 (mM/hr/O.D.)
<i>E. coli</i>	3.0±0.1	110	85±0.5	8.3±0.44
BC-Y009	3.0±0.2	110	50±0.3	20±1.5
BC-Y002	3.0±0.1	110	30±0.7	26.6±1.1
BC-Y058	3.0±0.2	110	38.6±0.3	23.8±0.1
KCTC3500	3.0±0.2	110	67.2±0.3	14.2±0.4
KCTC3140	3.0±0.1	110	65.2±0.4	14.4±0.1

[0157] 实施例 5.

[0158] 施给微生物后肠道中微生物的浓度和存活比率

[0159] 小鼠 C57BL/6J Lep^{ob}/ob (下简称“OB 小鼠”) 被遗传性地诱导为肥胖症和糖尿病, 饥 18 小时, 连续 7 天喂食含 1% (w/w 干重) 乳杆菌 (*Lactobacillus*) BC-Y009 和醋酸杆菌 (*Acetobacter*) BC-Y058 的本发明组合物 (组合物中的微生物数为 1.0×10^{13} CFU/g), 然后再分析这些小鼠十二指肠、空肠和大肠中的菌浓度。同时, 喂食不含本发明微生物的对照 OB 小鼠, 对其十二指肠、空肠和大肠中的菌浓度也进行分析。

[0160] 为了测定乳杆菌的量, 已经喂食乳杆菌的小鼠和对照组的小鼠, 它们的十二指肠、空肠和大肠都被切取出来。器官的每一个表面都用生理盐水中淋洗, 并将内容物悬浮于生理盐水中。然后接种于 MRS 琼脂培养基中 37°C 培养。3 天后, 絮凝物计数减去对照组乳杆菌量测定出菌量从而确定菌量的变化 (表 5)。

[0161] 为了证实醋酸杆菌的存在, 小鼠的每一个器官都被取出, 用生理盐水溶液淋洗器官表面。内容物悬浮于生理盐水溶液中, 然后接种于 BSH 液体培养基中 37°C 培养 3 天。通过检查出现在液体培养基上层的菌膜, 可证实产纤维醋酸杆菌的存在 (表 6)。

[0162] 根据表 5 和表 6 所示的结果, 所述两种微生物皆能够在肠道中增殖。

[0163] 表 5. 小鼠十二指肠、空肠和大肠中乳杆菌种 (*Lactobacillus* sp.) 量

[0164]

肠道区域	重量 (g)	细菌数 (CFU/g)	膜生成存在
十二指肠	0.18±0.03	83±20	否
空肠	0.29±0.05	1.2×10 ³ ±50	否
大肠	0.36±0.07	5.1×10 ³ ±30	是

[0165] 表 6. 小鼠十二指肠、空肠和大肠中醋酸杆菌种 (Acetobacter sp.) 量

[0166]

肠道区域	重量 (g)	膜生成存在
十二指肠	0.20±0.02	否
空肠	0.28±0.04	是
空肠	0.35±0.03	是

[0167] 实施例 6.

[0168] 喂食 BC-Y009 和 BC-Y058 后血糖水平的变化

[0169] 100g 小鼠饲料购自 SAMYANG 公司, 与 400g 韩国大米混合成为一组合物, 其碳水化合物含量为 60%, 然后将 5g 干乳杆菌 BC-Y009 或醋酸杆菌 BC-Y058 加进来制成冻干片剂。用该种片剂伴水喂食小鼠。

[0170] 所有用于本实施例的小鼠皆为雌性 OB 小鼠。醋酸杆菌喂食组 (OB-058), 乳杆菌喂食组 (OB-009) 和对照组 (OB-con, 即饲料中不含本发明的微生物) 分开饲养。饲养条件是 12 小时的光照周期 (9:00-21:00 灯亮, 21:00-9:00 灯灭), 温度维持在 20-24°C, 湿度在 40-60%。

[0171] 另外, 将肠衣溶液喷雾到干燥的乳杆菌 BC-Y009 或醋酸杆菌 BC-Y058 生成含有肠衣微生物的本发明组合物。包括在组合物中的肠衣物质的重量每片约为 16-30mg 或更少。这些制作肠衣的物质选自常规的高分子物质如纤维素乙酸邻苯二甲酸酯, 偏苯三酸酯, 甲基丙烯酸共聚物 (甲基丙烯酸含量 40% 或以上, 特别是包括羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸及其酯类衍生物的甲基丙烯酸共聚物) 或它们的混合物。

[0172] 在本实施例中使用的甲基丙烯酸是 Endragit L 100-55, 由德国 Rohm GmbH 生产, 纤维素乙酸邻苯二甲酸酯粘度 45-90cp, 乙酰含量 17-26%, 邻苯二甲酸含量 30-40%。或者, 使用纤维素乙酸偏苯三酸酯, 其由 Eastman 科达公司生产, 粘度约 15-20cs, 乙酰含量 17-26%, 偏苯三甲酰含量 25-35%。

[0173] 肠衣制作采用常规包衣方法。将肠衣溶液喷雾到核心上。使用乙醇和丙酮溶剂混合物, 软化剂以 1 比大约 0.005 或 0.3 的比例加入到包衣溶液中。

[0174] 使用上述方法制成的本发明肠包衣组合物和水一起提供给小鼠自由服用。测定已经服用肠包衣组合物的小鼠血糖水平。

[0175] 在测定每一组小鼠的血糖水平之前, 每个小鼠禁食 18 小时。在禁食后的 60 分钟内, 提供足够量的饲料, 在 60 分钟后, 从后眼眶静脉丛用无抗凝剂的毛细血管收集血清。

[0176] 血糖水平采用酶比色法的 Trinder 试剂盒 (Cat. 315-500, 美国 Sigma) 在 505nm 处测定吸光度。结果的统计学误差以每个实验组平均值 ± 标准偏差来表示, 每个组平均差别的统计学上的显著性通过 ANOVA 测试 ($P < 0.02$)。

[0177] 血糖水平数据显示在图 2 中。如图 2 所示, OB-con 组的血糖水平约为 500mg/dl, 而 OB-058 血糖水平较低。此外, 由于施给了醋酸杆菌 BC-Y058 和乳杆菌 BC-Y009, 每只小鼠的血糖水平都降低了约 70% 和 53% (表 7.)。

[0178] 表 7. 施用醋酸杆菌 BC-Y058 和乳杆菌 BC-Y009 后血糖水平的变化

[0179]

	OB-009	OB-058	OB-con
血糖水平 (mg/dl)	229±16	141±19	492±60

[0180] 实施例 7.

[0181] 由于服用 BC-Y058 和 BC-Y009 饮食量和体重的变化及代谢效率

[0182] 小鼠划分为三组 :OB-Y058 组, OB-Y009 组, OB-con 组, 醋酸杆菌 BC-Y058 和乳酸杆菌 BC-Y009 给每组施用并每隔一周检测每只小鼠的体重。除了检测体重的变化外, 小鼠消耗饲料的量也进行测定, 因此可调查每组代谢效率的变化。

[0183] 在遗传特征有区别的每个种中, 体重变化的差异是明显的, 但在遗传特征相同的组中, 体重变化的差异可忽略不计。如表 8 所示, 在 7 周内, 不管其施使用了醋酸杆菌 BC-Y058 或乳杆菌 BC-Y009, OB 小鼠的体重都约增加了 47% 的体重。但如表 9 和表 10 显示的相反, 依赖于所施用的微生物, 饲料消耗百分比在 OB 小鼠组中增加了 17-24%。

[0184] 那就是, 在消耗含有本发明微生物饲料的情况下, 体重增加与喂食不含本发明微生物的饲料时所获得的体重增加相同。结果表明醋酸杆菌 BC-Y058 和乳杆菌 BC-Y009 在饭后抑制了血糖水平, 因此作为补偿, 可消耗更多的饲料。由于 BC-Y058 和 BC-Y009 微生物将葡萄糖转化成食用性纤维, 代谢效率发生了改变。

[0185] 根据如下代表的公式, 计算出能量效率的变化, 其依赖于饲料消耗, 在表 10 中表示出来。

[0186] 能量代谢效率 = (体重增加 (g) / 饲料量 (g)) × 1000

[0187] 如表 10 所示, 假如微生物给 OB 小鼠施用, 当与不使用本发明微生物的对照组相比较时, 能量代谢效率为 75-85% (图 3)。

[0188] 表 8. 小鼠体重 (g) 的变化

[0189]

	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周
OB-009	21.5±3.21	26.53±2.72	31.52±3.01	34.91±2.5	37.6±2.53	40.1±1.74	41.4±1.47
OB-058	21.95±5.3	26.75±4.60	31.65±2.33	35.8±1.27	38.25±0.78	40.35±0.64	41.25±0.21
OB-con	21.4±2.83	26.3±1.56	31.9±0.99	35.8±2.12	38.35±2.33	40.1±2.69	41.75±3.61

[0190] 表 9. 根据施用醋酸杆菌 BC-Y058 和乳杆菌 BC-Y009 后饲料消耗量的变化 (g)

[0191]

	0-16 天	16-21 天	21-34 天	34-41 天	总量
OB-009	146.3	32.4	110.7	38.6	328
OB-058	157.4	34.3	115.3	41	348
OB-con	128.1	34.8	80.3	36.5	279.7

[0192] 表 10. 能量代谢效率

[0193]

	饲料量 (g)	体重增加量 (g)	能量代谢效率	平均体重 (g)	体重增加速率
OB-009	328	19.9	121	41.4	0.48
OB-058	348	19.3	111	41.25	0.47
OB-con	279.7	20.35	146	41.75	0.49

[0194] 实施例 8.

[0195] 施用 BC-Y058 和 BC-Y009 后的脂水平变化

[0196] 本发明微生物施用后,分析血脂的变化尤其是胆固醇的变化并证实微生物除糖尿病和肥胖症以外是否影响循环疾病如动脉硬化和心肌梗塞。

[0197] 脂分析如实施例 6 中采用酶比色法进行,通过使用 TG-glycezyme-V(Young-Yeoun 化学公司,日本),HDL-zyme-V(Young-Yeoun 化学公司,日本),Cholestezyme-V(Young-Yeoun 公司,日本),LDL 胆固醇(Cat. 61532,BioMerieux,法国),参照标准液在 505-570nm 处测定吸光度,然后计算出血脂量。

[0198] 如表 11 所示,在喂食饲料前脂浓度在肥胖小鼠中未显出任何差别,但施给醋酸杆菌 BC-Y058 和乳杆菌 BC-Y009 后如表 12 所示,7 周后脂浓度有明显变化。

[0199] 肥胖小鼠在服用过本发明微生物后,脂浓度与本实验早期阶段的数据比较无变化,并且未服用过本发明微生物的对照小鼠,则血中总脂含量提高了。

[0200] 表 11. 施用饲料前血脂量 (mg/dl)

[0201]

	总胆固醇	TG	HDL-C	LDL-C
OB-009	130.22±4.11	98.1±11.4	98.73±9.7	4.18±2.36
OB-058	129.37±4.24	101.6±10.36	113.52±15.47	3.35±2.08
OB-con	127.57±4.32	97.13±14.64	96.86±7.61	6.62±2.78

[0202] N = 4

[0203] TG : 甘油三酯

[0204] HDL-C : 高密度脂蛋白胆固醇

[0205] LDL-C : 低密度脂蛋白胆固醇

[0206] 表 12. 喂食饲料后血脂量 (mg/dl)

[0207]

	总胆固醇	TG	HDL-C	LDL-C
OB-009	167.04±1.12	100.76±3.2	157.71±2.4	4.2±2.08
OB-058	*135.25±2.47	98.5±2.83	135±1.41	3.36±1.31
OB-CON	*174±1.41	110.5±1.06	165.25±1.06	3.19±0.36

[0208] N = 4, *P < 0.05

[0209] TG : 甘油三酯

[0210] HDL-C : 高密度脂蛋白胆固醇

[0211] LDL-C : 低密度脂蛋白胆固醇

[0212] 本发明的工业应用性

[0213] 本发明中微生物能在肠内生存,将单糖和双糖转化为高分子量物质,该物质在肠

内不能被吸收和难以消化,这样就显著降低了可吸收的单糖量,导致在代谢活性中所需的能量由积累在体内的脂肪和蛋白质提供,因此有效地抑制了肥胖症和糖尿病。此外,本发明中的微生物在肠内产生的食用性纤维,使之随有害物质一起排泄掉,可预防阑尾炎,大肠癌,抑制胆固醇的吸收以及清洁肠道等。

[0214] 当本发明参照所列举的实施例已经详细地展示和阐述时,本领域的技术人员能够理解形式上和细节的各种变化可以在不背离所附权利要求书所限定的实质和范围的前提下得出。

[0215] 根据布达佩斯条约用于专利途径的微生物保藏国际识别

[0216] 国际表格

[0217] 原始保藏收据

[0218] 根据第 7.1 条颁布

[0219] 授予人 :Bioneer 公司

[0220] 韩国高科技园区

[0221] #124. Chuckbook-ri, Namee-myun, Cheongwon-kun, Chungbuk 363-810

[0222]

I. 微生物的识别	
保藏者给出的识别号: Lactobacillus sp. BC-Y009	国际保藏单位给出的登记号: KCTC 0774BP
II. 科学描述和/或建议的分类名称	
有关 I 识别的微生物: <input checked="" type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类名称 (×表示适用)	
III. 收据和接收	
国际保藏单位已接收 I 识别的微生物, 收到日: 2000 年 5 月 3 日	
IV. 转换请求收据	
国际保藏单位于 年 月 日收到 I 识别的微生物, 于 年 月 日收到将原始保藏转换为在布达佩斯条约下的保藏请求。	
V. 国际保藏单位	
姓名: 韩国典型培养物保藏中心 地址: 韩国生命科学和生物技术研究所 (KRIBB) #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon 305- 333, 韩国	国际保藏单位官员授权人 签名: 日期: 2000 年 5 月 12 日

[0223] 根据布达佩斯条约用于专利途径的微生物保藏国际识别

[0224] 国际表格

[0225] 原始保藏收据

[0226]

根据第 7.1 条颁布

[0227] 授予人 :Bioneer 公司

[0228] 韩国高科技园区

[0229] #124. Chuckbook-ri, Namee-myun, Cheongwon-kun, Chungbuk 363-810

[0230]

I. 微生物的识别	
保藏者给出的识别号: Acetobacter sp. BC-Y058	国际保藏单位给出的登记号: KCTC 0773BP
II. 科学描述和/或建议的分类名称	
有关 I 识别的微生物: <input checked="" type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类名称 (×表示适用)	
III. 收据和接收	
国际保藏单位已接收 I 识别的微生物, 收到日: 2000 年 5 月 3 日	
IV. 转换请求收据	
国际保藏单位于 年 月 日收到 I 识别的微生物, 于 年 月 日收到将原始保藏转换为在布达佩斯条约下的保藏请求。	
V. 国际保藏单位	
姓名: 韩国典型培养物保藏中心 地址: 韩国生命科学和生物技术研究所 (KRIBB) #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon 305- 333, 韩国	国际保藏单位官员授权人 签名: 日期: 2000 年 5 月 12 日

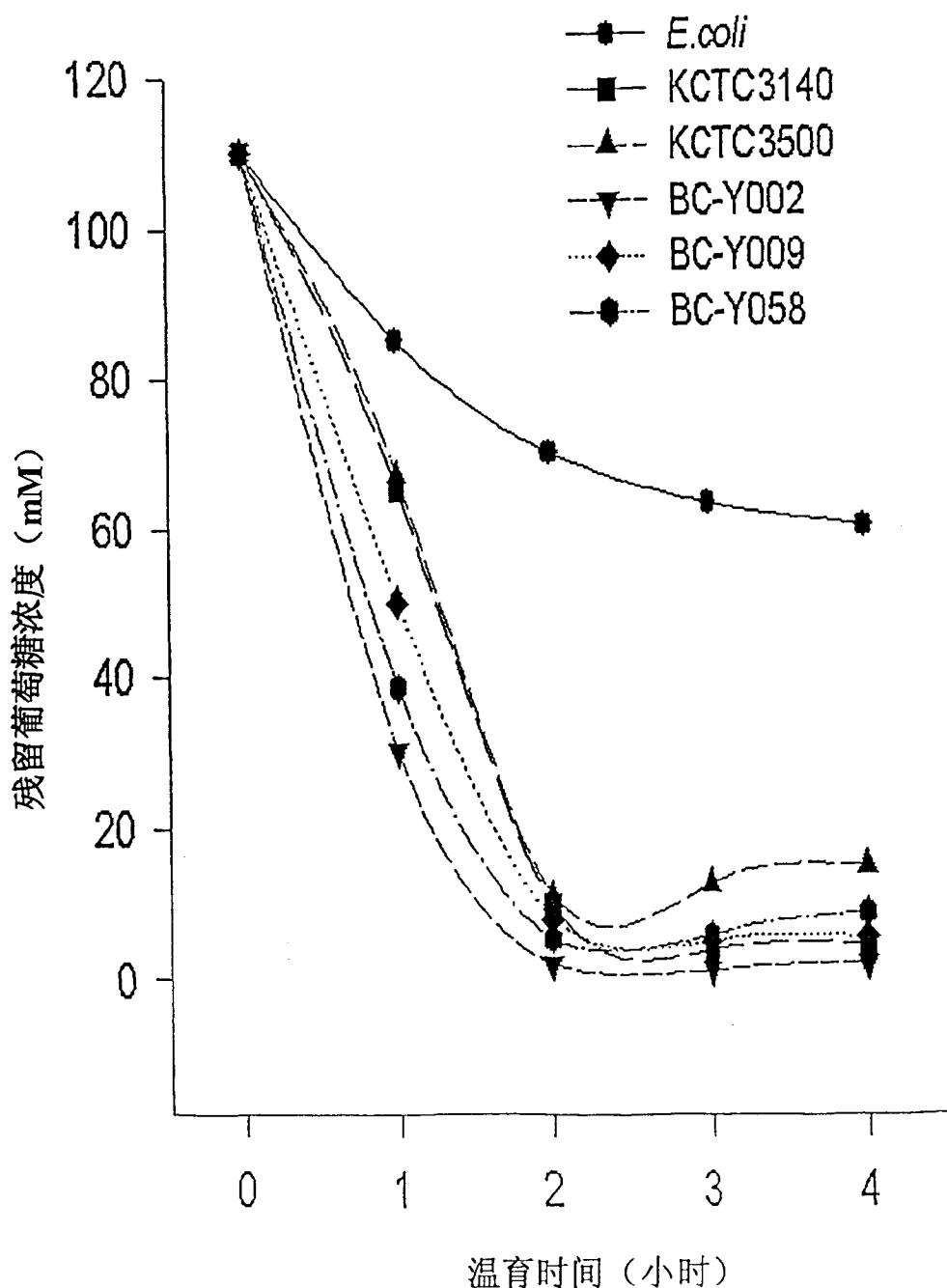


图 1

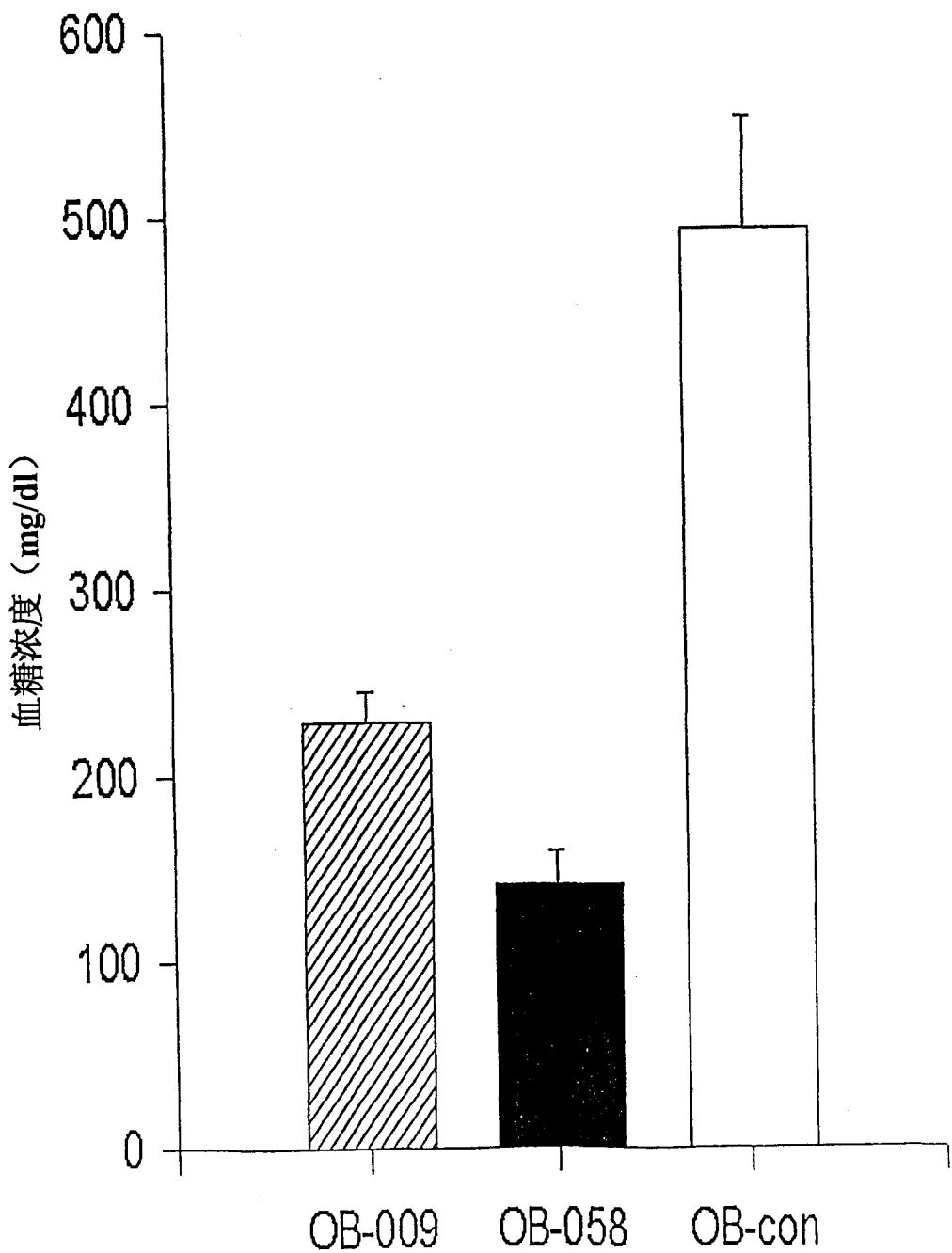


图 2

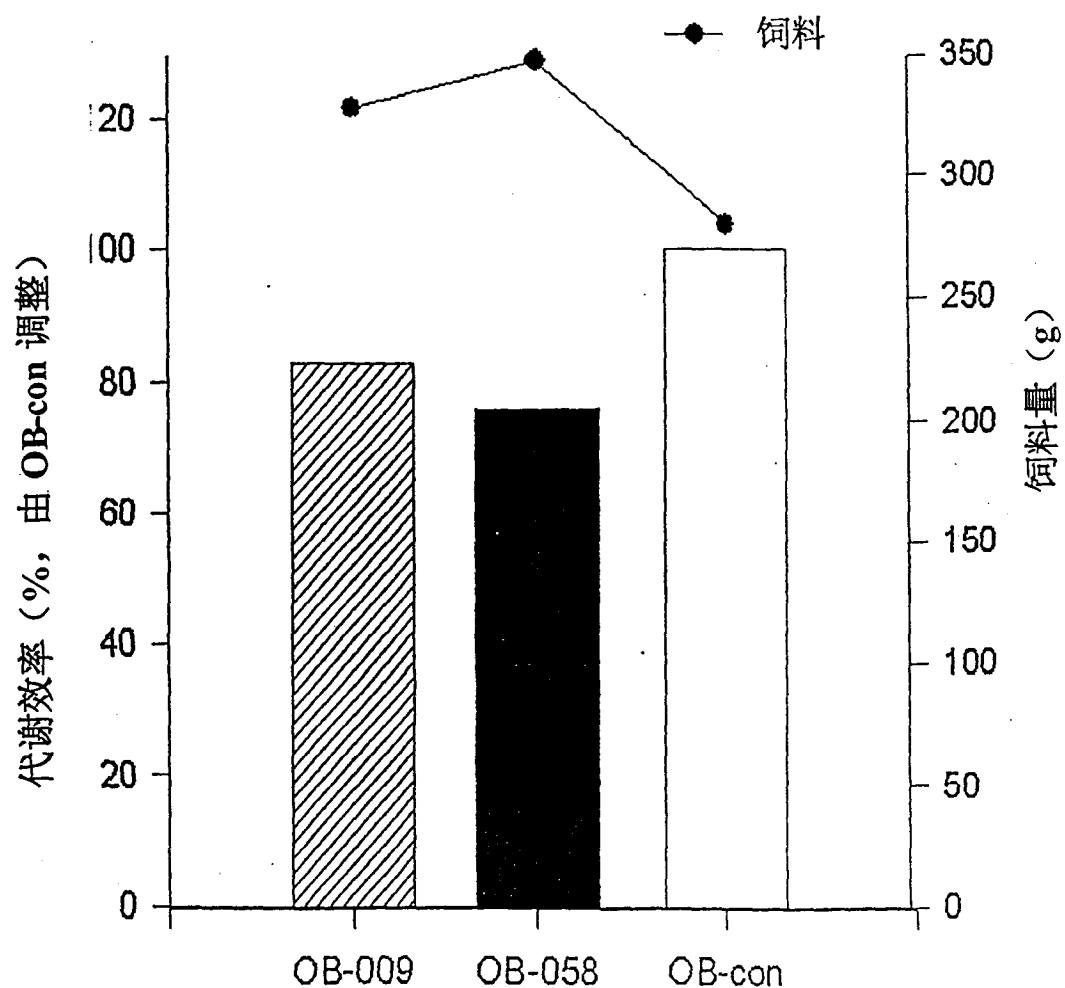


图 3

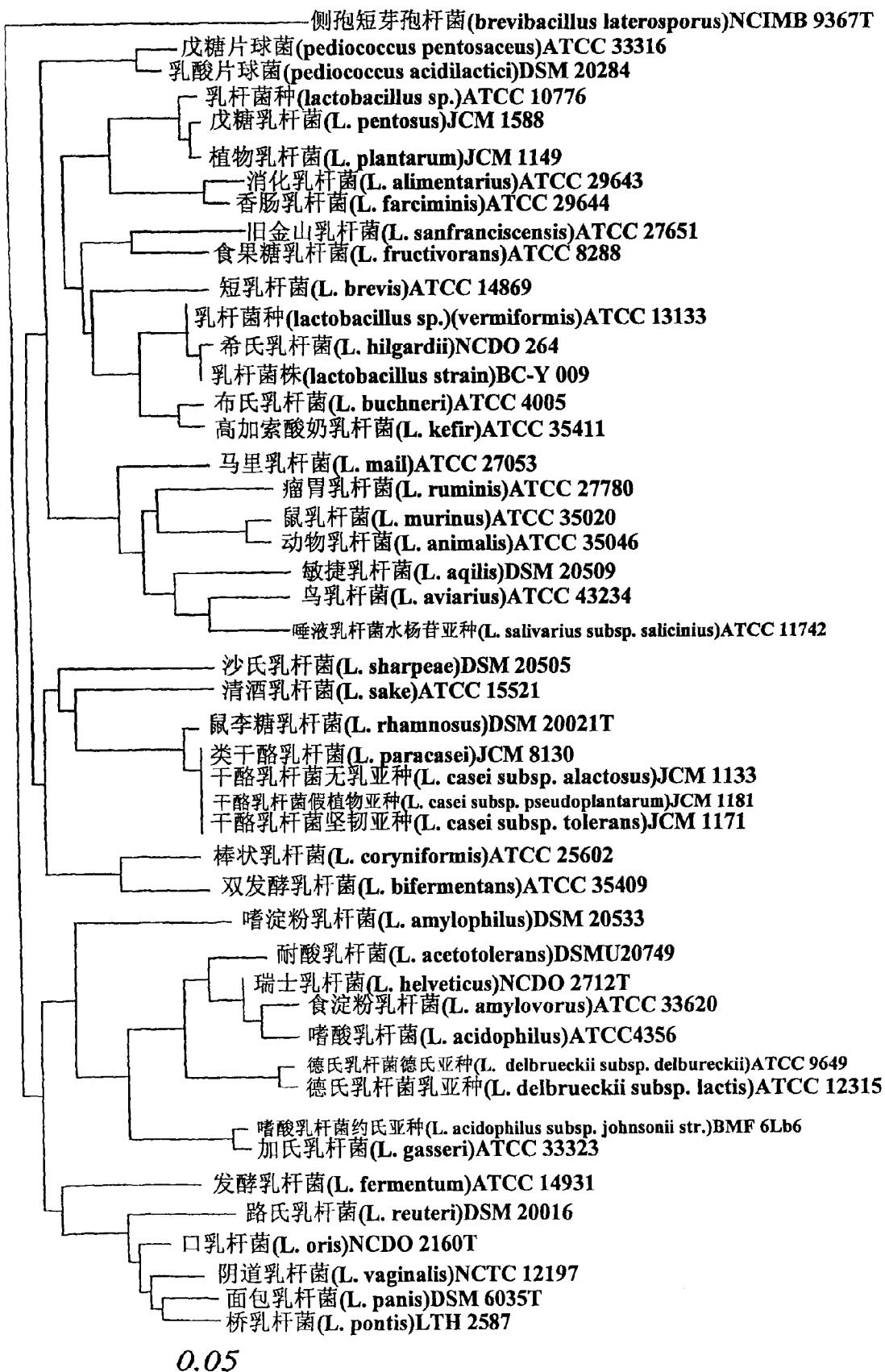
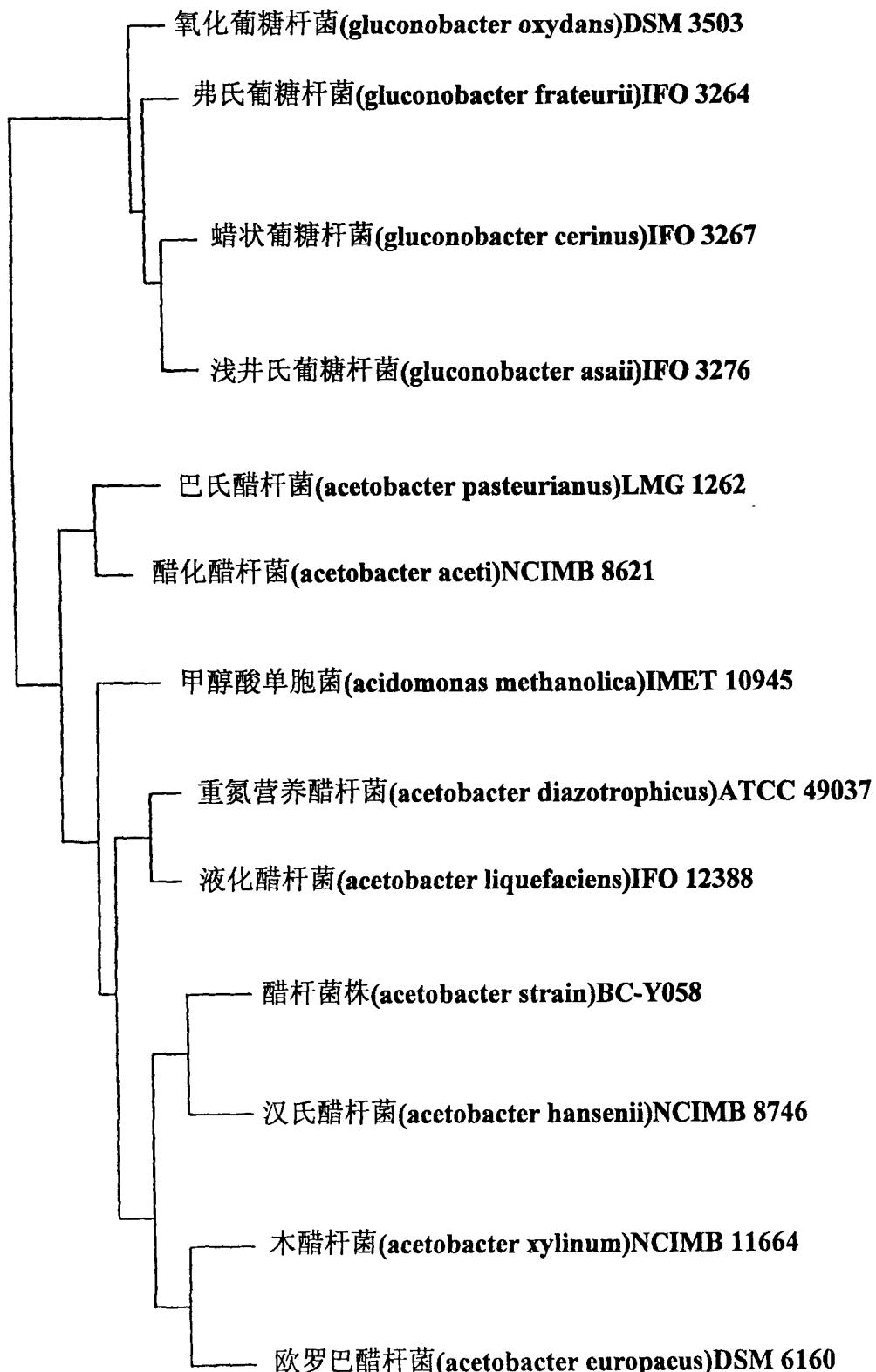


图 4



0.05

图 5