



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I778616 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 09 月 21 日

(21)申請案號：110116402

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 05 月 06 日

(51)Int. Cl. :            *C12N1/20 (2006.01)*            *C12P7/52 (2006.01)*  
                               *C12P1/04 (2006.01)*            *A61K31/185 (2006.01)*  
                               *A61P29/00 (2006.01)*            *A23L33/135 (2016.01)*  
                               *C12R1/01 (2006.01)*

(71)申請人：財團法人食品工業發展研究所(中華民國) FOOD INDUSTRY RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE (TW)

新竹市東區食品路 331 號

(72)發明人：黃建勳 HUANG, CHIEN-HSUN (TW)；許璿文 HSU, LI-WEN (TW)；劉忠憲 LOIU, JONG-SHAN (TW)；陳怡靜 CHEN, I-CHING (TW)；謝松源 HSIEH, SUNG-YUAN (TW)；陳倩琪 CHEN, CHIEN-CHI (TW)

(74)代理人：高玉駿；楊祺雄

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 911054 2021 年 04 月 20 日

(56)參考文獻：

期刊 Kathleen Machiels, Marie Joossens, João Sabino, Vicky De Preter, ngrid Arijs, Venessa Eeckhaut, Vera Ballett, Karolien Claes, Filip Van Immerseel, Kristin Verbeke, Marc Ferrante, Jan Verhaegen, Paul Rutgeerts, Séverine Vermeire, "A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis", *Inflammator*

期刊 P. Louis, K.P. Scott, S.H. Duncan, H.J. Flint, "Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine", *Journal of Applied Microbiology* I, Volume 102, Issue 5, 2007, 1197-1208.

審查人員：蘇品嘉

申請專利範圍項數：10 項      圖式數：4      共 38 頁

(54)名稱

具有高丁酸生產能力的人羅斯拜瑞氏菌 HGM001 分離株及其用途

(57)摘要

本發明揭示一株具有高丁酸生產能力的人羅斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*) HGM001 分離株，它以寄存編號 BCRC 911054 被寄存於財團法人食品工業發展研究所(FIRDI)的生物資源保存及研究中心(BCRC)。該人羅斯拜瑞氏菌 HGM001 分離株可被用於生產丁酸以及改善發炎性障礙。

指定代表圖：

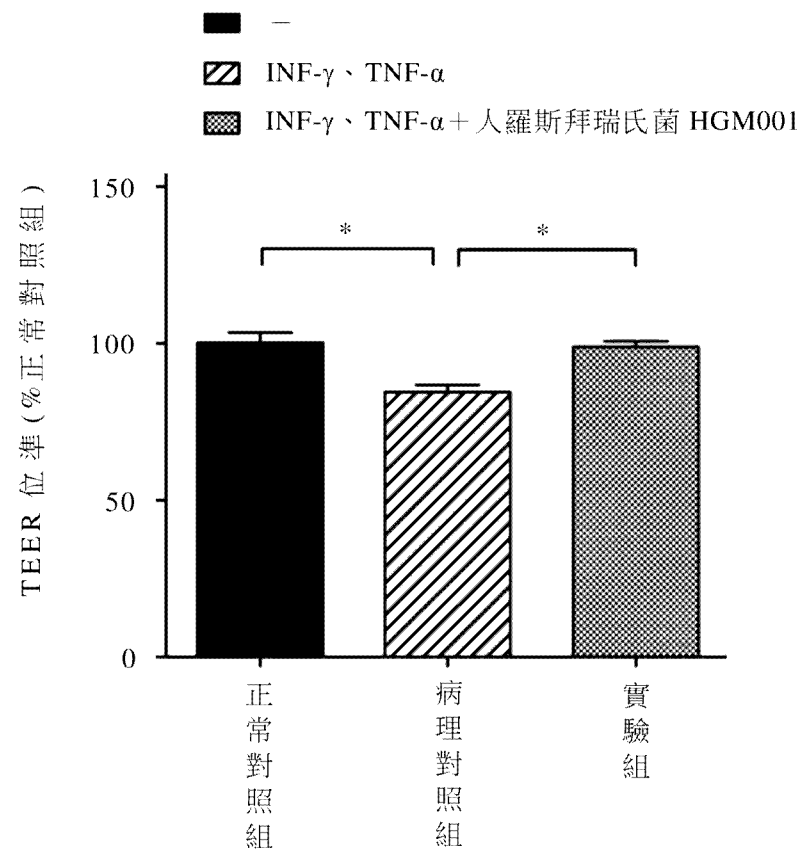


圖 4



I778616

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 具有高丁酸生產能力的人羅斯拜瑞氏菌HGM001  
分離株及其用途

### 【中文】

本發明揭示一株具有高丁酸生產能力的人羅斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) HGM001 分離株，它以寄存編號 BCRC 911054 被寄存於財團法人食品工業發展研究所(FIRDI)的生物資源保存及研究中心(BCRC)。該人羅斯拜瑞氏菌HGM001分離株可被用於生產丁酸以及改善發炎性障礙。

【指定代表圖】 圖4

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 具有高丁酸生產能力的人羅斯拜瑞氏菌HGM001  
分離株及其用途

### 【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一株具有高丁酸生產能力(high butyric acid-producing ability)的人羅斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*) HGM001分離株，它以寄存編號BCRC 911054被寄存於財團法人食品工業發展研究所(Food Industry Research and Development Institute, FIRDI)的生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC)。該人羅斯拜瑞氏菌HGM001分離株可被用於生產丁酸以及改善發炎性障礙(inflammatory disorders)。

### 【先前技術】

【0002】 丁酸(butyric acid)是一種短鏈脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFA)[又被稱為揮發性脂肪酸(volatile fatty acids)]，可經由腸內菌(intestinal bacteria)對難消化性的醣類(indigestible carbohydrates)[諸如抗性澱粉(resistant starch)與膳食纖維(dietary fiber)]進行發酵而被生產出，並且在腸道健康

中扮演了重要的角色，例如，抗發炎(anti-inflammatory)、調節免疫反應(immune response)與腸道屏障功能(intestinal barrier function)等功效(Liu H. *et al.* (2018), *Adv. Nutr.*, 9:21-29)。特別地，已有研究指出，丁酸的產量與抗發炎特性呈現正相關性，並且被預期可用於改善炎症性腸病(inflammatory bowel disease, IBD)以及大腸激躁症(irritable bowel syndrome, IBS)等發炎性障礙(inflammatory disorders)(Martín R. *et al.* (2017), *Front. Microbiol.*, doi: 10.3389/fmicb.2017.01226)。

**【0003】** 此外，丁酸亦是一種常見的工業化學品，被廣泛地應用於食品、化妝品(cosmetic)、藥品(pharmaceutical)以及化學工業(chemical industry)，因而已被視為是一種具有發展價值的化合物。為了因應產業界對於丁酸的廣大需求，各個領域的相關研究人員皆致力於開發可供丁酸生產的腸內菌菌株。

**【0004】** 目前已有許多具有丁酸生產能力的腸內菌菌株[又被稱為丁酸產生菌(butyric acid-producing bacteria)]被分離出，它們大多是屬於普拉梭菌屬物種(*Faecalibacterium* spp.)、真桿菌屬物種(*Eubacterium* spp.)、羅斯氏菌屬物種(*Roseburia* spp.)、糞球菌屬物種(*Coprococcus* spp.)以及梭菌屬物種(*Clostridium* spp.)。例如，在Duncan S.H. *et al.* (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:5186-5190中，Duncan S.H.等人將7株分離自人

類糞便的丁酸產生菌分別接種至 YCFAG 肉湯培養基 (YCFAG broth) 中，並在厭氧與 37°C 的條件下進行發酵培養歷時 24 小時，繼而對所得到的各個發酵培養物進行丁酸含量的測定。而實驗結果顯示，腸道羅斯拜瑞氏菌 (*Roseburia intestinalis*) L1-8185 的發酵培養物的丁酸含量最高 (約 11.6 mM)，其次依序為羅斯氏菌屬物種 (*Roseburia* spp.) A2-183 與 A2-181 分離株 [分別對應於人羅斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) A2-183<sup>T</sup> (DSM 16839<sup>T</sup>) 與 A2-181] 的發酵培養物，其所測得的丁酸含量分別約為 11.4 與 11.0 mM。

【0005】 WO 2017033925 A1 揭示隸屬於柔嫩梭菌亞群 (*Clostridium leptum* subgroup) 的丁酸產生菌及其應用。在該國際專利申請案的實施例中，有將 20 株丁酸產生菌分別接種至 YCG 肉湯培養基 (YCG broth) 中，並在厭氧與 37°C 的條件下進行發酵培養歷時 72 小時，繼而對所得到的各個發酵培養物進行丁酸含量的測定。而實驗結果顯示，只有 4 株丁酸產生菌 [包括腸道羅斯拜瑞氏菌 DSM 14610<sup>T</sup> 以及酪酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) JCM 1391<sup>T</sup>] 的發酵培養物的丁酸含量有超過 10 mM，至於人羅斯拜瑞氏菌 DSM 16839<sup>T</sup> 的發酵培養物所測得的丁酸含量則僅有 1 mM。

【0006】 雖然已存在有上述文獻報導，本技藝中仍然存在有一需要去篩選出具有高丁酸生產能力與抗發炎能力的微生物以供產業界之用。

**【發明內容】****發明概要**

**【0007】** 於本發明中，申請人意外地分離出丁酸生產能力 (butyric acid-producing ability) 顯著高於人羅斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 的習知菌株 (包括 A2-183<sup>T</sup> 與 A2-181) 之一株新穎分離株，它被申請人命名為“人羅斯拜瑞氏菌 HGM001”，並已被寄存於國內寄存機構。

**【0008】** 於是，在第一個方面，本發明提供一種人羅斯拜瑞氏菌 HGM001 分離株，它以寄存編號 BCRC 911054 被寄存於財團法人食品工業發展研究所 (FIRDI) 的生物資源保存及研究中心 (BCRC)。

**【0009】** 在第二個方面，本發明提供一種用於生產丁酸的方法，其包括：使用一如上所述的人羅斯拜瑞氏菌 HGM001 來發酵一含有可發酵糖的基質，而得到一含有丁酸的發酵培養物。

**【0010】** 在第三個方面，本發明提供一種組成物，其包含有一如上所述的方法所製得的發酵培養物。

**【0011】** 在第四個方面，本發明提供一種如上所述的方法所製得的發酵培養物供應用於製備一用來改善發炎性障礙之組成物的用途。

【0012】 在第五個方面，本發明提供一種用於改善發炎性障礙的方法，其包含有對一有此需要的個體投予一如上所述的方法所製得的發酵培養物。

#### 【圖式簡單說明】

【0013】 本發明的上述以及其它目的、特徵與優點，在參照以下的詳細說明與較佳實施例和隨文檢附的圖式後，將變得明顯，其中：

圖1顯示腸內菌分離株HGM001在掃描式電子顯微鏡下所觀察到的結果；

圖2顯示將腸內菌分離株HGM001拿來進行蛋白質指紋質譜分析所得到的質譜圖；

圖3顯示依據本發明的人羅斯拜瑞氏菌HGM001、羅斯氏菌屬物種(*Roseburia* spp.)的標準菌株與習知分離株[亦即，人羅斯拜瑞氏菌 A2-183<sup>T</sup>、AF22-12AC與腸道羅斯拜瑞氏菌(*Roseburia intestinalis*) L1-82<sup>T</sup>]所進行的ANI數值的計算結果而繪製成的譜系樹(phylogenetic tree)；以及

圖4顯示各組的Caco-2細胞單層所測得的TEER位準(%正常對照組)，其中“\*”表示：當與病理對照組作比較， $p < 0.05$ 。

#### 【實施方式】

### 發明的詳細說明

【0014】 要被瞭解的是：若有任何一件前案刊物在此被引述，該前案刊物不構成一個下述承認：在台灣或任何其他國家之中，該前案刊物形成本技藝中的常見一般知識之一部分。

【0015】 為了這本說明書之目的，將被清楚地瞭解的是：文字“包含有(*comprising*)”意指“包含但不限於”，以及文字“包括(*comprises*)”具有一對應的意義。

【0016】 除非另外有所定義，在本文中所使用的所有技術性與科學術語具有熟悉本發明所屬技藝的人士所共同瞭解的意義。一熟悉本技藝者會認知到許多與那些被描述於本文中者相似或等效的方法和材料，它們可被用於實施本發明。當然，本發明決不受到所描述的方法和材料之限制。

【0017】 本發明提供一種人羅斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) HGM001分離株，它以寄存編號BCRC 911054被寄存於財團法人食品工業發展研究所(FIRDI)的生物資源保存及研究中心(BCRC)。

【0018】 本發明亦提供一種用於生產丁酸的方法，其包括：使用一如上所述的人羅斯拜瑞氏菌HGM001來發酵一含有可發酵糖(*fermentable sugars*)的基質，而得到一含有丁酸的發酵培養物。

【0019】 如本文中所使用的，術語“可發酵糖(*fermentable sugars*)”意指在一發酵製程(*fermentation process*)中可被微生物

作為碳源來使用的醣類，包括單醣(monosaccharide)、雙醣(disaccharide)以及多醣(polysaccharide)。

**【0020】** 較佳地，該可發酵糖可選自於由下列所構成的群組：葡萄糖、木糖(xylose)、半乳糖(galactose)、乳糖(lactose)、纖維雙糖(cellobiose)、蔗糖(sucrose)、麥芽糖(maltose)、澱粉(starch)、肝醣(glycogen)、纖維素(cellulose)，以及它們的組合。

**【0021】** 此外，該含有可發酵糖的基質亦可進一步含有1至2 mM的異丁酸(isobutyric acid)。較佳地，該含有可發酵糖的基質可進一步含有1.28 mM的異丁酸。

**【0022】** 依據本發明，該含有可發酵糖的基質可以是熟習此項技藝者自行配製的，或者是商業上可購得的產品，這包括，但不限於：YCG肉湯培養基(YCG broth)、YCFAG肉湯培養基(YCFAG broth)以及YCFAGSC肉湯培養基(YCFAGSC broth)。

**【0023】** 如本文中所使用的，術語“發酵(fermentation)”、“培養(culturing)”以及“培育(cultivation)”可被交換地使用。

**【0024】** 有關發酵的操作程序與參數條件等是落在熟習此項技術之人士的專業素養與例行技術範疇內。在此方面，可以參考，例如，Duncan S.H. *et al.* (2002)(同上述)以及WO 2017033925 A1。

【0025】 依據本發明，該發酵可在37°C下被進行歷時24至72小時。在本發明的一個較佳具體例中，該發酵是在37°C下被進行歷時48小時。

【0026】 依據本發明，該發酵培養物可具有一範圍落在 $1 \times 10^6$ 至 $4 \times 10^9$  CFU/mL內的細菌濃度。在本發明的一個較佳具體例中，該發酵培養物具有一為 $4 \times 10^9$  CFU/mL的細菌濃度。

【0027】 依據本發明，該發酵培養物可進一步被進行一分離處理，而得到一實質上不含有菌體的流體。

【0028】 依據本發明，該分離處理是選自於由下列所構成的群組：過濾處理(filtration treatment)、離心處理(centrifugation treatment)，以及它們的組合。

【0029】 在本發明的一個較佳具體例中，該不含有菌體的流體是藉由將該發酵培養物進行離心處理，繼而進行過濾處理而被獲得。

【0030】 如本文中所使用的，術語“實質上不含有(substantially free of)”意指一被具體指明的組分缺少有意義的含量。較佳地，該組分的含量對於該發酵培養物的性質不具有可測量的影響(measurable effect)。更佳地，該發酵培養物完全不含有該組分。

**【0031】** 本發明亦提供一種如上所述的方法所製得的發酵培養物供應用於製備一用來改善發炎性障礙(inflammatory disorders)之組成物的用途。

**【0032】** 依據本發明，該發炎性障礙可以是一腸道的發炎性障礙，例如，炎症性腸病(inflammatory bowel disease, IBD)以及大腸激躁症(irritable bowel syndrome, IBS)。

**【0033】** 依據本發明，該組成物可以是一食品組成物(food composition)或一藥學組成物(pharmaceutical composition)。

**【0034】** 在某些具體例中，該組成物是一食品組成物，例如呈一食品添加物(food additive)的形式，其可以被添加至一可食性材料(edible material)中以製備一供人類或動物食用的食品產品。依據本發明，該食物產品的實例可包括，但不限於：流體乳品(fluid milk products)，例如牛奶(milk)以及濃縮牛奶(concentrated milk)；發酵乳品(fermented milk)，例如優酪乳(yogurt)、酸乳(sour milk)以及冷凍優格(frozen yogurt)；奶粉(milk powder)；冰淇淋(ice cream)；乳酪(cream cheeses)；乾酪(dry cheeses)；豆奶(soybean milk)；發酵豆奶(fermented soybean milk)；蔬果汁(vegetable-fruit juices)；果汁(fruit juices)；運動飲料(sports drinks)；甜點(confectionery)；果凍(jelly)；糖果(candies)；健

康食品(health foods);動物飼料(animal feeds);飼料添加劑(feed additives);以及膳食補充品(dietary supplements)。

【0035】 在某些具體例中，該組成物是一藥學組成物。

【0036】 依據本發明，該藥學組成物可利用熟習此技藝者所詳知的技術而被製造成一適合於口服投藥(oral administration)或非經腸道投藥(parenteral administration)之劑型(dosage form)。

【0037】 依據本發明，該藥學組成物可進一步包含有一被廣泛地使用於藥物製造技術之藥學上可接受的載劑(pharmaceutically acceptable carrier)。例如，該藥學上可接受的載劑可包含一或多種選自於下列的試劑：溶劑(solvent)、緩衝液(buffer)、乳化劑(emulsifier)、懸浮劑(suspending agent)、分解劑(decomposer)、崩解劑(disintegrating agent)、分散劑(dispersing agent)、黏結劑(binding agent)、賦形劑(excipient)、安定劑(stabilizing agent)、螯合劑(chelating agent)、稀釋劑(diluent)、膠凝劑(gelling agent)、防腐劑(preservative)、潤濕劑(wetting agent)、潤滑劑(lubricant)、吸收延遲劑(absorption delaying agent)、脂質體(liposome)以及類似之物。有關這些試劑的選用與數量是落在熟習此項技術之人士的專業素養與例行技術範疇內。

**【0038】** 依據本發明，該藥學組成物可利用熟習此技藝者所詳知的技術而被製造成一適合於口服投藥的劑型，這包括，但不限於：無菌的粉末、錠劑(tablet)、片劑(troche)、口含錠(lozenge)、丸劑(pellet)、膠囊(capsule)、分散性粉末(dispersible powder)或細顆粒(granule)、溶液、懸浮液(suspension)、乳劑(emulsion)、糖漿(syrup)、酏劑(elixir)、濃漿(slurry)以及類似之物。

**【0039】** 依據本發明，該藥學組成物可以一選自於由下列所構成的群組中的非經腸道途徑來投藥：腹膜內注射(intraperitoneal injection)、胸膜內注射(intrapleural injection)、肌肉內注射(intramuscular injection)、靜脈內注射(intravenous injection)、動脈內注射(intraarterial injection)、關節內注射(intraarticular injection)、滑液內注射(intrasynovial injection)、椎管內注射(intrathecal injection)、顱內注射(intracranial injection)、表皮內注射(intraepidermal injection)、皮下注射(subcutaneous injection)、皮內注射(intradermal injection)、病灶內注射(intralesional injection)、以及舌下投藥(sublingual administration)。

**【0040】** 本發明亦提供一種用於改善發炎性障礙的方法，其包含有對一有此需要的個體投予(administering)一如上所述的方法所製得的發酵培養物。

**【0041】** 如本文中所使用的，術語“投予”以及“投藥 (administration)”可被交換地使用，並且意指藉由任何合適的途徑來對一個體導入 (introducing)、提供 (providing) 或遞送 (delivering) 一預定的活性成分以執行其預期的效用。

**【0042】** 如本文中所使用的，術語“個體 (subject)”意指任何感興趣的哺乳類動物，諸如人 (humans)、猴子 (monkeys)、牛 (cows)、綿羊 (sheeps)、馬 (horses)、豬 (pigs)、山羊 (goats)、狗 (dogs)、貓 (cats)、小鼠 (mice) 以及大鼠 (rats)。

**【0043】** 依據本發明，人羅斯拜瑞氏菌 HGM001 的發酵培養物的投藥劑量與投藥次數會視下列因素而變化：要被治療的疾病之嚴重性，投藥途徑，以及要被治療的個體之年齡、身體狀況與反應。一般而言，人羅斯拜瑞氏菌 HGM001 的發酵培養物可呈單一劑量或是分成數個劑量的形式而被口服地投藥。

**【0044】** 本發明亦提供一種組成物，其包含有一如上所述的方法所製得的發酵培養物。

**【0045】** 依據本發明，該組成物的投藥途徑與劑型以及可供使用之載劑是如上面所述者。

## 較佳實施例之詳細說明

**【0046】** 本發明將就下面的實施例來做進一步說明，但應瞭解的是，該等實施例僅是供例示說明用，而不應被解釋為本發明的實施上的限制。

## 實施例

### 一般實驗材料：

1. 在下面實施例中所使用之含有酵母萃取物(yeast extract)、酪朊(casitone)以及葡萄糖(glucose)的YCG肉湯培養基(YCG broth)是參照WO 2017033925 A1而被製得。
2. 在下面實施例中所使用之含有酵母萃取物、酪朊、脂肪酸(fatty acid)以及葡萄糖的YCFAG肉湯培養基(YCFAG broth)是參照Duncan S.H. *et al.* (2002)(同上述)以及Lopez-Siles M. *et al.* (2012), *Appl. Environ. Microbiol.*, 78:420-428而被製得。
3. 在下面實施例中所使用的YCFAGSC肉湯培養基(YCFAGSC broth)是藉由對該YCFAG肉湯培養基添加以2 g/L的纖維雙糖(cellobiose)以及2 g/L的麥芽糖(maltose)而被製得。
4. 在下面實施例中所使用的YCFAGSC瓊脂平板培養基(YCFAGSC agar plate)是藉由對該YCFAGSC肉湯培養基添加以18 g/L的瓊脂(agar)而被製得。
5. 人類結腸腺癌細胞株(human colon adenocarcinoma cell line) Caco-2的來源與培養：

**【0047】** 在下面實施例中所使用的人類結腸腺癌細胞株Caco-2是得自於台灣的財團法人食品工業發展研究所(Food Industry Research and Development Institute, FIRDI)的生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC)。

**【0048】** Caco-2細胞被培養於含有依格氏最低基本培養基(Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM)(Gibco BRL)[添加有20%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)]的10 cm細胞培養皿(cell culture dish)中，並在培養條件被設定為37°C、5% CO<sub>2</sub>的培養箱中進行培養。之後，大約每隔2-3天更換新鮮的培養基。當細胞密度達到約90%匯聚(confluence)時，進行細胞繼代培養(subculture)。

#### 一般實驗方法：

##### 1. 統計學分析(Statistical analysis)：

**【0049】** 在下面的實施例中，各組的實驗數據是以“平均值(mean)±平均值的標準差(standard deviation, SD)”來表示。所有的數據是藉由成對的史徒登氏t-試驗(paired Student's t-test)來作分析，俾以評估各組之間的差異性。若所得到的統計分析結果是 $p < 0.05$ ，代表有統計學顯著性(statistical significance)。

#### 實施例1. 腸內菌分離株HGM001的篩選與特徵鑑定

**A、腸內菌分離株HGM001的來源與分離：**

**【0050】** 申請人使用健康人類的糞便作為樣品來進行腸內菌的分離與篩選。首先，於一厭氧條件下使用一均質機(型號為ULTRA-TURRAX<sup>®</sup> Tube Drive，廠牌為IKA)來對糞便樣品進行均質處理。接著，對所得到的均質物進行連續稀釋(serial dilution)，然後分別從所得之不同倍數的稀釋液中取出適量的體積並將之均勻塗佈於YCFAGSC瓊脂平板培養基上，繼而於37℃下進行厭氧培養歷時72小時。待菌落(colony)形成後，挑選出在該YCFAGSC瓊脂平板培養基上之菌落，而得到1株腸內菌分離株，被命名為HGM001。

**B、型態觀察(morphological observation)：**

**【0051】** 使用一掃描式電子顯微鏡(Scanning electron microscope)(型號為S-4700，廠牌為Hitachi)對腸內菌分離株HGM001進行觀察以及拍照。

**【0052】** 圖1顯示腸內菌分離株HGM001在掃描式電子顯微鏡下所觀察到的結果。從圖1可見，腸內菌分離株HGM001呈現桿狀、細胞大小約為0.4-3.9 μm，具運動性。

**C、酵素活性(enzymatic activity)的分析：**

【0053】 使用 API ZYM 套組 (bioMérieux) 並依據製造商的操作指南來對腸內菌分離株 HGM001 進行酵素活性的分析。所得到的分析結果被顯示於下面的表 1 中。

表 1. 腸內菌分離株 HGM001 的酵素活性分析結果

| 酵素  | 能否具有所測試的酵素活性 |
|---|--------------|
| 鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)                                     | +            |
| 酯酶(esterase)(C4)  | +            |
| 酯酶脂酶(esterase lipase)(C8)                                       | +            |
| 脂酶(lipase)(C14)   | -            |
| 白胺酸芳基醯胺酶(leucine arylamidase)                                   | +            |
| 纈胺酸芳基醯胺酶(valine arylamidase)                                    | -            |
| 胱胺酸芳基醯胺酶(cystine arylamidase)                                   | -            |
| 胰蛋白酶(trypsin)   | -            |
| $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶( $\alpha$ -chymotrypsin)                       | -            |
| 酸性磷酸酶(acid phosphatase)   | +            |
| 萘酚-AS-BI-磷酸水解酶<br>(naphthol-AS-BI-phosphohydrolase)             | +            |
| $\alpha$ -半乳糖苷酶( $\alpha$ -galactosidase)                       | +            |
| $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase)                         | +            |
| $\beta$ -葡萄糖醛酸酶( $\beta$ -glucuronidase)                        | +            |
| $\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase)                         | +            |
| $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucosidase)                           | +            |
| N-乙酰基- $\beta$ -胺基葡萄糖甘酶<br>(N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase) | -            |
| $\alpha$ -甘露糖苷酶( $\alpha$ -mannosidase)                         | -            |
| $\alpha$ -岩藻糖苷酶( $\alpha$ -fucosidase)                          | -            |

註：“+”表示具有所測試的酵素活性，而“-”表示不具有所測試的酵素活性。

#### D、 脂肪酸的組成分析：

【0054】 有關脂肪酸的組成分析大體上是參考 Chern L.L. *et al.* (2004), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54:1387-1391 當中

所述的方法而被進行。簡言之，使用MIDI Sherlock<sup>®</sup>微生物鑑定系統(MIDI Sherlock<sup>®</sup> Microbial Identification System)並依據製造商的操作指南來對腸內菌分離株HGM001進行甲基化脂肪酸(methylated fatty acids)的萃取，繼而利用該系統的氣相層析儀(gas chromatograph, GC)(Hewlett Packard HP 5890 Series II)來進行脂肪酸的組成分析。而有關該氣相層析儀的各項操作參數與條件被顯示於下面的表2中。

表 2. 氣相層析儀的操作參數與條件

| 操作參數                               | 條件   |
|------------------------------------|--|
| 分離管柱                               | 19091B-102毛細管管柱，它具有一為30 m的長度以及一為0.25 mm的內徑(inside diameter)，並且使用一具有一為0.25 $\mu$ m之厚度的薄膜(film)。   |
| 管柱烘箱<br>(column oven)<br>的升溫程序     | 在一為295 $^{\circ}$ C的起始溫度下維持歷時10分鐘；接著，將溫度下降至190 $^{\circ}$ C後開始注入樣品，繼而依序將溫度上升至285 $^{\circ}$ C (10 $^{\circ}$ C/分鐘)以及310 $^{\circ}$ C (60 $^{\circ}$ C/分鐘)，並於310 $^{\circ}$ C下維持歷時0.42分鐘。 |
| 載體氣體<br>(carrier gas)              | 超高純度氫氣(H <sub>2</sub> )  |
| 注射器<br>(injector)                  | G1512A控制器(G1512A controller)   |
| 注射口溫度<br>(injector<br>temperature) | 250 $^{\circ}$ C   |
| 偵測器<br>(detector)                  | 火焰游離偵檢器<br>(flame ionization detector, FID)  |
| 偵測器溫度<br>(detector<br>temperature) | 300 $^{\circ}$ C   |
| 樣品注射體積                             | 2 $\mu$ L  |

【0055】 所得到的分析結果被顯示於下面的表3中。由表3中可見，腸內菌分離株HGM001的主要脂肪酸為C16:0、C17:0 iso、C17:0以及C16:1 iso H。

表 3. 脂肪酸的種類與含量百分比

| 脂肪酸種類            | 含量百分比(%)  |
|------------------|-----------|
| C16:0            | 26.1±0.68 |
| C17:0 iso        | 17.0±0.53 |
| C17:0            | 13.6±0.84 |
| C16:1 iso H      | 14.3±0.5  |
| C16:1 2OH        | 6.5±0.3   |
| C16:0 N alcohol  | 4.6±0.17  |
| C13:1 at 12-13   | 2.9±0.24  |
| 16:0 iso         | 2.6±0.03  |
| 18:00            | 1.9±0.21  |
| C15:0 iso        | 1.0±0.08  |
| summed feature 1 | 6.6±0.65  |

註：summed feature 1包含C15:1 iso H / 13:0 3OH或C13:0 3OH / 15:1 iso H。

#### E、 蛋白質指紋質譜分析(protein fingerprinting)：

【0056】 為初步瞭解腸內菌分離株HGM001所屬的菌種，參考Lagier J.C. *et al.* (2012), *Clin. Microbiol. Infect.*, 18:1185-1193並使用一介質-輔助雷射脫附離子化-飛行時間質譜儀(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)(型號為Microflex LT，廠牌為Bruker)來對腸內菌分離株HGM001進行蛋白質指紋質譜分析。

**【0057】** 所得到之腸內菌分離株HGM001的蛋白質指紋質譜圖被顯示於圖2中，而其質譜訊號經與MALDI Biotyper微生物鑑定系統資料庫比對後發現，腸內菌分離株HGM001的蛋白質指紋質譜訊號與人羅斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*) A2-183<sup>T</sup> (對應於JCM 17582以及DSM 16839<sup>T</sup>)所具者之間具有最高的相似性(比對的得分數值為2.59)。

#### **F、 16S rDNA序列分析(16S rDNA sequence analysis)：**

**【0058】** 首先，使用FavorPrep<sup>TM</sup>血液基因組DNA萃取迷你套組 (FavorPrep<sup>TM</sup> Blood Genomic DNA Extraction Mini Kit)(FAVORGEN)來萃取腸內菌分離株HGM001的基因組DNA，繼而以所得到的基因組DNA作為模板(template)，並使用一組針對細菌的16S rDNA基因而設計之具有下面所示的核苷酸序列的引子對(primer pair)前向引子8F與反向引子1540R來進行聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)，俾以擴增出腸內菌分離株HGM001的16S rDNA片段。有關PCR的反應條件被顯示於下面的表4中。

前向引子8F

5'-ggagtttgatcctggctcag-3' (序列辨識編號：1)

反向引子1540R

5'-aaggaggtgatccagcc-3' (序列辨識編號：2)

表 4. PCR 的反應條件

| 內容物                                | 體積( $\mu\text{L}$ ) |
|------------------------------------|---------------------|
| 腸內菌分離株 HGM001 的基因組 DNA             | 2                   |
| 前向引子 8F (100 pM)                   | 2.4                 |
| 反向引子 1540R (100 pM)                | 2.4                 |
| dNTPs (200 $\mu\text{M}$ )         | 1.2                 |
| 10X 緩衝溶液                           | 9                   |
| Tag DNA 聚合酶(2.5 U/ $\mu\text{L}$ ) | 0.5                 |
| 去離子水                               | 72.5                |

操作條件：在 94°C 下進行變性反應(denaturation)歷時 5 分鐘，接而進行 30 個循環如下：在 94°C 下進行變性反應歷時 1 分鐘、在 60°C 下進行引子黏合(primer annealing)歷時 1 分鐘，以及在 72°C 下進行延伸反應(extension)歷時 7 分鐘。

**【0059】** 於完成 PCR 之後，藉由 2% 瓊脂糖凝膠電泳(agarose gel electrophoresis)來確認有否得到一大小約為 1,480 bp 的 PCR 擴增產物，並從凝膠回收純化該經確認的 PCR 產物。

**【0060】** 之後，委託明欣生物科技有限公司(Mission Biotech Co., Ltd)來進行定序分析，而得到腸內菌分離株 HGM001 的 16S rDNA 序列(序列辨識編號：3)。經與 NCBI 網站中的基因資料庫以及 EzBioCloud 平台上的基因資料庫比對後發現，腸內菌分離株 HGM001 的 16S rDNA 序列與人羅斯拜瑞氏菌 A2-183<sup>T</sup> 的 16S rDNA 序列[Genbank 登錄編號(accession number): CP003040.1] 之間具有 100% 的相似性。

【0061】 綜合上面第B至F項的實驗結果，本發明的腸內菌分離株HGM001被初步鑑定是人羅斯拜瑞氏菌，而為了確認它是否為一種新穎的人羅斯拜瑞氏菌分離株，進一步進行下面第G項的分析。

**G、 譜系分析(phylogenetic analysis)：**

【0062】 將依據上面第F項當中所得到的基因組DNA拿來進行一超音波震盪處理，以使得該基因組DNA被片斷化成具有長度約為350 bp的DNA片段。接著，使用NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> DNA Library Prep Kit for Illumina<sup>®</sup> (New England Biolabs, Ipswich, Mass.) 並依據製造商的操作指南來建構人羅斯拜瑞氏菌HGM001的DNA庫(DNA library)。之後，委託源資國際生物科技股份有限公司(Tri-I Biotech, Inc.)來進行次世代定序(next generation sequencing, NGS)，而得到人羅斯拜瑞氏菌HGM001的全基因體序列(3,533,908 bp)。

【0063】 經與NCBI網站中的基因資料庫以及EzBioCloud平台上的基因資料庫比對，選用羅斯氏菌屬物種(*Roseburia* spp.)的標準菌株與習知分離株[包括人羅斯拜瑞氏菌A2-183<sup>T</sup>、AF22-12AC以及腸道羅斯拜瑞氏菌(*Roseburia intestinalis*) L1-82<sup>T</sup> (對應於DSM 14610<sup>T</sup>)]，並使用異種同源平均核苷酸相似度工具(OAT)軟體 [Orthologous Average Nucleotide Identity Tool (OAT) software]來進行譜系分析，接著使用分子演化遺傳學分析軟體

(molecular evolutionary genetics analysis software, MEGA)(Pennsylvania State University, USA)並藉由最大概似方法 (maximum likelihood method) 而繪製出一譜系樹 (phylogenetic tree)。所得到的結果被顯示於圖3中。

**【0064】** 從圖3可見，人羅斯拜瑞氏菌HGM001與最接近的人羅斯拜瑞氏菌 A2-183<sup>T</sup> 的平均核苷酸相似度 (ANI) 數值 [average nucleotide identity (ANI) value] 僅有98.18%。

**【0065】** 綜合以上各項的特徵鑑定結果，申請人認為：本發明的人羅斯拜瑞氏菌HGM001是一種新穎的人羅斯拜瑞氏菌分離株，它已於西元2021年4月20日以寄存編號BCRC 911054被寄存於台灣的食品工業發展研究所 (FIRDI) 的生物資源保存及研究中心 (BCRC)(300新竹市食品路331號，台灣)。

## **實施例2. 人羅斯拜瑞氏菌HGM001在生產丁酸 (butyric acid) 上的效用評估**

**【0066】** 為了探討本發明的人羅斯拜瑞氏菌HGM001在生產丁酸上的效用，申請人大體上參照Duncan S.H. *et al.* (2002)(同上述)以及WO 2017033925 A1當中所述的培養條件來進行測試。

### **實驗方法：**

**A、 製備人羅斯拜瑞氏菌HGM001的接種源 (inoculum)：**

**【0067】** 將依據上面實施例1當中所得的人羅斯拜瑞氏菌HGM001以一為0.1% (v/v)的接種量接種至YCFAGSC肉湯培養基中，並於一為37℃之厭氧培養箱(型號為Vinyl Anaerobic Chambers，廠牌為Coy Laboratory products)中進行培養以活化菌株，而得到人羅斯拜瑞氏菌HGM001的接種源。

#### B、 製備人羅斯拜瑞氏菌HGM001的發酵培養物：

**【0068】** 將依據上面第A項當中所得的人羅斯拜瑞氏菌HGM001的接種源分成3個實驗組(亦即實驗組1至3)。接著，將各組分別以 $1 \times 10^6$  CFU/mL的細菌濃度接種至不同的發酵培養基中，並於厭氧培養箱(37℃)中進行發酵培養，而各組所使用的發酵培養基與培養時間及其參考案被顯示於下面的表5中。之後，收取各組所得到的發酵培養物。

表5. 各組的發酵培養條件

| 組別    | 發酵培養基   | 培養時間<br>(小時) | 參考案                                      |
|-------|---------|--------------|--|
| 實驗組 1 | YCG     | 72           | WO 2017033925 A1                         |
| 實驗組 2 | YCFAG   | 24           | Duncan S.H. <i>et al.</i><br>(2002)(同上述) |
| 實驗組 3 | YCFAGSC | 48           | —  |

#### C、 丁酸含量的測定：

**【0069】** 將0.5 g之依據上面第B項當中所得之各組的發酵培養物分別溶於二次去離子水中並使得最終體積為5 mL，繼而以孔徑

為0.45  $\mu\text{m}$ 的濾膜[購自於友和貿易股份有限公司(UNI-ONWARD CORP.)]予以過濾，所得到之各組的培養濾液(culture filtrate)被拿來進行高效能液相層析(high performance liquid chromatography, HPLC)分析。所使用的HPLC分析儀器如下：Chromaster HPLC系統(Hitachi)、5110幫浦(Hitachi)、5420 UV-VIS偵測器(5420 UV-VIS detector)(Hitachi)，而有關HPLC的各項操作參數與條件被顯示於下面的表6中。

表6. HPLC的操作參數與條件

|           |                         |
|-----------|-------------------------|
| 分離管柱      | Aminex HPX-87H (BioRad) |
| 管柱長度      | 300 mm $\times$ 7.8 mm  |
| 管柱溫度      | 50 $^{\circ}\text{C}$   |
| 樣品注射體積    | 20 $\mu\text{L}$        |
| 偵測波長      | UV-210 nm               |
| 移動相       | 0.009 N 硫酸(pH 2.3)      |
| 流速(mL/分鐘) | 0.6 mL/分鐘               |

**【0070】** 此外，為供比對，使用不同濃度的丁酸(1、2、5、10、20以及50 mg/mL)(購自於Sigma-Aldrich)來作為對照標準品(control standard)並進行相同的分析。

**結果：**

**【0071】** 本實驗的結果被顯示於下面的表7中。

表7. 各組所測得的丁酸含量

| 組別    | 含量(mM)   | 參考案                                      | 含量(mM) |
|-------|----------|--|--------|
| 實驗組 1 | 18.5±0.4 | WO 2017033925<br>A1                      | 1.0    |
| 實驗組 2 | 28.2±0.3 | Duncan S.H. <i>et al.</i><br>(2002)(同上述) | 11.4   |
| 實驗組 3 | 80.6±1.2 | -  | -      |

【0072】 由表7可見，在不同的發酵培養條件下，人羅斯拜瑞氏菌HGM001皆能夠生成大量的丁酸，並且其產量是明顯地優於對應的參考案中所提及之人羅斯拜瑞氏菌A2-183<sup>T</sup>的產量。

### 實施例3. 人羅斯拜瑞氏菌HGM001在改善發炎-誘發的腸道屏障功能障礙 (inflammation-induced intestinal barrier dysfunction) 上的效用評估

#### 實驗材料：

#### 1. 人羅斯拜瑞氏菌HGM001的培養濾液之製備：

【0073】 將依據上面實施例2的第A項當中所得到的羅斯拜瑞氏菌HGM001的接種源均勻塗佈於YCFAGSC瓊脂平板培養基上，然後於厭氧培養箱(37℃)中進行培養歷時24小時。之後，從該YCFAGSC瓊脂平板培養基上刮取適量的新鮮菌體，繼而以20 mL EMEM 培養基 [ 添加有 1% 盤尼西林 - 鏈黴素 (penicillin-streptomycin)] 來懸浮菌體並於厭氧培養箱(37℃)中進行培養，而使得所形成的培養物的OD<sub>600</sub>值達到約為2 (細菌濃度

約為 $4 \times 10^9$  CFU/mL)，接而以4,000 rpm離心歷時15分鐘。之後，收取上澄液並以孔徑為 $0.22 \mu\text{m}$ 的濾膜(購自於友和貿易股份有限公司)予以過濾，藉此而得到人羅斯拜瑞氏菌HGM001的培養濾液。

### 實驗方法：

**【0074】** 本實驗大體上是參考Hsieh C.Y. *et al.* (2015), *Physiol. Rep.*, doi: 10.14814/phy2.12327以及Cocetta V. *et al.* (2019), *Recent Pat. Food Nutr. Agric.*, 10:62-69當中所述的方法來進行Caco-2細胞單層(Caco-2 cell monolayers)的製備以及跨上皮電阻(TEER)分析[Trans epithelial Electrical Resistance (TEER) Assay]，藉此評估人羅斯拜瑞氏菌HGM001的抗發炎效用。首先，將依據上面“一般實驗材料”的第5項來進行繼代培養的Caco-2細胞分成3組，其中包括1個正常對照組(normal control group)、1個病理對照組(pathological control group)以及1個實驗組。將各組的Caco-2細胞以一為 $1 \times 10^5$ 細胞/井的密度分別接種至Transwell<sup>®</sup> 嵌入皿(Transwell<sup>®</sup> inserts)(Corning Inc.)[其具有 $0.4 \mu\text{m}$ 之孔洞的聚碳酸酯膜(polycarbonate membrane)]中，繼而將該等嵌入皿放置於12-井培養盤的各井(含有1.5 mL的EMEM培養基)中，並於一恆溫培養箱( $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ )中進行培養歷時3至4周，以使得Caco-2細胞貼附於該等嵌入皿的底部形成Caco-2細胞單層。

**【0075】** 之後，對實驗組的Caco-2細胞單層添加以50  $\mu$ L之依據上面“實驗材料”所得到的人羅斯拜瑞氏菌HGM001的培養濾液，並在37 $^{\circ}$ C的條件下作用歷時24小時。至於正常對照組以及病理對照組的Caco-2細胞單層則不作任何處理。

**【0076】** 在添加培養濾液之後的第2小時，於病理對照組與實驗組的培養盤的井中加入10 ng/mL的干擾素- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ , INF- $\gamma$ )(購自於R&D)，使Caco-2細胞單層與INF- $\gamma$ 在37 $^{\circ}$ C的條件下作用歷時3小時，之後加入10 ng/mL的腫瘤壞死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )(購自於R&D)並在37 $^{\circ}$ C的條件下繼續作用歷時20小時，俾以誘發腸道屏障功能障礙。至於正常對照組的培養盤的井則不作任何處理。

**【0077】** 接著，使用一Millicell<sup>®</sup> ERS-2 電阻儀(Millicell<sup>®</sup> ERS-2 Voltohmmeter)並依據製造商的操作指南來對各組的Caco-2細胞單層進行TEER位準的測量，然後將正常對照組的TEER位準當作100%，而其他各組相對於正常對照組的TEER位準的百分比可被計算出來。

**【0078】** 之後，依照上面“一般實驗方法”的第1項當中所述的方法來分析所得到的實驗數據。

**結果：**

**【0079】** 圖4顯示各組的Caco-2細胞單層所測得的TEER位準(%正常對照組)。從圖4可見，與正常對照組相較之下，病理對照組所測得的TEER位準有顯著的降低，這表示INF- $\gamma$ 與TNF- $\alpha$ 會成功地誘發腸道屏障功能障礙而造成Caco-2細胞單層的結構破壞。而與病理對照組相較之下，實驗組所測得的TEER位準有顯著的升高並且是近似於正常對照組所具者。這個實驗結果顯示：本發明的人羅斯拜瑞氏菌HGM001的培養濾液能夠有效地改善發炎-誘發的腸道屏障功能障礙。

**【0080】** 綜合以上的實驗結果可知，本發明的人羅斯拜瑞氏菌HGM001具有一優異的丁酸生產能力，並且能夠有效地改善發炎性障礙(inflammatory disorders)。因此，申請人認為：本發明的人羅斯拜瑞氏菌HGM001可供應用於抗發炎藥物的開發。

**【0081】** 於本說明書中被引述之所有專利和文獻以其整體被併入本案作為參考資料。若有所衝突時，本案詳細說明(包含界定在內)將佔上風。

**【0082】** 雖然本發明已參考上述特定的具體例被描述，明顯地在不背離本發明之範圍和精神之下可作出很多的修改和變化。因此意欲的是，本發明僅受如隨文檢附之申請專利範圍所示者之限制。

**【生物材料寄存】**

**【0083】** TW 中華民國；食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(BCRC of FIRDI)；2021/04/20；BCRC 911054。

## 【序列表】

<110> 財團法人食品工業發展研究所

<120> 具有高丁酸生產能力的人羅斯拜瑞氏菌HGM001分離株及其用途

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的序列

<220>

<223> 用於擴增細菌的16S rDNA的前向引子8F

<400> 1

ggagtttgat cctggctcag

20

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工的序列

<220>

<223> 用於擴增細菌的16S rDNA的反向引子1540R

<400> 2

aaggaggtga tccagcc

17

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1480

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人羅斯拜瑞氏菌

&lt;400&gt; 3

gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcacttt aattgatttc 60  
ttcggaatga agtttttgtg actgagtggc ggacgggtga gtaacgcgtg ggtaacctgc 120  
ctcatacagg gggataacag ttggaaacga ctgctaatac cgcataagcg cacaggattg 180  
catgatccag tgtgaaaaac tccggtggta tgagatggac ccgcgtctga ttagccagtt 240  
ggcggggtaa cggcccacca aagcgacgat cagtagccga cctgagaggg tgaccggcca 300  
cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtgggga atattgcaca 360  
atgggggaaa cctgatgca gcgacgccgc gtgagcgaag aagtatttcg gtatgtaaag 420  
ctctatcagc agggagaag aatgacggta cctgactaag aagcaccggc taaatacgtg 480  
ccagcagccg cggtaatagc tatggtgcaa gcgttatccg gatttactgg gtgtaaaggg 540  
agcgcaggcg gtacggcaag tctgatgtga aatccccggg ctcaaccccg gtactgcatt 600  
ggaaactgtc ggactagagt gtcggagggg taagtggaat tcctagtgtg gcggtgaaat 660  
gcgtagatat taggaggaac accagtggcg aaggcggctt actggacgat tactgacgct 720  
gaggctcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac 780  
gatgaatact aggtgtcggg gagcattgct ctfcggtgcc gcagcaaacg caataagtat 840  
tccacctggg gactacgttc gcaagaatga aactcaaagg aattgacggg gacccgcaca 900  
agcgggtggag catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga accttacc aa gtcttgacat 960  
cccactgacm ragtatgtaa tgtactttct ctfcggagca gtggtgacag gtggtgcatg 1020  
gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggtaagtcc cgcaacgagc gcaacccta 1080  
ttcttagtag ccagcggttc ggccgggcac tctagggaga ctgccagga taacctggag 1140

第2頁，共3頁(序列表)

|   |      |
|---|------|
| gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac ttgggctaca cacgtgctac | 1200 |
| aatggcgtaa acaaagggaa gcaatcccgc gagggggagc aaatctcaaa aataacgtct | 1260 |
| cagttcggac tgtagtctgc aactcgacta cacgaagctg gaatcgctag taatcgcgaa | 1320 |
| tcagaatgtc gcggtgaata cgttcccggg tcttgtacac accgcccgtc acaccatggg | 1380 |
| agttggtaat gcccgaagtc agtgaccaa ccgcaaggag ggagctgccg aaggcaggac  | 1440 |
| tgataactgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgtatcgg                       | 1480 |

## 【發明申請專利範圍】

- 【請求項1】 一種人羅斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) HGM001，其以寄存編號BCRC 911054被寄存於財團法人食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心。
- 【請求項2】 一種用於生產丁酸的方法，其包括：使用一如請求項1的人羅斯拜瑞氏菌HGM001來發酵一含有可發酵糖的基質，而得到一含有丁酸的發酵培養物。
- 【請求項3】 如請求項2的方法，其中該可發酵糖是選自於由下列所構成的群組：葡萄糖、木糖、半乳糖、乳糖、纖維雙糖、蔗糖、麥芽糖、澱粉、肝醣、纖維素，以及它們的組合。
- 【請求項4】 一種組成物，其包含有一如請求項2的方法所製得的發酵培養物。
- 【請求項5】 一種如請求項2的方法所製得的發酵培養物供應用於製備一用來改善發炎性障礙之組成物的用途。
- 【請求項6】 如請求項5的用途，其中該發炎性障礙是腸道的發炎性障礙。
- 【請求項7】 如請求項5的用途，其中該組成物是一食品組成物。
- 【請求項8】 如請求項5的用途，其中該組成物是一藥學組成物。
- 【請求項9】 如請求項8的用途，其中該藥學組成物進一步包含有一藥學上可接受的載劑。
- 【請求項10】 如請求項8的用途，其中該藥學組成物是呈一供口服投藥的劑型或非經腸道投藥的劑型。

【發明圖式】



圖 1

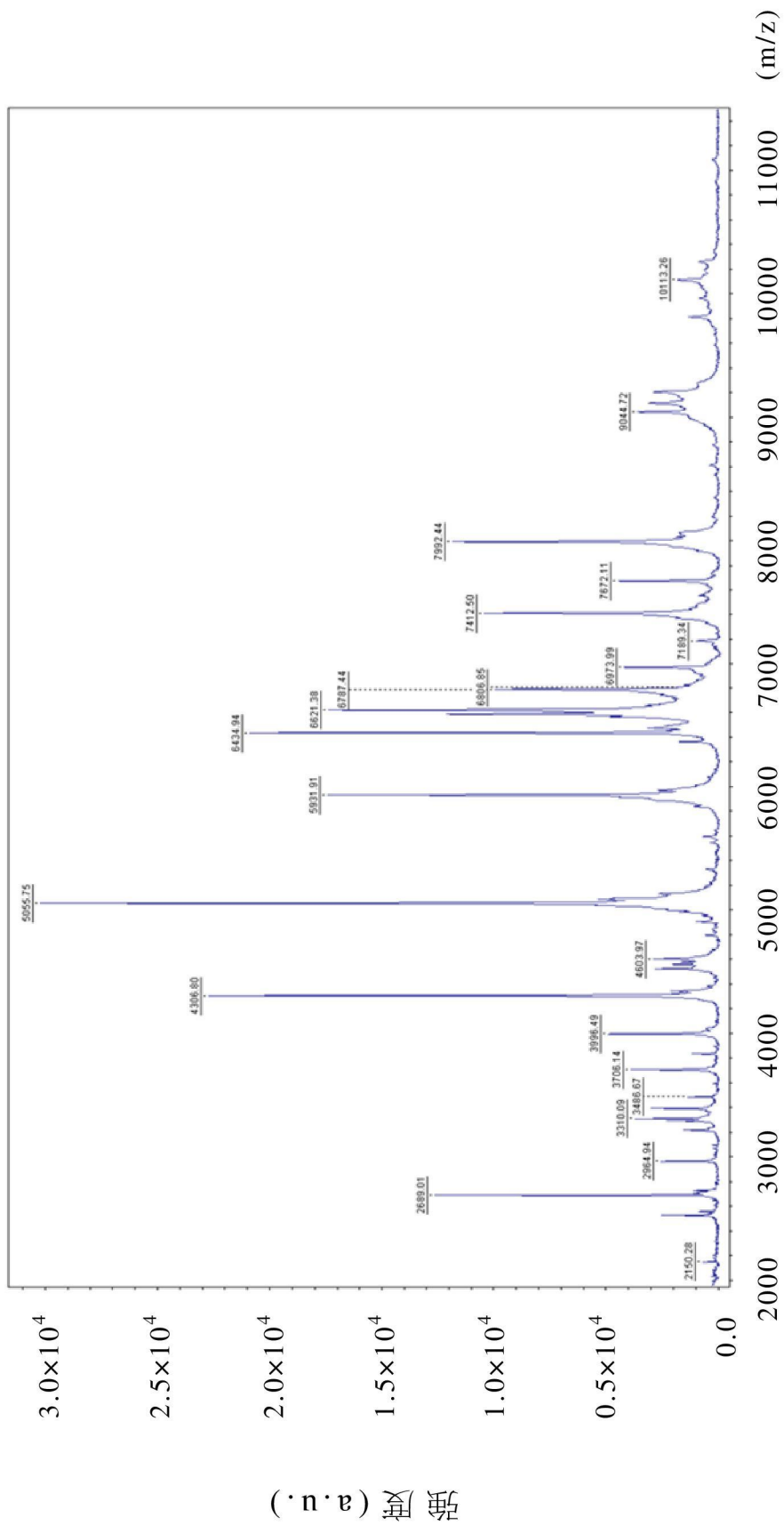


圖 2

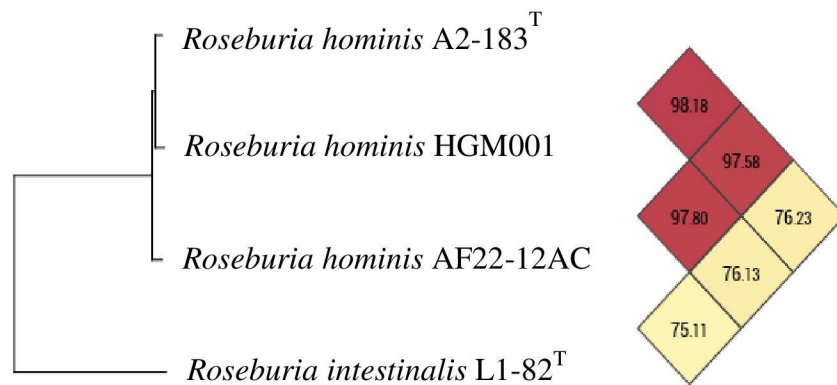


圖 3

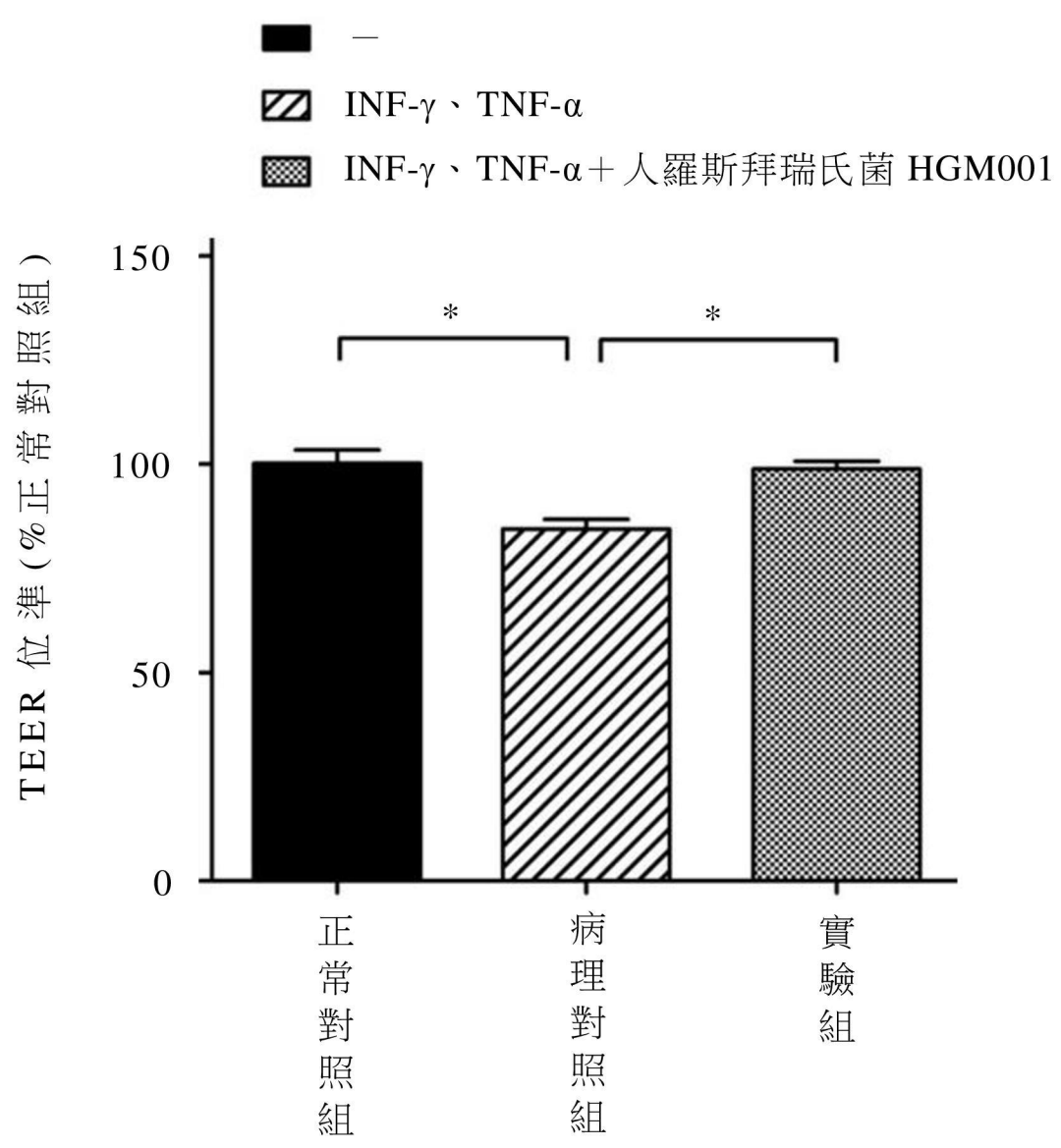


圖 4