



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113302279 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 30

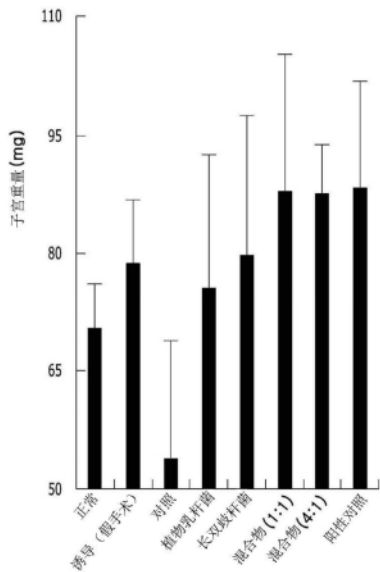
(21) 申请号 201980086597.7	专利权人 来必制药有限公司
(22) 申请日 2019.04.30	(72) 发明人 金东铉 韩明珠
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 113302279 A	(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务 所(普通合伙) 11201
(43) 申请公布日 2021.08.24	专利代理师 宋融冰
(30) 优先权数据 10-2018-0132834 2018.11.01 KR	(51) Int.Cl. C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2006.01) A61K 35/745 (2006.01) A61K 35/747 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01) C12R 1/25 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2021.06.25	(56) 对比文件 KIM D-E等.2017 FALL INTERNATIONAL CONVENTION OF THE PHARMACEUTICAL SOCIETY OF KOREA.2017,第22卷(第10期),第1022-1031 页.
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/KR2019/005239 2019.04.30	审查员 艾超仁
(87) PCT国际申请的公布数据 W02020/091166 KO 2020.05.07	权利要求书1页 说明书16页 序列表3页 附图8页
(83) 生物保藏信息 KCCM12088P 2017.08.04 KCCM12089P 2017.08.04	
(73) 专利权人 庆熙大学校产学协力团 地址 韩国京畿道	

(54) 发明名称

新乳酸菌及其用途

(57) 摘要

本发明涉及新乳酸菌植物乳杆菌NK3和长双歧杆菌NK49,并且更特别地,涉及可用于预防或治疗女性更年期疾病的包含新乳酸菌的组合物。



1.长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)NK49 (登记号:KCCM12088P) 在制造用于预防或治疗女性更年期疾病的药物中的用途,其中所述女性更年期疾病是选自以下组成的组中的至少一种:抑郁症、焦虑症、肥胖症和骨质疏松症。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述药物还包含植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)NK3 (登记号:KCCM12089P)。

3.根据权利要求1所述的用途,其中所述长双歧杆菌NK49 (登记号:KCCM12088P) 是其活细菌体。

4.根据权利要求2所述的用途,其中所述植物乳杆菌NK3 (登记号:KCCM12089P) 是其活细菌体。

5.根据权利要求1所述的用途,其中所述长双歧杆菌NK49 (登记号:KCCM12088P) 包含SEQ ID NO:2的16S rDNA序列。

6.根据权利要求2所述的用途,其中所述植物乳杆菌NK3 (登记号:KCCM12089P) 包含SEQ ID NO:1的16S rDNA序列。

7.根据权利要求1所述的用途,其中所述女性更年期疾病是骨质疏松症、肥胖症或抑郁症。

8.根据权利要求2所述的用途,其中所述植物乳杆菌NK3 (登记号:KCCM12089P) 与所述长双歧杆菌NK49 (登记号:KCCM12088P) 的混合物的比例为1:1至4:1CFU。

9.一种药物组合物,包含长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)NK49 (登记号:KCCM12088P)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)NK3 (登记号:KCCM12089P) 和药学上可接受的载体。

10.根据权利要求9所述的药物组合物,其中所述植物乳杆菌NK3 (登记号:KCCM12089P) 与所述长双歧杆菌NK49 (登记号:KCCM12088P) 的混合物的比例为1:1至4:1CFU。

新乳酸菌及其用途

技术领域

[0001] 本公开涉及新乳酸菌植物乳杆菌NK3和长双歧杆菌NK49,并且更特别地,涉及可用于预防和治疗女性更年期疾病的包含新乳酸菌的组合物。

背景技术

[0002] 可以针对每个个体对生物体所拥有的肠微生物进行分类,并且已知这些微生物参与肠道内的多种代谢。特别地,与肥胖有关的肠微生物是公知领域的一种,并且据报道,肥胖者的肠微生物大量参与碳水化合物、脂肪、氨基酸等的代谢。此外,通过肠微生物的代谢产生的诸如丁酸酯或乙酸酯的物质是肠道免疫力的重要因素,并且还已知其通过调节辅助性T细胞的产生或与G蛋白受体43 (GPR43) 的反应等来保护生物体免受病原体的感染。此外,除了大肠中的诸如炎性肠病或结肠癌的疾病外,肠微生物还被认为是引起多种疾病的原因。

[0003] 在最近的人体研究中,研究试图找到绝经前和绝经后妇女体内激素水平与肠微生物之间的相关性,但该研究只是证实了微生物总数减少的程度,而不是得出微生物的特定变化。

[0004] 然而,该研究表明激素的变化引起肠微生物的变化,因此报道了肠微生物通过肠肝循环对调节生物体中雌激素有影响。

[0005] 已知体内高水平的雌激素会增加乳腺癌的发病率,并且低水平的雌激素会增加骨质疏松症的发病率,因此,控制体内适当水平的雌激素被认为很重要。然而,这种控制在女性更年期中成为难题。因此,需要进行研究以通过生物体与肠微生物之间的相互作用来调节雌激素(一种雌性激素),并进一步治疗女性更年期疾病并缓解更年期症状。

[0006] [相关技术参考]

[0007] [非专利文件]

[0008] (非专利文献1) Sexually Transmitted Diseases, November 2006, vol 33, No.11, 663-665.

[0009] (非专利文献2) Bacteria and the Fate of Estrogen in the Environment 2017, vol 24, Issue 6

[0010] 发明详述

[0011] 技术问题

[0012] 本公开的一个目的是提供新乳酸菌,植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)。

[0013] 本公开的另一个目的是提供一种用于预防或治疗女性更年期疾病的组合物,包含新乳酸菌。

[0014] 本公开的又一个目的是提供一种食品,包含新乳酸菌。

[0015] 技术方案

[0016] 在用于实现该目的的一个方面,本公开提供了植物乳杆菌NK3 (*Lactobacillus*

plantarum NK3) (保藏机构:韩国微生物培养中心(KCCM),保藏日期:2017年8月04日,保藏号:KCCM12089P)。

[0017] 本公开的植物乳杆菌NK3具有作为从传统发酵食品泡菜中分离和鉴定的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的一种新的乳酸菌的特征。

[0018] 用于本公开的植物乳杆菌NK3的鉴定和分类的16S rDNA序列与本说明书所附的SEQ ID NO:1相同。因此,本公开的植物乳杆菌NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3)可以包含SEQ ID NO:1的16S rDNA。

[0019] 作为分析SEQ ID NO:1的16S rDNA序列的结果,该序列与通常已知的植物乳杆菌菌株的序列具有99%的同源性,因此显示出与植物乳杆菌的最高分子系统发育关系。因此,该乳酸菌被鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),然后被命名为植物乳杆菌NK3,并于2017年8月4日保藏在KCCM中(保藏号:KCCM12089P)。

[0020] 本公开的植物乳杆菌NK3是革兰氏阳性细菌,并且其细胞形式是芽孢杆菌属。更具体地,植物乳杆菌NK3的生理特性可以根据本领域中的常规方法进行分析,其结果如下表2所示。具体地,植物乳杆菌NK3可以使用以下作为碳源:L-阿拉伯糖、D-核糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、甘露糖醇、山梨糖醇、 α -甲基-D-甘露糖苷、N-乙酰基-葡萄糖胺、扁桃苷(Amygdaline)、熊果苷、七叶苷、水杨苷、纤维二糖、麦芽糖、乳糖、蜜二糖、蔗糖、海藻糖、松三糖、龙胆二糖、D-松二糖和葡萄糖酸。

[0021] 在实现该目的的另一个方面,本公开提供了长双歧杆菌NK49(*Bifidobacterium longum* NK49) (保藏机构:韩国微生物培养中心(KCCM),保藏日期:2017年8月04日,保藏号:KCCM12088P)。

[0022] 本公开的长双歧杆菌NK49具有作为从人粪便中分离并鉴定的长双歧杆菌的一种新的乳酸菌的特征。

[0023] 用于本公开的长双歧杆菌NK49的鉴定和分类的16S rDNA序列与本说明书所附的SEQ ID NO:2相同。因此,本公开的长双歧杆菌NK49(*Bifidobacterium longum* NK49)可以包含SEQ ID NO:2的16S rDNA。

[0024] 作为分析SEQ ID NO:2的16S rDNA序列的结果,该序列与通常已知的长双歧杆菌菌株的序列具有99%的同源性,因此显示出与长双歧杆菌的最高分子系统发育关系。因此,该乳酸菌被鉴定为长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*),然后被命名为长双歧杆菌NK49,并于2017年8月4日保藏在KCCM中(保藏号:KCCM12088P)。

[0025] 本公开的长双歧杆菌NK49是革兰氏阳性细菌,并且其细胞形式是芽孢杆菌属。更具体地,长双歧杆菌NK49的生理特性可以根据本领域中的常规方法进行分析,其结果如下表3所示。具体地,长双歧杆菌NK49可以使用以下作为碳源:L-阿拉伯糖、D-核糖、D-木糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、甘露糖醇、山梨糖醇、 α -甲基-D-葡萄糖苷、七叶苷、水杨苷、麦芽糖、乳糖、蜜二糖、蔗糖、棉子糖和D-松二糖。

[0026] 在实现该目的的另一方面,本公开提供了用于预防或治疗女性更年期疾病的药物组合物,包含植物乳杆菌NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P、长双歧杆菌NK49(*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P或其混合物。

[0027] 在本公开中,“女性更年期疾病”是指在更年期期间发生的所有疾病,其表现为雌性生殖功能丧失的体征。更年期到来时,由于卵巢功能的丧失,月经的量或周期变得不规

律,并且由于卵泡激素(雌激素)的分泌在几个月至三年内减少而使月经终止,导致作用于间脑的自主神经中枢并导致自主神经系统萎缩,从而导致更年期疾病。此外,垂体前叶的功能失常会加速肾上腺皮质功能而引起雄性化,并且甲状腺激素的影响导致甲状腺功能的异常,从而导致更年期特有的功能失常,例如引起肥胖等。例如,此功能失常可能导致诸如潮热、心悸(心脏跳动比平常更剧烈,导致心脏震颤)、头晕、耳鸣、高血压、消化系统疾病、头痛、记忆力减退、抑郁等,以及体重增加、肥胖、骨质疏松等症状。

[0028] 具体地,本公开的药物组合物中包含的植物乳杆菌NK3菌株和长双歧杆菌NK49菌株可以以1:1至4:1的菌落形成单位(CFU)的比例混合,但不限于此。

[0029] 在本公开的一个实例中,证实了植物乳杆菌NK3菌株或长双歧杆菌NK49菌株中的每一种以及这些菌株的混合物均对女性更年期疾病具有作用,并且特别地证实了其中植物乳杆菌NK3菌株和长双歧杆菌NK49菌株以1:1至4:1的菌落形成单位(CFU)的比例混合的混合物表现出改善骨质疏松指数的作用,其水平类似于用与雌激素相似的雌二醇给药的阳性对照组(图1至3和表4),并且表现出改善肥胖指数的作用(图4至5和表6)。

[0030] 本公开的“植物乳杆菌NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3)”与上述相同。

[0031] 具体地,本公开的药物组合物中包含的植物乳杆菌NK3和长双歧杆菌NK49KCCM12088P可以分别是其活细菌体、其死细菌体、其培养物、其裂解物或其提取物,但是可以不受限制地使用任何类型的植物乳杆菌NK3,只要其可以对女性更年期疾病起到预防或治疗作用即可。

[0032] 在本公开中,术语“活细菌体”可以指的是活的细菌体,并且“死细菌体”可以指的是通过间歇灭菌、加热、加压、药物处理等进行灭菌的细菌体。

[0033] 在本公开中,术语“培养物”还可以指通过在通常已知的液体或固体培养基中培养乳酸菌而获得的产品,并且可以是涵盖本公开中的新乳酸菌的概念。

[0034] 在本公开中,术语“裂解物”还可以指通过改性活的或死的细菌体而获得的水解产物,或通过化学或物理力如均质化、超声处理等裂解活的或死的细菌体而获得的产物。

[0035] 在本公开中,术语“提取物”还可以指通过用本领域已知的各种提取方法提取活细菌体、死细菌体、其裂解物、其培养物或其混合物而获得的产品,并且是涵盖了在提取后可以通过其他方法对所得提取物进行加工或处理而获得的所有材料的概念。

[0036] 本公开的“长双歧杆菌NK49(*Bifidobacterium longum* NK49)”与上述相同。

[0037] 具体地,本公开的药物组合物中包含的长双歧杆菌NK49可以是其活细菌体、其死细菌体、其培养物、其裂解物或其提取物,但是可以不受限制地使用任何类型的植物乳杆菌NK3,只要其可以对女性更年期疾病起到预防或治疗作用即可。

[0038] 在本公开中,女性更年期疾病可以包括血管舒缩症状,例如出汗、面部潮红等;精神疾病,例如抑郁症、焦虑症等;泌尿系统疾病,例如阴道干燥、阴道萎缩、尿失禁等;代谢疾病,例如肥胖症、高血压、糖尿病等;皮肤老化和骨质疏松症,特别是骨质疏松症、肥胖症或抑郁症,但不限于此。

[0039] 在本公开的一个实例中,作为将植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49或其混合物施用于患有诱导的骨质疏松症的动物模型的结果,证实了子宫和大腿骨的重量以类似于用与雌激素相似的雌二醇给药的组的水平增加(图1和2),而大腿骨的长度恢复至与正常组类似(图3)。还证实了碱性磷酸酶(AP)酶活性以与雌二醇给药组类似的水平发生,并且与卵巢去

除的动物模型的对照组相比,AP酶的活性,骨钙素、磷和钙的浓度恢复到与正常组类似。

[0040] 另外,在本公开的一个实例中,作为将植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49或其混合物施用于患有诱导的肥胖症的动物模型的结果,表明体重减轻以与雌二醇给药组类似的水平发生,并且证实了与卵巢去除的动物模型的对照组相比,随着AMPK的活性抑制了SREBP-1c的表达并且诱导了PGC-1 α 的表达(图5),从而证实抑制了肥胖(表6)。

[0041] 此外,在本公开的一个实例中,作为将植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49或其混合物施用于束缚应激诱导的抑郁症动物模型的结果,证实了由应激诱导的激素皮质酮的浓度降低(图6),并且抑郁症状的行为指数得到改善(图7至9),从而显示出对抑郁症的作用。

[0042] 以上结果表明,根据本公开的新乳酸菌及其混合物具有以类似于雌激素的水平治疗和改善女性更年期疾病的作用。

[0043] 可以通过使用本领域公知的方法来将根据本公开的药物组合物制备成药物剂型,以便在施用给哺乳动物后提供其活性成分的快速、持续或延长释放。当制备剂型时,根据本公开的药物组合物可以进一步包含药学上可接受的载体,其程度为该载体不抑制新乳酸菌的活性。

[0044] 药学上可接受的载体可包括常规使用的载体,例如乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、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、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁、矿物油等,但不限于此。另外,本公开的药物组合物可以包含稀释剂或赋形剂,例如填充剂、增量剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、表面活性剂等,或其他药学上可接受的添加剂。

[0045] 根据本公开的药物组合物的剂量需要为药学有效量。“药学有效量”可以指足以以适用于医学治疗的合理的收益/风险比预防或治疗女性更年期疾病的量。有效剂量水平可以由本领域技术人员根据诸如制剂方法、患者的状况和体重、患者的性别、年龄和疾病程度、药物形式、施用途径和时期、排泄率、反应敏感性等因素不同地选择。如本领域技术人员所认识的,有效量可以根据处置途径、赋形剂的使用以及与其他药物一起使用的可能性而变化。

[0046] 然而,在用于口服施用以达到优选效果的制剂的情况下,本公开的组合物通常可以基于1kg体重以每天0.0001至100mg/kg,优选每天0.001至100mg/kg的量施用于成年人。当如上施用制剂时,根据本公开的植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49或其混合物可以以每天 1×10^2 CFU/kg至 1×10^{11} CFU/kg的量施用。通过分开制剂,该施用可以每天一次或每天多次进行。剂量在任何方面均不限制本公开的范围。

[0047] 本公开的药物组合物可以通过各种途径施用于哺乳动物,例如小鼠、牲畜、人等。具体地,本公开的药物组合物可以经口腔或肠胃外施用(例如,静脉内、皮下或腹膜内施用或注射),但是可以优选经口腔施用。用于口腔施用的固体制剂可以包括散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、软胶囊剂、丸剂等。用于口腔施用的液体制剂可以包括悬浮剂、用于内服的液体、乳剂、糖浆剂、气雾剂等,但是除了常用的简单稀释剂水和液体石蜡以外,其还可以包括各种赋形剂,例如湿润剂、甜味剂、矫味剂、防腐剂等。用于肠胃外施用的制剂可以配制成外用制剂和无菌注射制剂的剂型来使用,例如无菌水溶液、液体、非水溶剂、混悬剂、乳剂、滴眼剂、眼药膏、糖浆剂、栓剂、气雾剂等,根据各自的常规方法,并且优选地可以通过制备

乳膏、凝胶、贴剂、喷雾剂、软膏、膏药、洗剂、擦剂、眼药膏、滴眼剂、糊剂或泥罨剂的药物组合物来使用,但是不限于此。取决于临床处方,用于局部施用的制剂可以是无水或水性形式。作为非水性溶剂和混悬助剂,可以使用丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油、可注射酯如油酸乙酯等。栓剂的基质可以包括witepsol、聚乙二醇 (Macrogol)、吐温61 (tween61)、可可脂、月桂酯 (laurinum)、甘油明胶等。

[0048] 在实现该目的的另一方面,本公开提供了一种预防或治疗女性更年期疾病的方法,包括向受试者施用植物乳杆菌NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3)、长双歧杆菌NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) 或其混合物的步骤。

[0049] 在本公开中,术语“植物乳杆菌NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3)”、“长双歧杆菌NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49)”、“施用”、“新菌株的混合比例”、“女性更年期疾病”等与上述相同。

[0050] 受试者可以指动物,并且通常可以是哺乳动物,使用本公开的新乳酸菌对其进行治疗可以显示出有益的效果。该受试者的优选实例可以包括灵长类动物,例如人。另外,这些受试者可以包括具有女性更年期疾病的症状或具有该症状的风险的所有受试者。

[0051] 在另一方面,本公开提供了食品,包含植物乳杆菌NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P、长双歧杆菌NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P或其混合物。

[0052] 在本公开中,术语“植物乳杆菌NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3)”、“长双歧杆菌NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49)”、“新菌株的混合比例”、“女性更年期疾病”等与上述相同。

[0053] 强调食品是通过物理、生物化学或生物工程方法而赋予附加价值以出于特定目的而工作和表达的食品。此食品的成分经过设计和加工,并且可以包含作为食品可接受的食品补充添加剂、甜味剂或功能性原料。

[0054] 在将本发明的植物乳杆菌NK3或长双歧杆菌NK49用作食品 (或饮料添加剂) 的情况下,可以将新乳酸菌本身添加至其中,与其他食品或食品成分一起使用,或根据常规方法适当使用。植物乳杆菌NK3或长双歧杆菌NK49的混合量可以根据其使用目的适当地确定。

[0055] 健康功能食品可包含各种营养素、维生素、矿物质 (电解质)、调味剂 (例如合成调味剂、天然调味剂等)、着色剂和增强剂 (奶酪、巧克力等)、果胶酸及其盐、有机酸、保护性胶体增稠剂、pH调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、醇、碳酸饮料中使用的碳酸化剂等。此外,本发明的健康功能食品可包含果肉以用于制备基于水果和蔬菜的饮料。这些成分可以单独使用或组合使用,并且基于组合物的总重量,添加剂的比例通常在0.001至50重量份的范围内选择。

[0056] 健康功能食品的类型没有特别限制。可以添加植物乳杆菌NK3或长双歧杆菌NK49的食品可以包括香肠、肉、面包、巧克力、零食、糖果、糖果糕点、拉面、比萨、其他面条、口香糖、乳制品 (包括冰淇淋)、各种汤、饮料、茶、保健饮料、酒精饮料、维生素复合物等。在配制成饮料的情况下,除了新乳酸菌外,添加到饮料中的液体成分可包括各种调味剂、天然碳水化合物等作为附加成分,就像常规饮料中所含的一样,但不限于此。前述天然碳水化合物可以是单糖 (例如葡萄糖、果糖等)、二糖 (例如麦芽糖、蔗糖等) 和多糖 (例如常规糖如糊精、环糊精等) 以及糖醇,例如木糖醇、山梨糖醇、赤藓糖醇等。

[0057] 在另一方面,本公开提供了植物乳杆菌NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P、长双歧杆菌NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P或其混合物在制备用于治疗女性更年期疾病的药物中的用途。

[0058] 在另一方面,本公开提供了用于治疗女性更年期疾病的组合物,包含植物乳杆菌NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P、长双歧杆菌NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P或其混合物。

[0059] 在另一方面,本公开提供了植物乳杆菌NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P、长双歧杆菌NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P或其混合物在治疗女性更年期疾病中的用途。

[0060] 在本公开中,术语“植物乳杆菌NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3)”、“长双歧杆菌NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49)”、“菌株的活细菌体、死细菌体、培养物、裂解物或提取物”、“菌株的混合比例”、“女性更年期疾病”等与上述相同。

[0061] 除非另有说明,否则以上说明书中描述的数值应解释为包括其等效范围。

[0062] 有利效果

[0063] 根据本公开的新乳酸菌植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49或其混合物对女性更年期疾病具有优异的治疗效果。因此,根据本公开的新乳酸菌可以用作预防或治疗女性更年期疾病的组合物。

附图说明

[0064] 图中的LP表示植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) NK3的结果,而BP表示长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) NK49的结果。

[0065] 图1是示出新乳酸菌植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) NK3、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) NK49及其混合物的增加子宫重量的作用的图。

[0066] 图2是示出新乳酸菌植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) NK3、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) NK49及其混合物的增加大腿骨重量的作用的图。

[0067] 图3是示出新乳酸菌植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) NK3、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) NK49及其混合物的恢复大腿骨长度的作用的图。

[0068] 图4是示出新乳酸菌植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) NK3、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) NK49及其混合物的抑制肥胖的能力的图。

[0069] 图5是示出新乳酸菌植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) NK3、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) NK49及其混合物的提高AMPK活性的作用的图像。

[0070] 图6是示出新乳酸菌植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) NK3、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) NK49及其混合物的对皮质酮浓度的作用的图。

[0071] 图7是示出新乳酸菌植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) NK3、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) NK49及其混合物的通过高架十字迷宫 (EPM) 的减轻抑郁症的作用的图。

[0072] 图8是示出新乳酸菌植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) NK3、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) NK49及其混合物的通过强迫游泳实验 (FST) 的减轻抑郁症的作用的图。

[0073] 图9是示出新乳酸菌植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) NK3、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) NK49及其混合物的通过悬尾实验 (TST) 的减轻抑郁症的作用的图。

具体实施方式

[0074] 在下文中,将通过优选的实施例详细描述本公开以更好地理解本公开。然而,以下实施例仅出于说明本公开的目的提供,并且因此本公开不限于此。

[0075] 实施例1:乳酸菌的分离和鉴定

[0076] (1) 从人粪便中分离乳酸菌

[0077] 将人粪便放置并悬浮在GAM液体培养基 (GAM肉汤;Nissui Pharmaceutical,日本) 中。之后,取上清液并转移到BL琼脂培养基 (Nissui Pharmaceutical,日本) 中,然后在37℃厌氧孵育约48小时,之后从中分离出菌落形成的菌株。

[0078] (2) 从泡菜中分离出乳酸菌

[0079] 分别将白菜泡菜、萝卜泡菜或葱泡菜压碎,然后取压碎的上清液并转移到MRS琼脂培养基 (Difco,USA) 中,然后在37℃下厌氧孵育约48小时,之后从中分离出菌落形成的菌株。

[0080] (3) 分离的乳酸菌的鉴定

[0081] 对从人粪便或泡菜分离的菌株的生理特性和16S rDNA序列进行分析,以鉴定菌株的种类,然后赋予菌株名称。赋予乳酸菌的菌株名称与下表1中所示的相同。具体地,从泡菜中分离的乳酸菌是五种种类的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) (表1的No.1至5)、五种种类的短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) (表1的No.6至10)、五种种类的清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*) (表1的No.11至15) 和五种种类的弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*) (表1的No.16至20)。从人粪便中分离的乳酸菌是五种种类的鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) (表1的No.21至25)、五种种类的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) (表1的No.26至30)、五种种类的罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) (表1的No.31至35)、四种种类的约氏乳杆菌 (表1的No.36至39)、三种种类的粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) (表1的No.40至42)、三种种类的青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) (表1的No.43至45) 和五种种类的长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) (表1的No.46至50)。

[0082] [表1]

[0083]

No.	菌株名称	No.	菌株名称
1	植物乳杆菌 NK1	26	植物乳杆菌 NK26
2	植物乳杆菌 NK2	27	植物乳杆菌 NK27
3	植物乳杆菌 NK3	28	植物乳杆菌 NK28
4	植物乳杆菌 NK4	29	植物乳杆菌 NK29
5	植物乳杆菌 NK5	30	植物乳杆菌 NK30
6	短乳杆菌 NK6	31	罗伊氏乳杆菌 NK31
7	短乳杆菌 NK7	32	罗伊氏乳杆菌 NK32
8	短乳杆菌 NK8	33	罗伊氏乳杆菌 NK33
9	短乳杆菌 NK9	34	罗伊氏乳杆菌 NK34
10	短乳杆菌 NK10	35	罗伊氏乳杆菌 NK35
11	清酒乳杆菌 NK11	36	约氏乳杆菌 NK36
12	清酒乳杆菌 NK12	37	约氏乳杆菌 NK37
13	清酒乳杆菌 NK13	38	约氏乳杆菌 NK38
14	清酒乳杆菌 NK14	39	约氏乳杆菌 NK39
15	清酒乳杆菌 NK15	40	粘膜乳杆菌 NK40

[0084]

16	弯曲乳杆菌 NK16	41	粘膜乳杆菌 NK41
17	弯曲乳杆菌 NK17	42	粘膜乳杆菌 NK42
18	弯曲乳杆菌 NK18	43	青春双歧杆菌 NK43
19	弯曲乳杆菌 NK19	44	青春双歧杆菌 NK44
20	弯曲乳杆菌 NK20	45	青春双歧杆菌 NK45
21	鼠李糖乳杆菌 NK21	46	长双歧杆菌 NK46
22	鼠李糖乳杆菌 NK22	47	长双歧杆菌 NK47
23	鼠李糖乳杆菌 NK23	48	长双歧杆菌 NK48
24	鼠李糖乳杆菌 NK24	49	长双歧杆菌 NK49
25	鼠李糖乳杆菌 NK25	50	长双歧杆菌 NK50

[0085] (4) 新乳酸菌植物乳杆菌NK3的生理特性

[0086] 在以上表1中描述的菌株中,证实了植物乳杆菌NK3(登记号KCCM12089P)是革兰氏阳性杆菌。另外,显示了植物乳杆菌NK3的16S rDNA具有SEQ ID NO:1的序列。作为通过BLAST搜索比较植物乳杆菌NK3的16S rDNA序列的结果,完全没有搜索到具有相同的16S rDNA序列的植物乳杆菌菌株,并且证实该序列与通常已知的植物乳杆菌菌株的16S rDNA序列具有99%的同源性。在植物乳杆菌NK3的生理特性中,使用API 50CHL试剂盒通过糖发酵试验分析了碳源的可用性。其结果如下表2所示。在下表2中,“+”表示碳源的可用性为阳性,而“-”表示碳源的可用性为阴性。

[0087] [表2]

[0088]

碳源	NK3	碳源	NK3
对照	-	七叶苷	+
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-核糖醇	-	菊粉	-
甲基-BD-木吡喃糖苷	-	松三糖	+
D-半乳糖	+	棉子糖	-
D-葡萄糖	+	淀粉	-
D-果糖	+	糖原	-
D-甘露糖	+	木糖醇	-
L-山梨糖	-	龙胆二糖	+
鼠李糖	-	D-松二糖	+
卫矛醇	-	D-来苏糖	-
肌醇	-	D-塔格糖	-

[0089]

甘露糖醇	+	D-岩藻糖	-
山梨糖醇	+	L-岩藻糖	-
α -甲基-甘露糖苷	±	D-阿糖醇	-
α -甲基-葡萄糖苷	-	L-阿糖醇	-
N-乙酰基-葡糖胺	+	葡萄糖酸	±
扁桃苷	+	2-酮基-葡萄糖酸	-
熊果苷	+	5-酮基-葡萄糖酸	-

[0090] (5) 新乳酸菌长双歧杆菌NK49的生理特性

[0091] 在以上表1中描述的菌株中,证实了长双歧杆菌NK49(登记号KCCM12088P)是革兰氏阳性杆菌。另外,显示了长双歧杆菌NK49的16S rDNA具有SEQ ID NO:2的序列。作为通过BLAST搜索比较长双歧杆菌NK49的16S rDNA序列的结果,完全没有搜索到具有相同的16S rDNA序列的长双歧杆菌菌株,并且证实该序列与通常已知的长双歧杆菌菌株的16S rDNA序列具有99%的同源性。在长双歧杆菌NK49的生理特性中,使用API 50CHL试剂盒通过糖发酵试验分析了碳源的可用性。其结果与下表3所示相同。在下表3中,“+”表示碳源的可用性为阳性,而“-”表示碳源的可用性为阴性。

[0092] [表3]

	碳源		碳源	
		NK49		NK49
[0093]	对照	-	七叶苷	+
	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-核糖醇	-	菊粉	-
	甲基-BD-木吡喃糖苷	-	松三糖	-
	D-半乳糖	+	棉子糖	+
	D-葡萄糖	+	淀粉	-
	D-果糖	+	糖原	-
	D-甘露糖	-	木糖醇	-
	L-山梨糖	-	龙胆二糖	-
	鼠李糖	-	D-松二糖	±
	卫矛醇	-	D-来苏糖	-
	肌醇	-	D-塔格糖	-
	甘露糖醇	+	D-岩藻糖	-
	山梨糖醇	+	L-岩藻糖	-
	α-甲基-甘露糖苷	-	D-阿糖醇	-
[0094]	α-甲基-葡萄糖苷	±	L-阿糖醇	-
	N-乙酰基-葡糖胺	-	葡萄糖酸	-
	扁桃苷	-	2-酮基-葡萄糖酸	-
	熊果苷	-	5-酮基-葡萄糖酸	-

[0095] 实施例2:乳酸菌对动物模型中骨质疏松症的治疗作用

[0096] (1) 具有骨质疏松症的动物模型的产生以及乳酸菌的施用

[0097] 在实验室中适应一周后,每组使用六只C57BL/6小鼠(雌性,21-23g和6周龄)进行实验。用异氟烷麻醉小鼠后,从其中去除卵巢以建立具有骨质疏松症的动物模型。从卵巢去除后的一周起,以 1×10^9 CFU的日剂量口服施用新乳酸菌植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49、其1:1混合物、或其4:1混合物(LP:BL的比例为4:1,以下相同),每周六天,持续五周。另外,向阳性对照组的实验动物腹膜内施用 $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 的 17β -雌二醇(PC),并且向假手术组(sham)和卵巢去除的实验组口服施用生理盐水溶液代替药物。

[0098] 在乳酸菌施用结束的第二天,处死实验动物,然后从中分离血液、大腿骨、结肠、子宫和肝脏,以测量骨质疏松指数。

[0099] (2) 骨质疏松指数的测量

[0100] 用R&D system ELISA Kit (Minneapolis, MN, USA) 测量血液中的骨钙素;分别用Asan Pharmaceutical Co., Ltd的ASAN Ca-Lq Reagents和ASAN Pi-Lq Reagents测量Ca和P;并且用碱性磷酸酶活性比色测定试剂盒(Sigma, USA) 测量碱性磷酸酶(AP) 活性。

[0101] (3) 实验结果

[0102] 作为饲养如上所述卵巢去除的动物模型六周的结果,相应的动物模型显示子宫重量减少(图1),大腿骨重量减少(图2),以及大腿骨长度增加(图3)。然而,对于用植物乳杆菌NK3(LP)、长双歧杆菌NK49(BL)、其1:1混合物(M1:1)和其4:1混合物(LP:BL=4:1, M4:1)给

药的组,证实了子宫和大腿骨的重量以类似于用与雌激素相似的雌二醇给药的组的水平增加(图1和2),并且大腿骨的长度恢复(图3)

[0103] 此外,作为饲养卵巢去除的动物模型六周的结果,如下面表4所述,相应的动物模型倾向于显示碱性磷酸酶(AP)活性增加,血液中磷(P)和骨钙素的浓度增加并且钙(Ca)减少。同时,对于用根据本公开的植物乳杆菌NK3(LP)、长双歧杆菌NK49(BL)、其1:1混合物(M1:1)和其4:1混合物(M4:1)给药的组,证实了碱性磷酸酶(AP)的活性以及骨钙素、磷和钙的浓度恢复到与用雌二醇给药的组相似的水平。

[0104] [表4]

	正常组 (Nor)	诱导组 (Sham)	对照组 (Con)	LP NK3	BL NK49	乳酸菌 混合物 (M1:1)	乳酸菌 混合物 (M4:1)	阳性对 照组 (PC)
[0105] AP (IU/L)	170.0±3.4	174.4±5.1	282.2±10.3	217.2±8.6	218.9±5.1	215.5±6.8	213.8±8.6	220.6±10.3
Ca (mg/dL)	6.6±0.2	6.4±0.3	6.4±0.4	6.3±0.3	6.3±0.3	6.3±0.2	6.2±0.2	6.2±0.2
P (mg/dL)	11.2±0.2	11.8±0.9	12.5±1.5	12.1±1.4	11.5±1.2	11.9±1.1	11.8±0.9	12.1±1.1
骨钙素 (μg/L)	0.89±0.2	0.98±0.2	1.85±0.3	1.46±0.2	1.38±0.1	1.41±0.2	1.42±0.1	1.53±0.1

[0106] 以上结果表明,根据本公开的新乳酸菌及其混合物具有与雌激素类似水平的治疗骨质疏松症的作用,骨质疏松症是女性更年期疾病的症状之一。

[0107] 实施例3:乳酸菌对改善动物模型中的肥胖症的作用

[0108] (1) 具有诱导的肥胖的动物模型的产生以及乳酸菌的施用

[0109] 如实施例2的(1)中所述,在实验室中适应了一周之后,每组使用六只C57BL/6小鼠(雌性,21-23g,6周龄)进行实验。用异氟烷麻醉小鼠并从其中去除卵巢后,将所得小鼠饲养六周,以建立具有肥胖的动物模型,显示出明显的体重增加。从卵巢去除后的一周起,以 1×10^9 CFU的日剂量口服施用新乳酸菌植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49、其1:1混合物、或其4:1混合物,每周六天,持续五周。另外,向阳性对照组的实验动物腹膜内施用10μg/kg/天的17β-雌二醇(PC),并且向假手术组(sham)和卵巢去除的实验组口服施用生理盐水溶液代替药物。

[0110] 在乳酸菌施用结束的第二天,处死实验动物,然后从中分离血液、大腿骨、结肠、子宫和肝脏,以测量肥胖指数。每周测量一次体重。

[0111] (2) AMPK活性的测量

[0112] 通过使用免疫印迹法测量肝脏中的AMPK活性。具体地,将分离的肝脏置于放射免疫沉淀测定裂解缓冲液(RIPA,Pierce,Rockford,IL,USA)中,粉碎,并以10,000g离心10分钟以获得上清液。对该上清液进行10% SDS-PAGE凝胶电泳,并转移至膜上。在4℃下与AMPK、p-AMPK和β-肌动蛋白的抗体反应过夜后,使所得产物与二抗反应并洗涤。然后,通过用增强的化学发光(ECL)试剂显色来确认所得产物。

[0113] (3) SREBP-1c和PGC-1α表达的测量

[0114] 使用定量逆转录聚合酶链反应(qPCR)测量固醇调节元件结合转录因子1c(SREBP-1c)和过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子1-α(PGC-1α)的表达。

[0115] 具体地,通过使用Qiagen mRNA提取试剂盒从分离自动物模型的肝脏中提取mRNA,然后利用Takara热循环仪使用SYBER预混剂进行qPCR。使用下表5中的引物在以下条件下进行热循环:DNA聚合酶活化在95℃下进行30秒,然后重复扩增40次(在95℃下以15秒的间隔和在60℃下以30秒的间隔进行反应)。与β-肌动蛋白比较来计算最终表达的基因的量。

[0116] [表5]

SEQ ID NO	引物	序列
3	SREBP-1c正向	5'-AGC TGT CGG GGT AGC GTC TG-3'
4	SREBP-1c反向	5'-GAG AGT TGG CAC CTG GGC TG-3'
5	PGC-1α正向	5'-CCG CCA CCT TCA ATC CAG AG-3'
6	PGC-1α反向	5'-CAA GTT CTC GAT TTC TCG ACG G-3'
7	β-肌动蛋白正向	5'-TGT CCA CCT TCC AGC AGA TGT-3'
8	β-肌动蛋白反向	5'-AGC TCA GTA ACA GTC CGC CTA GA-3'

[0118] (4) 实验结果

[0119] 作为饲养如上所述卵巢去除的动物模型六周的结果,相应的动物模型显示出明显的体重增加。同时,对于用根据本公开的植物乳杆菌NK3(LP)、长双歧杆菌NK49(BL)、其1:1混合物(M1:1)和其4:1混合物(M4:1)给药的组,证实发生了体重减轻以与雌二醇给药组类似的水平发生,其特别低于没有去除卵巢的正常动物的体重增加(图4)。

[0120] 另外,作为饲养卵巢去除的动物模型六周的结果,AMPK活性降低(图5),同时如下面表6所述的诱导了SREBP-1c的表达并且抑制了PGC-1α的表达。然而,对于用根据本公开的植物乳杆菌NK3(LP)、长双歧杆菌NK49(BL)、其1:1混合物(M1:1)和其4:1混合物(M4:1)给药的组,AMPK活性以与雌二醇给药组相似的水平发生(图5),其高于卵巢去除的对照组。另外,如下面的表6所示,证实了与卵巢去除的小鼠模型相比,本公开抑制了SREBP-1c的表达并且诱导了PGC-1α的表达,从而证实了肥胖被抑制。

[0121] [表6]

	正常组 (Nor)	诱导组 (Sham)	对照组 (Con)	LP NK3	BL NK49	乳酸菌 混合物 (M1:1)	乳酸菌 混合物 (M4:1)	阳性对 照组 (PC)
SREBP-1c	1.0±0.1	1.2±0.2	4.5±0.5	2.5±0.6	2.2±0.5	2.3±0.3	2.4±0.4	2.7±0.3
PGC-1α	1.0±0.1	1.1±0.1	0.6±0.2	0.8±0.2	0.9±0.2	0.8±0.1	0.9±0.2	0.8±0.2

[0123] 以上结果表明,根据本发明的新乳酸菌及其混合物具有与雌激素相似的水平降低肥胖或体重增加的作用,肥胖或体重增加是女性更年期疾病的症状之一。

[0124] 实施例4:乳酸菌对动物模型中抑郁症的治疗作用

[0125] (1) 束缚应激诱导的抑郁症小鼠模型的产生

[0126] 将抑郁症小鼠模型固定于3x 10cm的圆柱形束缚应激设备,以使小鼠在其中完全不能移动。然后,连续两天给小鼠施加束缚应激,每次12小时。从第二天起,施用植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49或其混合物(NK3、NK49、MIX:1X10⁹ CFU/小鼠),持续五天,以测量最终施用后第二天的抑郁行为指数。

[0127] (2) 血浆皮质酮浓度的测量

[0128] 对于如上产生的束缚应激诱导的抑郁症小鼠模型,应激激素皮质酮的血浆浓度显

著高于对照组,从而证实产生了适合于该实验的动物模型。在施用植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49或其混合物(MIX)的情况下,证实皮质酮的血浆浓度全部降低(图6)。

[0129] (3) 高架十字迷宫(EPM)实验

[0130] 高架十字迷宫实验设备是黑色有机玻璃设备,其中两个开放臂(30x 7cm)和两个具有20cm高的壁的封闭臂(30x 7cm)处于地板上方50厘米高处,每个从中央平台延伸7cm。在放在具有安装在其上高处的20Lux亮度的摄像机的室内后,记录小鼠在高架十字迷宫中的移动。

[0131] 具体地,将C57BL/6小鼠(雄性,19-22g)放在高架十字迷宫的中央,小鼠的头部朝向开放臂。测量在开放臂和封闭臂中花费的时间以及进入其中的次数五分钟。总测试时间中在开放臂中花费的时间(OT)通过 $[\text{开放臂中花费的时间} / (\text{开放臂中花费的时间} + \text{封闭臂中花费的时间})] \times 100$ 来计算。并且开放臂进入(OE)通过 $[\text{开放臂进入} / (\text{开放臂进入} + \text{封闭臂进入})] \times 100$ 来计算,其结果示于图7中。

[0132] 如图7所示,作为测量开放臂中花费的时间(OT)和开放臂进入(OE)的比例的结果,用植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49或其混合物(MIX)给药的组表现出比具有诱导束缚应激的小鼠的非给药组显著更高的值,因此证实了在菌株给药的小鼠中焦虑症状得到缓解。

[0133] (4) 强迫游泳实验(FST)

[0134] 根据Porsolt等人(1997)的传统已知方法,将高度为40cm、直径为20cm的水箱中填充温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 的水至30cm,然后将每只实验小鼠放入水箱中,并强迫在其中停留六分钟,其中前两分钟被认为是无需测量的适应时间,然后在最后四分钟,测量实验动物的不动时间(在这种情况下,不动是指小鼠除了最小的动作以将其头部保持在水面上以外,直立站立并漂浮在水中不运动的状态)。测量结果示于图8中。

[0135] 如图8所示,作为测量不动小鼠的比例的结果,用植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49或其混合物(MIX)给药的组表现出比具有诱导束缚应激的小鼠的非给药组显著更低的值,因此证实了当菌株给药时,放弃存活小鼠的突然抑郁状态得到缓解。

[0136] (5) 悬尾实验(TST)

[0137] 根据Steru等人(1985)的传统已知方法,将固定装置连接在小鼠尾巴的末端约1cm处,然后悬挂在离地面50cm处。然后,测量实验动物的不动时间总共六分钟,并且其结果示于图9中。

[0138] 如图9所示,作为测量不动小鼠的比例的结果,用植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49或其混合物(MIX)给药的组表现出比具有诱导束缚应激的小鼠的非给药组显著更低的值,因此证实了当菌株给药时,小鼠的抑郁状态得到缓解。

[0139] 以上结果表明,根据本公开的新乳酸菌及其混合物具有减轻抑郁的作用,抑郁是女性更年期疾病的症状之一。

[0140] 乳酸菌的保藏信息

[0141] 本发明人为了专利目的于2017年8月4日将植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)NK3保藏于经认证的保藏机构韩国微生物培养中心(地址:榆林B/D,弘济内2甲路45,西大门区,首尔市,大韩民国),并且收到保藏号为KCCM12089P。

[0142] 另外,本发明人为了获得专利目的于2017年8月4日将长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)NK49保藏于经认证的保藏机构韩国微生物培养中心(地址:榆

林B/D,弘济内2甲路45,西大门区,首尔市,大韩民国),并且收到保藏号为KCCM12088P。

[0143] 工业适用性

[0144] 根据本公开的新乳酸菌植物乳杆菌NK3、长双歧杆菌NK49或其混合物具有治疗女性更年期疾病的作用,例如治疗骨质疏松症、改善肥胖症或减轻抑郁症,以及因此可以用作预防或治疗女性更年期疾病的组合物,并有望在药物的相关工业领域中使用。

翻译

用于专利程序的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约

国际表格

收件人：金东铉
庆熙大路 26
东大门区
首尔 02447
大韩民国

关于原始保藏的受理通知书
由在本页底部所指出的国际保藏单位依据
7.1 章发出

I. 微生物的鉴别	
由保藏机构提供的鉴别编号： <i>Bifidobacterium longum</i> NK49	由国际保藏单位提供的登记号： KCCM12088P
II. 科学说明和/或被提议的分类学名称	
I 中所鉴别的微生物附有 ☐ 科学说明 ☐ 被提议的分类学名称 (适用时用 X 进行标记)	
III. 收到和受理日	
本国际保藏单位受理了 I 中所鉴别的微生物，其是 2017 年 8 月 4 日 收到的 (最初保藏日期) ¹	
V. 国际保藏单位	
姓名： 韩国微生物培养中心 (KCCM) 地址： 榆林 B/D 弘济内 2 甲路 45 西大门区 首尔市 120-861 大韩民国	有权代表国际保藏单位或授权机构的个人的 签字  日期： 2017 年 8 月 4 日

¹ 适用 6.4(d) 章时，该日期是获得国际保藏单位状态的日期。

BP/4 表

翻译

用于专利程序的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约

国际表格

收件人：金东铉
庆熙大路 26
东大门区
首尔 02447
大韩民国

关于原始保藏的受理通知书
由在本页底部所指出的国际保藏单位依据
7.1 章发出

I. 微生物的鉴别	
由保藏机构提供的鉴别编号： <i>Bifidobacterium longum</i> NK3	由国际保藏单位提供的登记号： KCCCM12089P
II. 科学说明和/或被提议的分类学名称	
[0146] I 中所鉴别的微生物附有 () 科学说明 () 被提议的分类学名称 (适用时用 X 进行标记)	
III. 收到和受理日	
本国际保藏单位受理了 I 中所鉴别的微生物，其是 2017 年 8 月 4 日收到的 (最初保藏日期) ¹	
V. 国际保藏单位	
姓名：韩国微生物培养中心 (KCCM) 地址： 榆林 B/D 弘济内 2 甲路 45 西大门区 首尔市 120-861 大韩民国	有权代表国际保藏单位或授权机构的个人的 签字  日期：2017 年 8 月 4 日

¹ 适用 6.4(d)章时，该日期是获得国际保藏单位状态的日期。

BP/4 表

[0001]	序列表
[0002]	<110> 庆熙大学校产学协力团 (University-Industry Cooperation Group
[0003]	of Kyung Hee University)
[0004]	来必制药有限公司 (NAVIPHARM CO, LTD)
[0005]	<120> 新乳酸菌及其用途
[0006]	<130> PIIB6210267P
[0007]	<140> 201980086597.7
[0008]	<141> 2019-04-30
[0009]	<150> KR 10-2018-0132834
[0010]	<151> 2018-11-01
[0011]	<160> 8
[0012]	<170> PatentIn version 3.5
[0013]	<210> 1
[0014]	<211> 1436
[0015]	<212> DNA
[0016]	<213> 人工序列
[0017]	<220>
[0018]	<223> NK3 16s rDNA
[0019]	<400> 1
[0020]	gcaagtcgaa cgaactctgg tattgattgg tgcttgcac atgatttaca tttgagtgg 60
[0021]	tggcgaactg gtgagtaaca cgtgggaaac ctgcccagaa gcgggggata acacctggaa 120
[0022]	acagatgcta ataccgcata acaacttga cgcacatggc cgagcttgaa agatggcttc 180
[0023]	ggctatcact tttggatggc cccgcggcgt attagctaga tgggtgggta atggctcacc 240
[0024]	atggcaatga tacgtagccg acctgagagg gtaatcggcc acattgggac tgagacacgg 300
[0025]	cccaaactcc tacgggagge agcagtaggg aatcttcac aatggacgaa agtctgatgg 360
[0026]	agcaacgcgc cgtgagtga gaagggttc ggctcgtaaa actctgttgt taaagaagaa 420
[0027]	catactctgag agtaactgtt caggtattga cggatattta ccagaaagcc acggctaact 480
[0028]	acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt attgggcgta 540
[0029]	aagcagcgc aggcggtttt ttaagtctga tgtgaaagcc tttcggtca accgaagaag 600
[0030]	tgcacgcgaa actgggaaac ttgagtgcag aagaggacag tggaactcca tgtgtagcgg 660
[0031]	tgaaatgcgt agatatatgg aagaacacca gtggcgaagg cggctgtctg gtctgttaact 720
[0032]	gacgtgagg ctcgaaagta tgggtagcaa acaggattag ataccctggc agtccatacc 780
[0033]	gtaaacgatg aatgctaagt gttggagggt ttccgccctt cagtgtctga gctaacgcat 840
[0034]	taagcattcc gcctggggag tacggccgca aggctgaaac tcaaaggaa tgacgggggc 900
[0035]	ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagctac gcgaagaacc ttaccaggtc 960
[0036]	ttgacatact atgcaaatct aagagattag acgttcctt cggggacatg gatacaggtg 1020
[0037]	gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca 1080
[0038]	accttatta tcagttgcca gcattaagtt gggcactctg gtgagactgc cggtgacaaa 1140
[0039]	ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgccct tatgacctgg gctacacacg 1200
[0040]	tgctacaatg gatggtacaa cgagttgcga actcgcgaga gtaagctaact ctcttaaagc 1260
[0041]	cattctcagt tcggattgta ggctgcaact cgcctacatg aagtcggaat cgctagtaact 1320

[0042]	cgcgatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac	1380
[0043]	catgagagtt tgtaacaccc aaagtcggtg gggtaacctt ttaggaacca gccgcc	1436
[0044]	<210>	2
[0045]	<211>	1342
[0046]	<212>	DNA
[0047]	<213>	人工序列
[0048]	<220>	
[0049]	<223>	NK49 16s rDNA
[0050]	<400>	2
[0051]	ggctttgctt ggtggtgaga gtggcgaacg ggtgagtaat gcgtgaccga cctgccccat	60
[0052]	acaccggaat agctcctgga aacgggtggt aatgccgat gctccagttg atgcgatggt	120
[0053]	cttctgggaa agctttcgcg gtatgggatg gggtcgcgtc ctatcagctt gacggcgggg	180
[0054]	taacggccca ccgtggcttc gacgggtagc cggcctgaga gggcgaccgg ccacattggg	240
[0055]	actgagatac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgc acaatgggcg	300
[0056]	caagcctgat gcagcgacgc cgcgtgaggg atggaggcct tcgggttgta aacctctttt	360
[0057]	atcggggagc aagcgagagt gagtttaccg gttgaataag caccggctaa ctacgtgcc	420
[0058]	gcagccgcgg taatacgtag ggtgcaacgc ttatcccga attattgggc gtaaagggt	480
[0059]	cgtaggcggg tcgtcgcgtc cgggtgtaaa gtccatcgct taacggtgga tccgcgccg	540
[0060]	gtacgggcgg gcttgagtgc ggtaggggag actggaattc ccggtgtaac ggtggaatgt	600
[0061]	gtagatatcg ggaagaacac caatggcgaa ggcaggtctc tgggccgtta ctgacgtga	660
[0062]	ggagcgaaag cgtggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaaccg	720
[0063]	tggatgctgg atgtggggcc cgttcacagg gttccgtgct ggagctaacg cgtaagcat	780
[0064]	cccgcctggg ggagtaggcg cgcaaggcta aaactcaaag aaattgacgg gggcccgcc	840
[0065]	aagcgcgga gcatgcgat taattcgatg caacgcgaag aaccttacct gggcttgaca	900
[0066]	tgttcccgac ggtcgtagag atacggcttc ctttcggggc gggttcacag gtggtgcatg	960
[0067]	gtcgtcgtca gtcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctcg	1020
[0068]	ccccgtgttg ccagcggatt atgccgggaa ctcacggggg accgccgggg ttaactcgga	1080
[0069]	ggaaggtggg gatgacgtca gatcatcatg ccccttacgt ccagggttc acgcatgcta	1140
[0070]	caatggccgg tacaacggga tgcgacgcgg cgacgcggag cggatccctg aaaaccggtc	1200
[0071]	tcagttcgga tcgcagtctg caactcgact gcgtgaaggc ggagtcgcta gtaatcgca	1260
[0072]	atcagcaacg tcgcggtgaa tgcgttcccg ggccttgtag acaccgccc tcaagtcatg	1320
[0073]	aaagtgggca gcaccgaag cc	1342
[0074]	<210>	3
[0075]	<211>	20
[0076]	<212>	DNA
[0077]	<213>	人工序列
[0078]	<220>	
[0079]	<223>	SREBP-1c 正向引物
[0080]	<400>	3
[0081]	agctgtcggg gtagcgtctg	20
[0082]	<210>	4
[0083]	<211>	20

[0084]	<212>	DNA	
[0085]	<213>	人工序列	
[0086]	<220>		
[0087]	<223>	SREBP-1c 反向引物	
[0088]	<400>	4	
[0089]		gagagttggc acctgggctg	20
[0090]	<210>	5	
[0091]	<211>	20	
[0092]	<212>	DNA	
[0093]	<213>	人工序列	
[0094]	<220>		
[0095]	<223>	PGC-1a 正向引物	
[0096]	<400>	5	
[0097]		ccgccacctt caatccagag	20
[0098]	<210>	6	
[0099]	<211>	22	
[0100]	<212>	DNA	
[0101]	<213>	人工序列	
[0102]	<220>		
[0103]	<223>	PGC-1a 反向引物	
[0104]	<400>	6	
[0105]		caagttctcg atttctcgac gg	22
[0106]	<210>	7	
[0107]	<211>	21	
[0108]	<212>	DNA	
[0109]	<213>	人工序列	
[0110]	<220>		
[0111]	<223>	b-肌动蛋白 正向引物	
[0112]	<400>	7	
[0113]		tgtccacctt ccagcagatg t	21
[0114]	<210>	8	
[0115]	<211>	23	
[0116]	<212>	DNA	
[0117]	<213>	人工序列	
[0118]	<220>		
[0119]	<223>	b-肌动蛋白 反向引物	
[0120]	<400>	8	
[0121]		agctcagtaa cagtccgcct aga	23

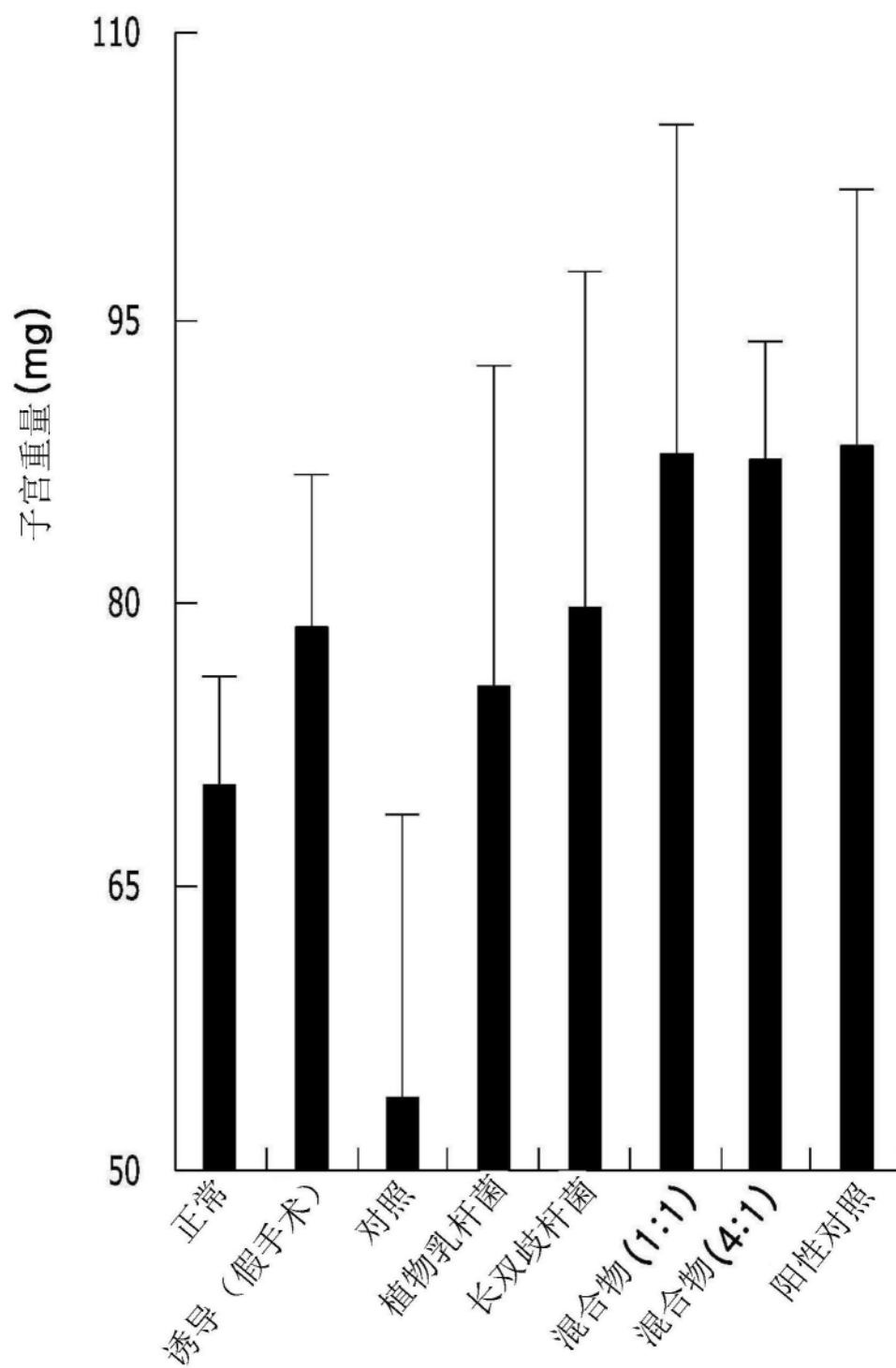


图1

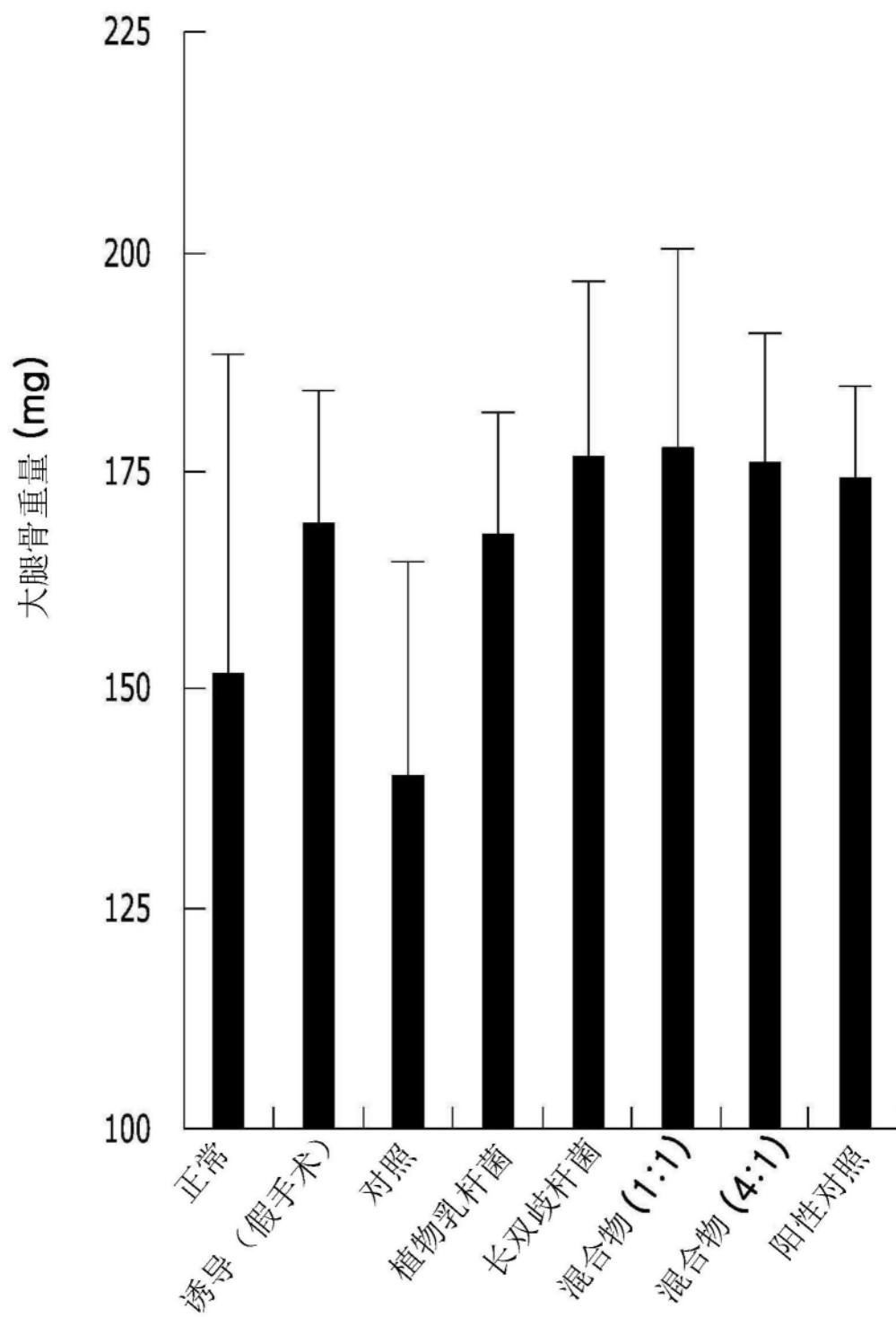


图2

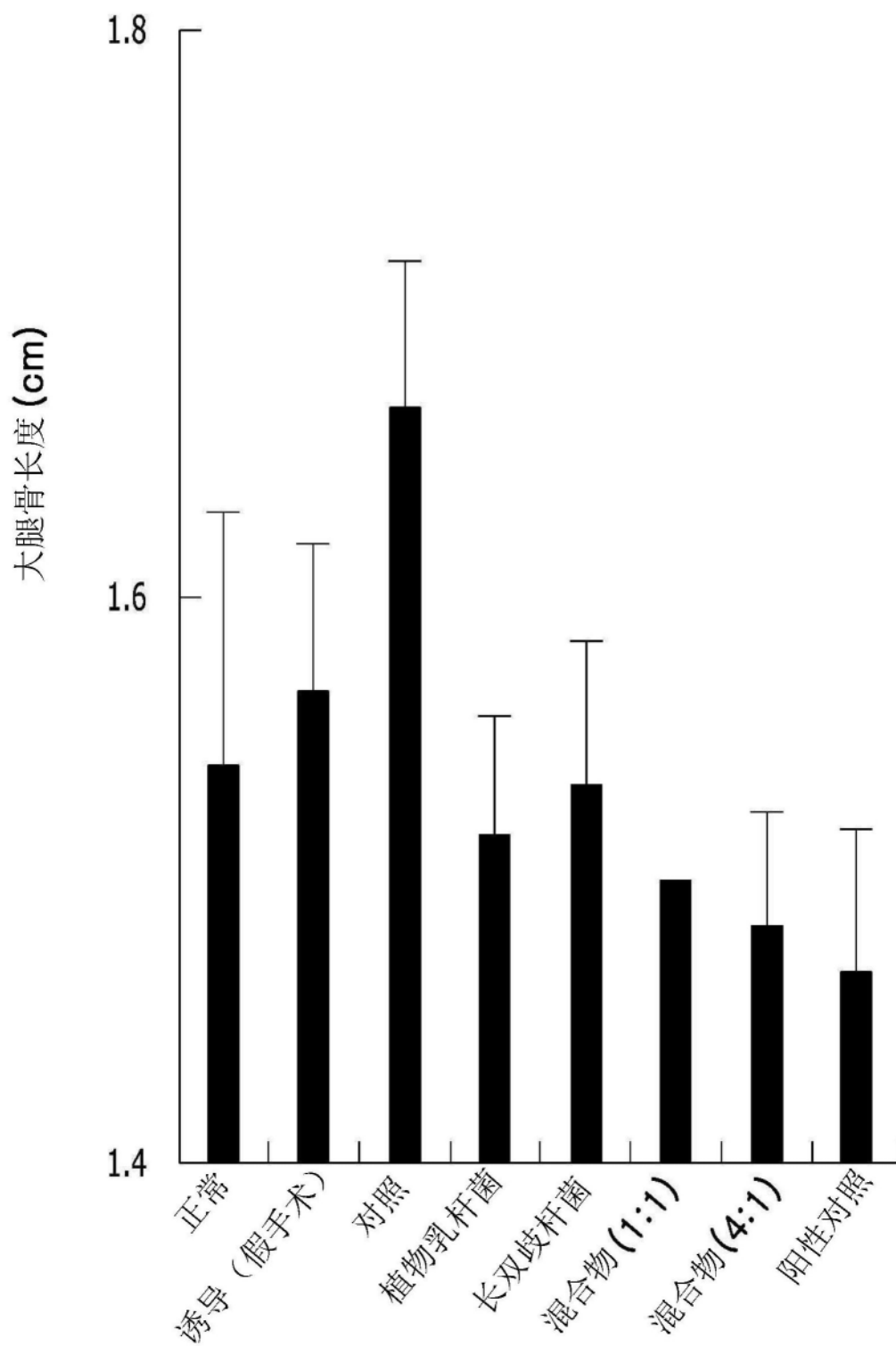


图3

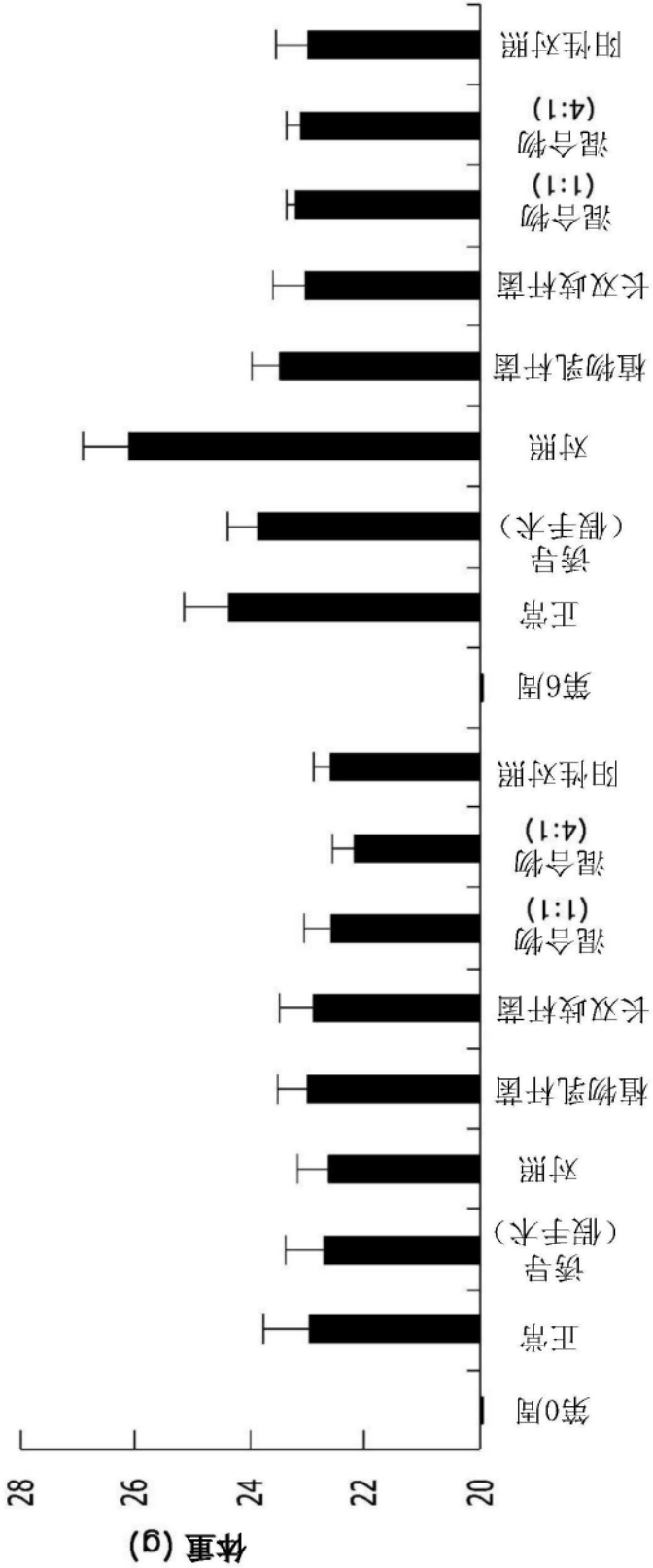


图4

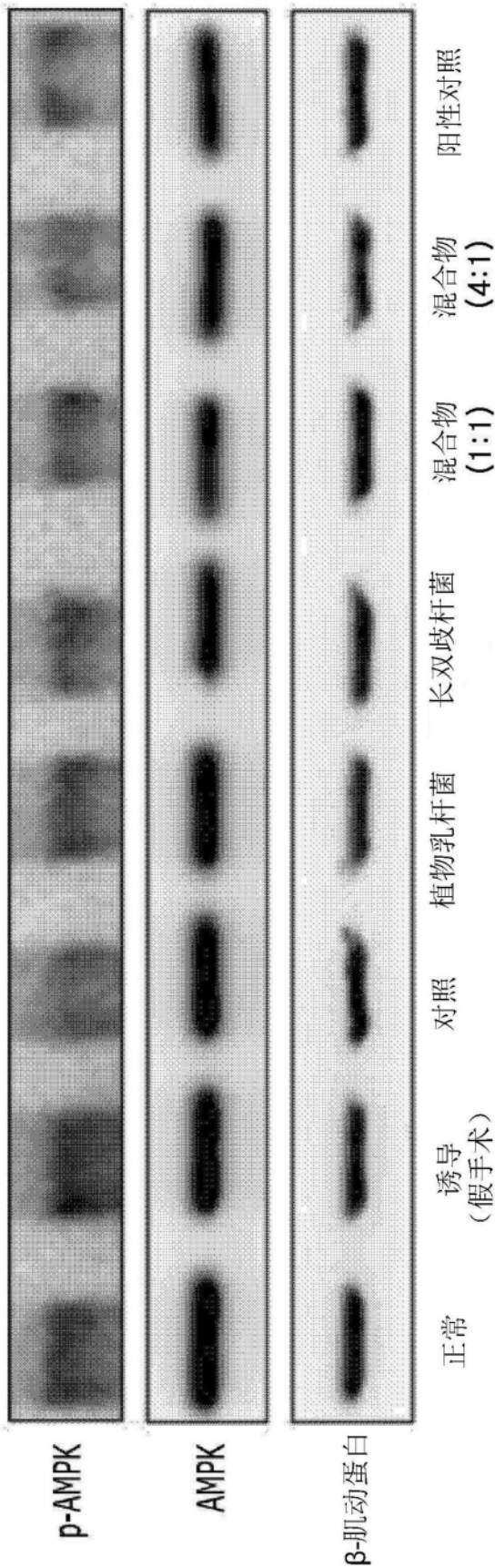


图5

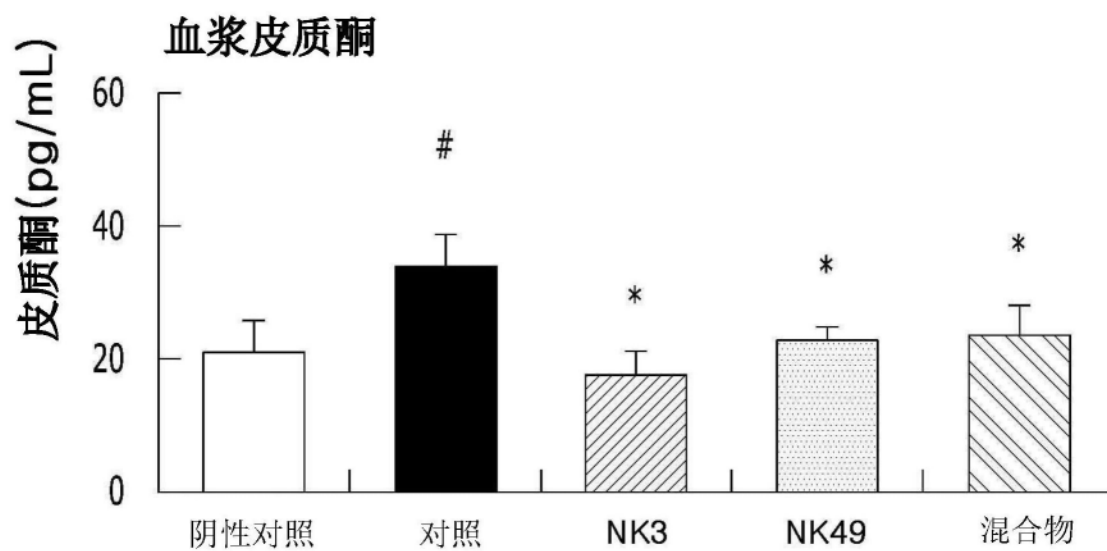


图6

高架十字迷宫

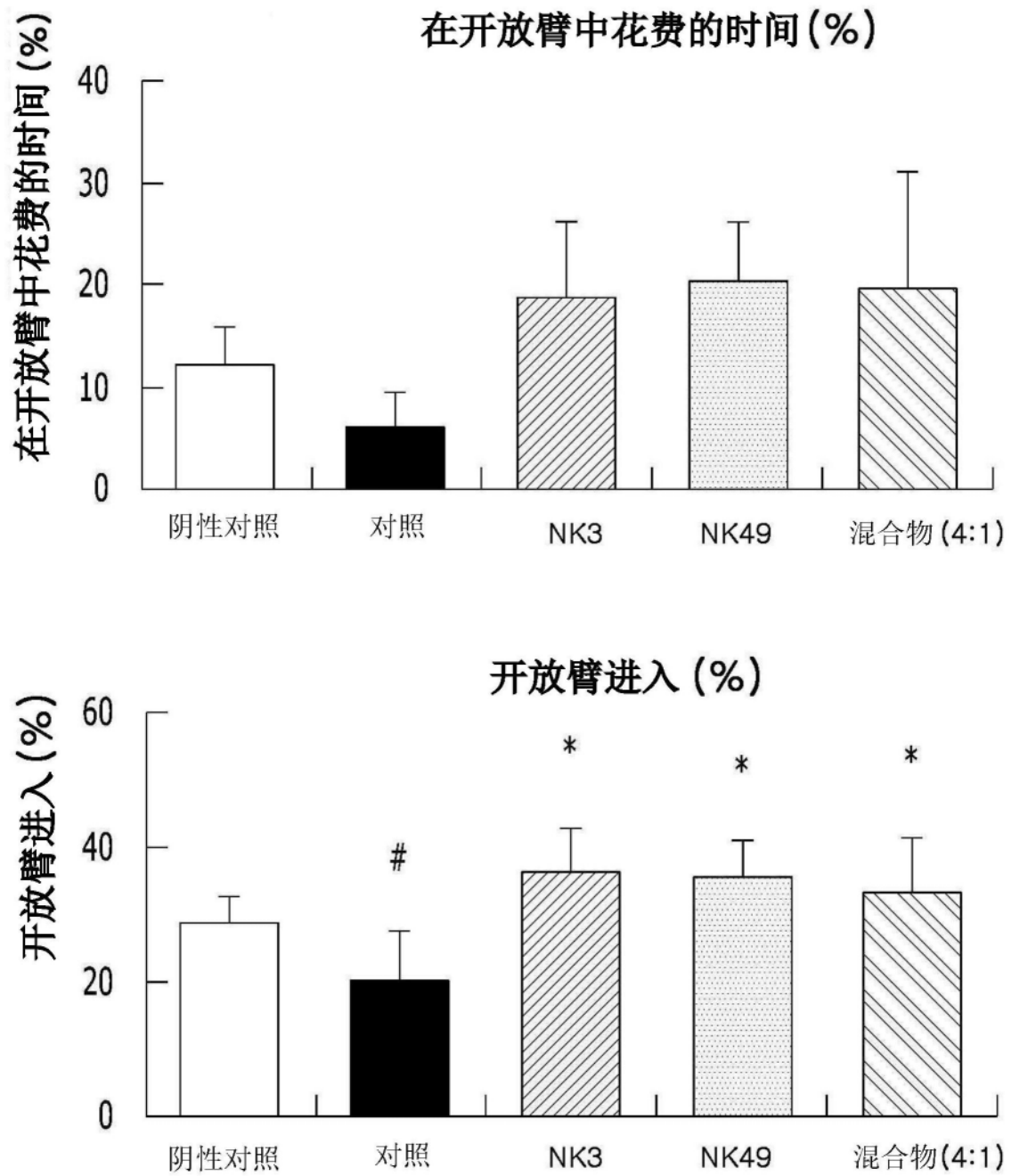


图7

强迫游泳实验

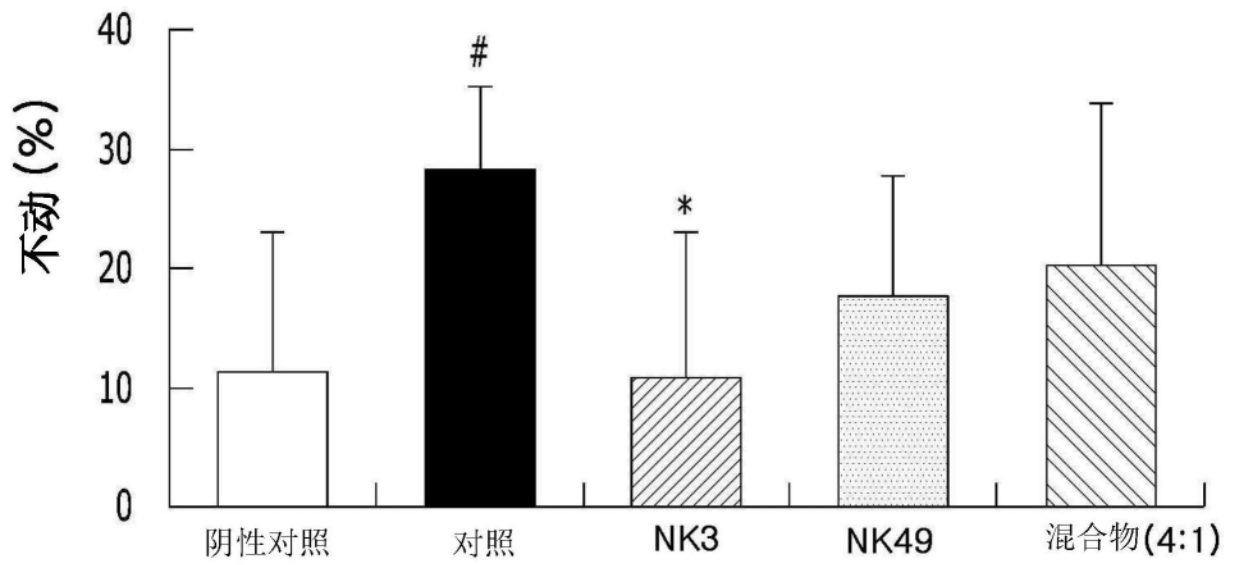


图8

悬尾实验

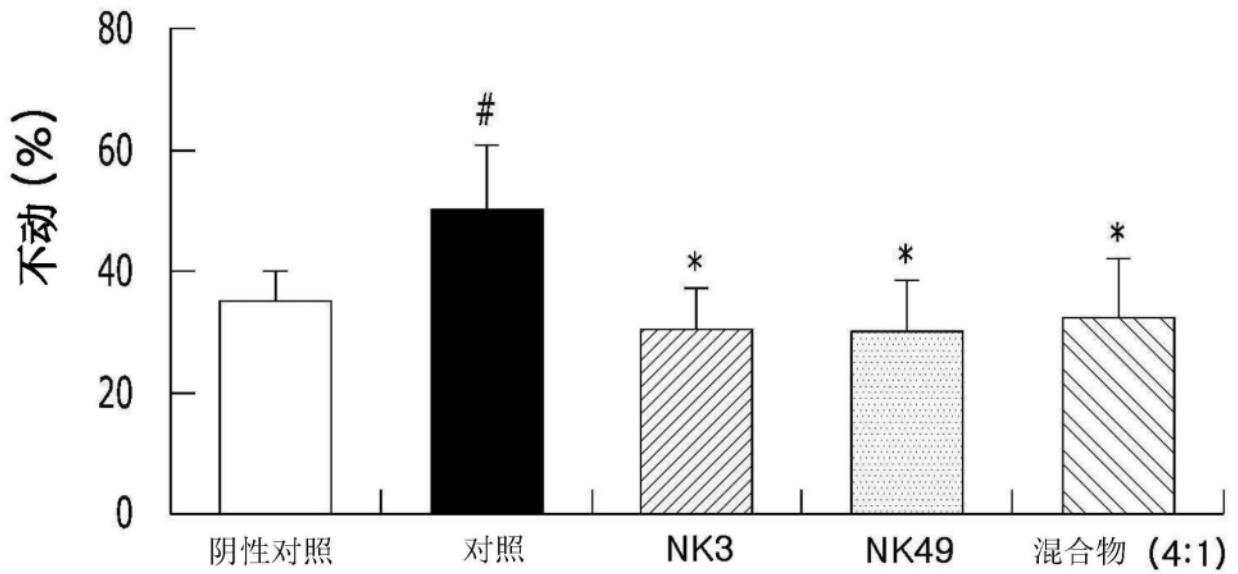


图9