



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111032857 B

(45) 授权公告日 2023. 10. 24

(21) 申请号 201980003708.3  
 (22) 申请日 2019.07.12  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 111032857 A  
 (43) 申请公布日 2020.04.17  
 (30) 优先权数据  
 10-2018-0081910 2018.07.13 KR  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2020.01.21  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/KR2019/008683 2019.07.12  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 WO2020/013672 KO 2020.01.16  
 (83) 生物保藏信息  
 KCCM12287P 2018.07.11  
 KCCM11045P 2009.10.14  
 (73) 专利权人 CJ第一制糖株式会社  
 地址 韩国首尔  
 (72) 发明人 金希渊 文镐镇 孙圭烈 李径珉  
 张润泽 金星勋 裴基德 金奉俊  
 (74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245  
 专利代理师 董志勇  
 (51) Int. Cl.  
 C12N 1/20 (2006.01)  
 A23K 10/16 (2016.01)

A23L 33/135 (2016.01)  
 A61K 8/99 (2017.01)  
 A61K 35/747 (2015.01)  
 A61P 31/14 (2006.01)  
 C12R 1/25 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102597214 A, 2012.07.18  
 CN 102597216 A, 2012.07.18  
 CN 102690771 A, 2012.09.26  
 CN 104480032 A, 2015.04.01  
 CN 106434411 A, 2017.02.22  
 CN 1849388 A, 2006.10.18  
 KR 20120064416 A, 2012.06.19  
 WO 2005007834 A1, 2005.01.27  
 WO 2014072594 A1, 2014.05.15  
 Tae Joon Won等. Immunomodulatory activity of Lactobacillus strains isolated from fermented vegetables and infant stool. Can J Physiol Pharmacol . .2011, 89 (6), 429-34.. (续)

审查员 丁海

权利要求书2页 说明书21页  
 序列表2页 附图10页

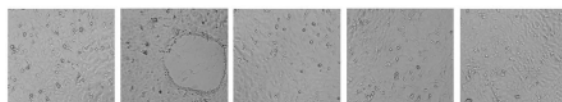
(54) 发明名称

包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物及其用途

(57) 摘要

本申请涉及一种具有耐酸性、耐胆汁性和免疫增强活性的组合物，其包括以获取号KCCM12287P保藏的植物乳杆菌CJLP475菌株和以获取号KCCM11045P保藏的植物乳杆菌CJLP243菌

株;及其用途。



IPEC-J2细胞 接种病毒的IPEC-J2细胞 在用包含CJLP475/免疫细胞的培养肉汤处理之后接种病毒的IPEC-J2细胞 在用包含CJLP243/免疫细胞的培养肉汤处理之后接种病毒的IPEC-J2细胞 在用包含CJLP475+243/免疫细胞的培养肉汤处理之后接种病毒的IPEC-J2细胞

CN 111032857 B

[接上页]

(56) 对比文件

Wandee Sirichokchatchawan等  
.Protective Effects of Cell-Free  
Supernatant and Live Lactic Acid Bacteria  
Isolated from Thai Pigs Against a  
Pandemic Strain of Porcine Epidemic  
Diarrhea Virus.Probiotics Antimicrob

Proteins . .2018,第10卷(第10期),383-390.

J S Lee等.Effect of Lactobacillus  
plantarum CJLP243 on the growth  
performance and cytokine response of  
weaning pigs challenged with  
enterotoxigenic Escherichia coli.J Anim  
Sci . .2012,第90卷(第90期),3709-17.

1. 一种组合物,其包括:
  - (a) 以获取号KCCM12287P保藏的植物乳杆菌CJLP475菌株;和
  - (b) 以获取号KCCM11045P保藏的植物乳杆菌CJLP243菌株,其中所述组合物用于增强哺乳动物的免疫力和提供哺乳动物的抗病毒活性,或所述组合物在药物、饲料或饲料添加剂和化妆品中使用。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物具有耐酸性、耐胆汁性和免疫增强活性,并通过促进哺乳动物中的免疫细胞的激活增加细胞因子的分泌。
3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述细胞因子是选自IL-10、IL-12和TGF- $\beta$ 中的至少一种。
4. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物具有针对猪流行性腹泻病毒的抗病毒活性。
5. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物在施用于受试者时增强免疫力,和其中所述受试者是哺乳动物。
6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述受试者是家畜或宠物。
7. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物在施用于受试者时增加体内抗体,和其中所述受试者是哺乳动物。
8. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物在施用于受试者时增强所述受试者所生后代的免疫力,和其中所述受试者是哺乳动物。
9. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物在施用于受试者时缓解所述受试者所生后代中病毒感染的症状,和其中所述受试者是哺乳动物。
10. 根据权利要求1所述的组合物,其中(a)和(b)为菌株本身、其培养物、其浓缩物或其干燥形式。
11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述组合物进一步包括冷冻保护剂或赋形剂。
12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述冷冻保护剂是选自甘油、海藻糖、麦芽糊精、脱脂奶粉和淀粉的至少一种,并且所述赋形剂是选自葡萄糖、糊精和脱脂乳的至少一种。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的组合物在制备用于增强受试者的免疫力的药物中的用途,和其中所述受试者是哺乳动物。
14. 根据权利要求1至12中任一项所述的组合物在制备用于预防或治疗哺乳动物的病毒感染疾病的药物中的用途,其中所述病毒是猪流行性腹泻病毒。
15. 一种用于制备益生菌组合物的方法,其包括:

制备包括以获取号KCCM12287P保藏的植物乳杆菌CJLP475菌株的组合物;和包括以获取号KCCM11045P保藏的植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物中的每一种;和混合所述包括CJLP475菌株的组合物和所述包括CJLP243菌株的组合物。
16. 根据权利要求15所述的方法,进一步包括将添加剂添加至所述包括CJLP475菌株的组合物、所述包括CJLP243菌株的组合物或所述益生菌组合物中的至少一种。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述添加剂是冷冻保护剂,并且所述方法进一步包括在添加所述添加剂之后的冻干步骤。
18. 根据权利要求17所述的方法,其中在冻干后的所述组合物中的菌株处于存活状态。

19. 根据权利要求15所述的方法, 包括在所述混合步骤之后将预定量的所述组合物制备成包装。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中在包装步骤中将所述组合物制备成包装, 使得包括所述CJLP475菌株和所述CJLP243菌株的菌株的总量为 $10^6$  CFU/g或更多。

## 包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物及其用途

### 技术领域

[0001] 本公开内容涉及一种组合物,其包括植物乳杆菌CJLP475菌株;和植物乳杆菌CJLP243菌株,并且具有耐酸性、耐胆汁性、抗病毒和免疫增强活性。

### 背景技术

[0002] 在当前的畜牧业中,家畜由于高度传染性的病毒性疾病而被杀死,这通常会给农场造成经济损失。特别是在养猪业中,由病毒和病菌引起的传染病,比如猪呼吸道疾病综合征、断奶后多系统消耗性综合征、猪生殖和呼吸综合征、猪流行性腹泻——其为四大主要慢性消耗性疾病——已引起巨大的经济损失。

[0003] 其中,猪流行性腹泻是由猪流行性腹泻病毒(PEDV)感染引起的猪消化疾病,所述猪流行性腹泻病毒是冠状病毒家族中的成员。该病毒在小肠和大肠的绒毛中增殖,并在各个年龄段的猪,特别是仔猪中引起急性肠炎、呕吐和水样腹泻。具体地,损害主要在冬季——11月至4月——严重,并且已知断奶前仔猪在出生1周内的死亡率约为50%,并且在严重的情况中,由于极端脱水死亡率几乎可以达到100%。

[0004] PED病毒于1971年在欧洲被首次识别,并在1976年在比利时进一步鉴定并分离出G1a型PEDV CV777。该病毒于二十世纪八十年代在欧洲传播,并在二十世纪九十年代在包括中国(包括台湾地区)、韩国、日本在内的东亚国家和地区发生爆发。此外,G2b型PEDV——其比G1a型更具毒性——在2010年首次在中国出现。新型PEDV已传播到北美(美国和加拿大),并且进一步传播到东南亚和欧洲,这造成了严重损害。2013年,由于美国养猪业生产力的损失,损害估计约为2.2万亿韩元。据报道,在韩国,每年有20%至40%的养猪场爆发PEDV,这造成全部猪的6%被杀死。另据报道,进入和离开屠宰场的车辆的感染率达到约60%(韩国农村经济研究所,韩国猪兽医协会)。

[0005] 到目前为止,预防G2b型PED病毒的唯一方法是彻底灭菌。许多农场使用人造感染方法或现有的G1a型PEDV疫苗来预防由病毒性疾病引起的损害,但是在预防G2b型PEDV感染方面存在局限性。另外,还正在使用新开发的灭活的G2b型PEDV疫苗。然而,关于PEDV的预防措施已经出现了数个问题,比如显示出灭活疫苗在预防消化疾病方面的局限性,因为仅使用灭活疫苗,而不是开发活疫苗。为了克服这些问题,积极地进行用于预防和治疗PED病毒(疫苗等)和治疗(IgY、精油、有机酸、益生菌等)的试剂的开发。具体地,最近研究了一种使用功能材料增强免疫力的方法,该功能材料在体内刺激免疫系统同时具有抗病毒作用。

[0006] 免疫通常分为先天免疫和适应性免疫。先天免疫是能够从第一线立即防御病原体感染的系统,其直接作用于侵入物(抗原)或诱导适应性免疫。适应性免疫是更复杂和更精确的系统,其识别并清除侵入物,或者充当相应侵入物的记忆,从而提供与先天免疫相比更永久性的免疫功能。树突细胞(DC)、巨噬细胞和天然杀伤细胞——其为与先天免疫相关的抗原呈递细胞——直接发挥先天免疫功能,并具有辅助激活各种类型的T细胞的受体,从而分泌细胞因子。适应性免疫是针对进入身体的抗原的二级防御系统,并且是由B淋巴细胞和

T淋巴细胞进行的特异性免疫应答。由抗原激活的T细胞控制的免疫应答包括细胞毒性T细胞应答和辅助T细胞应答。与先天免疫相关的树突细胞、巨噬细胞和天然杀伤细胞也识别外来侵入性物质并分泌各种类型的细胞因子,比如IL-12和IL-4,从而诱导适当地改变宿主动物的免疫力的应答,并且因此可以在适当的方向上提供免疫防御机制。幼稚(naive)CD4 T细胞——其充当T细胞的前体——通过关键细胞因子分化。例如,如果IL-12(白细胞介素12)以高浓度存在,则CD4 T细胞促进Th1(T辅助1)细胞的分化,从而诱导根除细胞内病原体的CTL(细胞毒性T淋巴细胞)应答,而如果IL-4(白细胞介素4)以高浓度存在,则它们诱导特异性根除细胞外病原体(B细胞的抗体分泌物)的应答。此外,上述列举的免疫细胞通过分泌TGF- $\beta$ (转化生长因子 $\beta$ )和IL-10抑制过度的免疫应答比如炎症反应,分泌TGF- $\beta$ 以抑制过度的免疫应答并且从而激活调节T细胞,通过响应于TGF- $\beta$ 和IL-6(白细胞介素-6)的分泌将B细胞转化为浆细胞来刺激抗体的产生,或诱导免疫应答(Th17)以根除错误的自身免疫和细胞外病原体,以适当的方式通过详细而复杂的过程对进入身体的侵入物做出反应。然而,由于失衡或差的免疫应答,这种免疫应答有时需要另外的和适当的免疫增强子。

## 发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明人通过分离和鉴定能够激活免疫系统同时表现出针对上面提到的病毒的抑制活性的新型微生物并确认了它们的活性而完成本公开内容。

[0009] 技术方案

[0010] 本公开内容的一个目的是提供一种组合物,其包括:

[0011] (a)以获取号KCCM12287P保藏的植物乳杆菌CJLP475菌株;和

[0012] (b)以获取号KCCM11045P保藏的植物乳杆菌CJLP243菌株。

[0013] 根据本公开内容的一个实施方式,(a)和(b)的形式可以是菌株本身、其裂解物、其培养物、其浓缩物或其干燥形式。

[0014] 本公开内容的另一个目的是提供包括上述组合物的饲料或饲料添加剂。

[0015] 本公开内容的仍另一个目的是提供包括上述组合物的食品。

[0016] 本公开内容的仍又另一个目的是提供包括上述组合物的化妆品。

[0017] 本公开内容的仍又另一个目的是提供包括上述组合物的药物。

[0018] 本公开内容的仍又另一个目的是提供用于增强受试者的免疫力的方法,其包括将上述组合物施用于有需要的受试者。

[0019] 本公开内容的仍又另一个目的是提供用于预防或治疗受试者的病毒感染的疾病的方法,其包括将上述组合物施用于有需要的受试者。

[0020] 本公开内容的仍又另一个目的是提供组合物在预防或治疗病毒感染的疾病中的用途。

[0021] 有益效果

[0022] 本公开内容的包括植物乳杆菌CJLP475菌株;和植物乳杆菌CJLP243菌株的每种组合物具有高耐酸性和耐胆汁性,并且因此可以作为益生菌提供。该组合物在体内激活免疫细胞,并且从而允许调节免疫功能,并且特别地展现出针对猪流行性腹泻病毒(PEDV)感染的优异抑制活性。另外,可以发现,当给母猪饲喂本公开内容的组合物,并用PED病毒攻击从

母猪中分娩的仔猪时,仔猪的死亡率可以显著降低,并且由于免疫调节作用,也可以减少病毒释放物。因此,本公开内容可以提供一种组合物,其包括植物乳杆菌CJLP475菌株;和植物乳杆菌CJLP243菌株,并且具有针对PED病毒的抗病毒活性,免疫增强活性,以及在家畜中提高增重和减少腹泻发生率的作用,并且因此,该组合物可以有效地用作饲料组合物或用于饲料添加剂的组合物、食品组合物、化妆品组合物或药物组合物。

### 附图说明

- [0023] 图1显示了证实植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株无溶血活性的血琼脂平板的图像。
- [0024] 图2是显示包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物没有细胞毒性的图。
- [0025] 图3是显示组合物的促进IL-12分泌作用的图。
- [0026] 图4是显示组合物的促进IL-10分泌作用的图。
- [0027] 图5是显示组合物的促进TGF- $\beta$ 分泌作用的图。
- [0028] 图6显示了图解组合物对PED病毒感染的抑制作用的显微镜图像。
- [0029] 图7是显示口服施用组合物对断奶仔猪中ADG平均值的影响的图。
- [0030] 图8是显示口服施用组合物对断奶仔猪中腹泻发生率的影响的图。
- [0031] 图9是显示用该组合物饲喂的母猪血清中的总IgG抗体滴度的图。
- [0032] 图10是显示用该组合物饲喂的母猪血清中的总IgA抗体滴度的图。
- [0033] 图11是显示用该组合物饲喂的母猪初乳中的总IgG抗体滴度的图。
- [0034] 图12是显示用该组合物饲喂的母猪所生仔猪的血清中的总IgA抗体滴度的图。
- [0035] 图13是显示在用该组合物饲喂的母猪所生仔猪中PEDV感染后体温变化的图。
- [0036] 图14是显示在用该组合物饲喂的母猪所生仔猪中PEDV感染后腹泻发生率的图。
- [0037] 图15是显示在用该组合物饲喂的母猪所生仔猪中PEDV感染后存活率的图。
- [0038] 图16是显示在用该组合物饲喂的母猪所生仔猪中PEDV感染后消化器官中PEDV含量的图。
- [0039] 图17是显示用该组合物饲喂的母猪和该母猪所生仔猪的血清中针对PEDV的中和抗体滴度的图。
- [0040] 图18是显示用该组合物饲喂的母猪的初乳中针对PEDV的中和抗体滴度的图。

### 具体实施方式

- [0041] 在下文中,将更详细地描述本公开内容。同时,本文公开的每个描述和实施方式可以分别应用于其他描述和实施方式。即,本文公开的各种要素的所有组合都落入本公开内容的范围内。此外,本公开内容的范围不受以下描述的具体描述的限制。
- [0042] 为了克服上述目的,本公开内容的一个方面提供了一种组合物,其包括:
- [0043] (a) 以获取号KCCM12287P保藏的植物乳杆菌CJLP475菌株;和
- [0044] (b) 以获取号KCCM11045P保藏的植物乳杆菌CJLP243菌株。
- [0045] 具体地,该组合物可以具有抗病毒性、耐酸性、耐胆汁性和免疫增强活性。
- [0046] 如本文所使用,术语“乳杆菌”是自然界中广泛分布的需氧或兼性厌氧革兰氏阳性

杆菌的微生物。属于乳杆菌属的微生物包括植物乳杆菌等。它对应于益生菌菌株,对人体无害,并且可以无副作用地使用。

[0047] 如本文所使用,术语“益生菌”是指进入身体并提供健康益处的活细菌。迄今为止已知的大多数益生菌通过由乳酸菌比如乳杆菌制成的发酵乳制品消耗(consume)。然而,近年来,益生菌以发酵乳、颗粒剂、粉剂等形式在市场上销售,除乳杆菌以外,其还由一些细菌组成,比如双歧杆菌和肠球菌。本公开内容的植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株也可以以发酵乳、颗粒剂、粉剂等形式使用,但不限于此。

[0048] 如本文所使用,术语“耐酸性”是指禁得起高酸性的性质。如果益生菌是耐酸的,则即使当通过包括口服施用在内的各种施用途径消耗暴露于胃中的强酸性条件时,也可以防止它们被降解或破坏。

[0049] 如本文所使用,术语“耐胆汁性”是指对胆汁中的消化酶的抗性。胆汁由肝脏制成并储存在胆囊中,并且是有助于消化小肠的十二指肠中的脂肪的弱碱性的棕绿色液体。它乳化脂肪以帮助消化和吸收。胆汁是降低益生菌施用效果的主要原因之一,因为它们对通过包括口服施用等的各种途径摄入的益生菌起作用。

[0050] 具体地,在本公开内容的组合物中,从传统发酵食品酱油中分离出植物乳杆菌CJLP475菌株,并且从传统发酵食品朝鲜泡菜中获得植物乳杆菌CJLP243菌株。该菌株的形态学特征是每种菌株均为革兰氏阳性杆菌,和植物乳杆菌CJLP475菌株由SEQ ID NO:1的16s rDNA核苷酸序列表示,和植物乳杆菌CJLP243菌株由SEQ ID NO:2的16s rDNA核苷酸序列表示。分析每个核苷酸序列,并且发现与植物乳杆菌约99%同源。

[0051] 为了长时期稳定地维持本公开内容的植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株,可以通过将细胞溶解在通过在-70°C下将一定量的甘油在水中混合而制备的储存溶液中来储存菌株,或可以通过将细胞悬浮在灭菌的10%脱脂乳中冻干菌株,但不限于此,并且可以通过各种已知方法长时间保存。

[0052] 本公开内容的组合物可能不展现出针对红细胞的溶血活性。溶血是指红细胞的破坏和血红蛋白向周围区域的释放,并且是由体内有害细菌产生的酶将红细胞溶血的活动。因此,即使该组合物在体内施用,其也不会引起血管中溶血。

[0053] 另外,本公开内容的组合物可具有弱耐药性或对抗生素没有耐药性。抗生素具体可以为但不限于氨苄西林、克林霉素、庆大霉素、卡那霉素、红霉素、氨苄西林/舒巴坦、氯霉素或链霉素。因此,即使当该组合物用于药物、保健功能食品、饲料添加剂等时,它对抗生素也没有耐药性,并且因此引起相关药理作用或环境问题的可能性很低。

[0054] 该组合物可以增强免疫细胞的激活以增加细胞因子的分泌,或者可以在体内施用以促进免疫功能。

[0055] 如本文所使用,术语“免疫细胞”是指在体内起免疫功能作用的所有细胞,并且可以大体上分为T细胞和B细胞。免疫细胞可以包括但不限于Th1或Th2细胞。本公开内容的组合物可具有刺激免疫细胞的活性,并且从而增加细胞因子比如IL-12、IL-10或TGF- $\beta$ 的分泌。

[0056] 在通常显示高死亡率的病毒性疾病中,由于病毒引起的细胞或组织自身坏死可导致其他细菌诱导的继发感染和败血症,由过度激活的免疫应答引起的炎症性疾病,或食欲下降和脱水。因此,当抑制病毒感染的抗病毒效力(与Th1和Th2相关)和调节继发感染和过

度炎症反应的免疫应答(Th2, 抗炎)同时增强时,可以实现对于病毒性疾病的有效预防和治疗效果。因此,关于通过益生菌提供免疫增强作用同时增强Th1和Th2的方法在本领域中是未知的,并且本发明人已经新近发现了这种方法。另外,本公开内容的组合物具有调节Th1/Th2失衡的免疫调节能力。

[0057] 如本文所使用,术语“细胞因子”是指用作控制和刺激身体防御系统的信号物质的糖蛋白,并且可以是例如IL-12、IL-10或TGF- $\beta$ ,但不限于此。

[0058] 该组合物在施用于受试者时可以促进受试者的生长或减少腹泻发生率。

[0059] 如本文所使用,术语“受试者”可以指其中免疫力减弱或可能减弱的所有动物,包括人类。例如,受试者可以包括除人类之外或包括人类在内的动物。动物不仅可以包括人类,而且还可以包括需要揭示上述效力的所有动物,并且具体地可以是哺乳动物,比如牛、马、绵羊、猪、山羊、骆驼、羚羊、狗、猫等,或者可选地可以是家畜或宠物。

[0060] 上述施用方法没有特别限制,但是可以通过各种途径施用,其包括口服或肠胃外途径,只要它可以到达靶组织。其实例可以是口服施用。

[0061] 该组合物可以增加身体内的抗体。可以通过增加参与免疫功能的抗体的分泌来改善受试者的免疫力。可以将组合物施用于受试者,并且施用方法没有特别限制,但是可以通过各种途径施用,其包括口服或肠胃外途径,只要它可以到达靶组织。其实例可以是口服施用。身体可以是体液,比如血液或初乳,但不限于此。抗体可以是IgG、IgA或中和抗体,但不限于此。

[0062] 组合物在施用于受试者时可以通过母体抗体增强受试者所生后代的免疫力。免疫力的增强可以包括抗体的增加,但不限于此。

[0063] 组合物在施用于受试者时可缓解受试者所生后代中病毒感染的症状。病毒可以是猪流行性腹泻病毒(PEDV),并且可以包括但不限于本公开内容的组合物可以抑制其感染的任何病毒。症状的缓解可以包括但不限于缓解消化器官的病症、维持正常体温、减少腹泻和增加存活率。

[0064] 组合物可以具有针对猪流行性腹泻病毒(PEDV)的抗病毒活性。

[0065] 如本文所使用,术语“抗病毒”是指抑制病毒感染的性质。益生菌本身不能灭活病毒,但可以通过免疫活性增加病毒感染的受试者的免疫力,从而允许抵抗病毒感染。

[0066] 猪流行性腹泻病毒是一种冠状病毒,其感染内衬猪小肠的细胞,引起猪流行性腹泻,猪流行性腹泻诱导严重腹泻和脱水。该病毒可以非限制性地包括本公开内容的组合物可以抑制其感染的任何病毒。

[0067] 在本公开内容的组合物中分别对应于(a)和(b)的菌株的形式可以是菌株本身、其裂解物、其培养物、其浓缩物或其干燥形式。当在受试者上处理菌株时,可以显著抑制PED病毒的活性和感染。因此,该组合物可用作针对PED病毒的抗病毒组合物,或用于预防或改善猪流行性腹泻的药物组合物、保健功能食品组合物、药物组合物或饲料组合物。

[0068] 根据本公开内容的一个实施方式,本公开内容的组合物中的(a)和(b)的形式可以是菌株本身、其裂解物、其培养物、其浓缩物或其干燥形式,但不限于此。关于该组合物的进一步细节可以参考以上描述。

[0069] 本公开内容的菌株可以通过培养乳杆菌菌株的常规方法培养。可以使用天然培养基或合成培养基作为培养基。可以使用例如葡萄糖、蔗糖、糊精、甘油、淀粉等作为培养基的

碳源。可以使用蛋白胨、肉膏、酵母提取物、干酵母、大豆、铵盐、硝酸盐和其他有机或无机含氮化合物作为氮源,但不限于此。可以使用镁、锰、钙、铁、钾等作为包括在培养基中的无机盐,但不限于此。除了碳源、氮源和无机盐组分以外,还可以将氨基酸、维生素、核酸和相关化合物添加到培养基中。本公开内容的组合物可以在20℃至40℃的温度范围内培养12小时至4天。

[0070] 在本公开内容中,培养肉汤可以指完成培养之后的组合物,并且更具体地,培养肉汤可以包括或不包括细胞。因此,培养肉汤可以包括培养上清液、从其去除了培养上清液的组合物或其浓缩的组合物。培养肉汤的组合物可以另外地不仅包含乳杆菌的常规培养所需的组分,而且还包含与乳杆菌的生长协同起作用的组分,并且其组成可以由本领域技术人员容易地选择。

[0071] 另外,菌株可以处于液体状态或干燥状态,并且干燥方法可以包括但不限于风干、自然干燥、喷雾干燥和冻干。

[0072] 组合物可以是包含两种类型的菌株的复方制剂,其中同时包含(a)以获取号KCCM12287P保藏的植物乳杆菌CJLP475菌株;和(b)以获取号KCCM11045P保藏的植物乳杆菌CJLP243菌株。因此,组合物可以仅由对应于(a)和(b)的两种类型的菌株、其裂解物、其培养物、其浓缩物或其干燥产物组成,但不限于此。在该情况下,对应于上述(a)和(b)的两种类型的菌株在组合物中不一定必须是相同形式,并且可以是多种形式的组合——如果需要的话,(a)的形式可以是菌株本身,和(b)的形式可以是菌株的裂解物,但不限于此。

[0073] 植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的混合物在组合物中的浓度可以是但不限于 $10^5$ CFU/mL至 $10^{10}$ CFU/mL、 $10^5$ CFU/mL至 $10^9$ CFU/mL、 $10^5$ CFU/mL至 $10^8$ CFU/mL、 $10^5$ CFU/mL至 $10^7$ CFU/mL、 $10^5$ CFU/mL至 $10^6$ CFU/mL、 $10^6$ CFU/mL至 $10^{10}$ CFU/mL、 $10^7$ CFU/mL至 $10^{10}$ CFU/mL、 $10^8$ CFU/mL至 $10^{10}$ CFU/mL、 $10^9$ CFU/mL至 $10^{10}$ CFU/mL、 $10^6$ CFU/mL至 $10^9$ CFU/mL、 $10^6$ CFU/mL至 $10^8$ CFU/mL、 $10^6$ CFU/mL至 $10^7$ CFU/mL、 $10^7$ CFU/mL至 $10^9$ CFU/mL、 $10^7$ CFU/mL至 $10^8$ CFU/mL或 $10^8$ CFU/mL至 $10^9$ CFU/mL。

[0074] 组合物可以进一步包括冷冻保护剂或赋形剂。冷冻保护剂或赋形剂可以是非天然存在的物质或天然存在的物质,但不限于此。在另一个实施方式中,冷冻保护剂或赋形剂可以是不与植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株天然接触的物质,或者是与这两种菌株不同时天然包含的物质,但不限于此。在仍另一个实施方式中,组合物可以进一步包括选自甘油、海藻糖、麦芽糊精、脱脂奶粉和淀粉的至少一种冷冻保护剂,和/或选自葡萄糖、糊精和脱脂乳的至少一种赋形剂。基于组合物的总重量,可以包含按重量计0.01%至20%和按重量计0.01%至10%的量的本公开内容的冷冻保护剂。具体地,在组合物中可以包含按重量计5%至20%的量的甘油,可以包含按重量计2%至10%的量的海藻糖,可以包含按重量计2%至10%的量的麦芽糊精,可以包含按重量计0.5%至2%的量的脱脂奶粉,和可以包含按重量计0.1%至1%的量的淀粉。另外,基于组合物的总重量,可以包含按重量计75%至95%或按重量计85%至95%的量的赋形剂。

[0075] 此外,用于制备组合物的方法可以包括将植物乳杆菌CJLP475和植物乳杆菌CJLP243菌株本身、其裂解物、其培养物、其浓缩物或其干燥产物与添加剂混合。添加剂可以是上面提到的冷冻保护剂或赋形剂。

[0076] 组合物可用于食品、功能食品、饲料、饲料添加剂、化妆品组合物或药物组合物。

[0077] 组合物可用于增强免疫力。

[0078] 组合物可用于提供抗病毒活性。

[0079] 在另一方面中,提供了一种益生菌组合物,其包括本公开内容的组合物作为活性成分。

[0080] 益生菌被固定在肠道中消化道的壁上以防止有害细菌的建立并抑制病毒的增殖。另外,通过益生菌产生的有益消化酶通过促进营养物的吸收和利用来促进生长。

[0081] 用于制备益生菌组合物的方法可以包括制备包括以获取号KCCM12287P保藏的植物乳杆菌CJLP475菌株的组合物和包括以获取号KCCM11045P保藏的植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物中的每一种;和混合包括CJLP475菌株的组合物和包括CJLP243菌株的组合物。

[0082] 在一个实施方式中,制备方法可以包括将添加剂添加至上述组合物中的至少一种,比如包括CJLP475菌株的组合物、包括CJLP243菌株的组合物或益生菌组合物。

[0083] 在另一个实施方式中,添加剂可以是冷冻保护剂,并且该方法可以进一步包括在添加添加剂之后的冻干步骤。

[0084] 本文冻干组合物中的细菌可以处于存活状态。

[0085] 在仍另一个实施方式中,制备方法可以包括在混合步骤之后将预定量的组合物制备成包装。

[0086] 本文在包装步骤中组合物可以制备成包装,使得包括CJLP475菌株和CJLP243菌株的菌株的总量为 $10^6$ CFU/g或更多。

[0087] 在本公开内容的仍另一方面中,提供了包括该组合物的饲料或饲料添加剂。

[0088] 上面描述了上述组合物。具体地,出于促进生长、减少腹泻发生率和抑制病毒活性的目的,可以将本公开内容的组合物添加至饲料添加剂或包括饲料添加剂的饲料组合物。

[0089] 如本文所使用,术语“饲料添加剂”是指出于提供各种效果的目的比如补充营养物和防止体重减轻、促进饲料中纤维素的消化率、改善牛奶质量、防止生殖障碍和提高怀孕率以及防止在夏季期间的高温胁迫(high-temperature stress)而添加到饲料中的物质。根据家畜和鱼类饲料控制法(the Control of Livestock and Fish Feed Act),本公开内容的饲料添加剂属于补充饲料,并且可以进一步包括矿物质制品,比如碳酸氢钠、膨润土、氧化镁、复合矿物质,和痕量矿物质,其包括锌、铜、钴和硒;维生素,比如胡萝卜素、维生素E、维生素A、D、E、烟酸和维生素B复合物;氨基酸保护剂,比如甲硫氨酸和赖氨酸;脂肪酸保护剂,比如脂肪酸钙;以及活细菌和酵母制品,比如益生菌(乳酸菌)、酵母培养物和真菌发酵产物。

[0090] 如本文所使用,术语“饲料”是指动物进食、摄食和消化或适合于进食、摄食和消化的任何天然或人造饮食、单餐等,或单餐的组分。可以将包括作为活性成分的根据本公开内容用于预防或治疗代谢疾病的组合物的饲料制备成本领域已知的各种形式的饲料,并且可以具体地包括浓缩饲料、粗饲料和/或特种饲料。

[0091] 出于本公开内容的目的,待饲养的受试者可以包括可以摄食本公开内容的饲料的任何生物,并且可以包括猪。

[0092] 根据待施加的受试者的种类和年龄、施加形式、期望效果等,可以适当地控制根据本公开内容的饲料组合物中的组合物的含量。例如,可以包含按重量计0.01%至20%、按重量计0.01%至15%、按重量计0.01%至10%、按重量计0.01%至5%、按重量计0.01%至

1%、按重量计1%至20%、按重量计1%至15%、按重量计1%至10%、按重量计1%至5%、按重量计5%至20%、按重量计5%至15%、按重量计5%至10%、按重量计10%至20%、按重量计10%至15%或按重量计15%至20%的量的组合物,但不限于此。

[0093] 为了施用,本公开内容的饲料组合物可以进一步包括下列一种或多种的混合物:有机酸,比如柠檬酸、富马酸、己二酸、乳酸等;磷酸盐,比如磷酸钾、磷酸钠、多磷酸盐等;和天然抗氧化剂,比如多酚、儿茶素、生育酚、维生素C、绿茶提取物、壳聚糖、鞣酸等。如果需要的话,可以添加其他典型的添加剂,比如抗流感剂、缓冲剂、抑菌剂等。此外,可以另外添加稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂或润滑剂以将该组合物配制成可注射制品(比如水溶液、悬浮液、乳剂等)、胶囊、颗粒剂或片剂。

[0094] 此外,本公开内容的饲料组合物可以与下列成分一起使用:营养补充剂、生长促进剂、消化吸收促进剂和预防剂,另外各种助剂比如氨基酸、无机盐、维生素、抗氧化剂、抗真菌剂、抗微生物剂等作为辅助组分,和主要成分,其包括植物蛋白饲料比如粉碎的或破碎的小麦、大麦、玉米等,动物蛋白饲料比如血粉、肉粉、鱼粉等,动物脂肪和植物脂肪。

[0095] 当本公开内容的饲料组合物用作饲料添加剂时,饲料组合物可以被单独添加或与其他组分组合使用,并且可以根据常规方法适当地使用。饲料组合物可以与无毒的、药学上可接受的载体组合制备成速释或缓释制剂的施用形式。载体可以是非天然存在的物质或天然存在的物质,但不限于此。在另一个实施方式中,载体可以是不与植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株天然接触的物质,或者是与这两种菌株不同时天然包含的物质,但不限于此。可食用载体可以是玉米淀粉、乳糖、蔗糖或丙二醇。固体载体可以是片剂、粉剂、锭剂等施用形式,并且液体载体可以是糖浆剂、液体悬浮液、乳剂、溶液等施用形式。进一步,施用剂可以包括防腐剂、润滑剂、溶液促进剂或稳定剂,并且还可以包括用于改善炎症性疾病的其他试剂和可用于预防病毒的物质。

[0096] 基于饲料的干重,根据本公开内容的饲料组合物可以以每1kg约10g至500g,具体地10g至100g的量与饲料混合。在完全混合之后,饲料组合物可以提供为糊状物,或可以进一步经历粒化、扩大化(extensification)或挤出过程,但不限于此。

[0097] 在本公开内容的仍又另一方面中,提供了包括该组合物的食品或功能食品。

[0098] 具体地,出于促进生长、促进免疫、减少腹泻发生率和抑制病毒活性的目的,可以将本公开内容的组合物添加到食品中。组合物为如上所述。食品可以包括饮食学(sitologically)可接受的载体。载体可以是非天然存在的物质或天然存在的物质,但不限于此。在另一个实施方式中,载体可以是不与植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株天然接触的物质,或者是与这两种菌株不同时天然包含的物质,但不限于此。

[0099] 本公开内容的食品包括所有形式的功能食品、营养补充剂、保健食品和食品添加剂,并且这些类型的食品可以根据常规方法制备成各种形式。

[0100] 当该组合物被用作食品添加剂时,该组合物可以被单独添加或与其他食品或食品成分组合使用,并且可以根据常规方法适当地使用。可以根据使用目的(预防、保健或治疗处理)适当地确定混合的活性成分的量。通常,在制备食品或饮料时,每次基于包括该组合物的原料组合物,该组合物以按重量计0.0001%至1%,具体地按重量计0.0001%至0.1%的量添加。然而,在出于保健和卫生目的或出于控制健康的目的长期施用的情况下,该量可以小于上述范围。

[0101] 食品的类型没有具体限制。可以将该组合物添加到其中的食品的实例包括肉类、香肠、面包、巧克力、糖果、小吃、甜食、比萨饼、方便面、其他面条、口香糖、乳制品(包括冰淇淋)、各种汤、饮品、茶、饮料、酒精饮料、维生素复合物等,并且包括在普通意义上的所有保健功能食品。

[0102] 本公开内容的保健饮料组合物可以进一步包含如在常规饮料中的各种调味剂或天然碳水化合物作为另外的组分。上述天然碳水化合物可以包括单糖,比如葡萄糖、果糖等;二糖,比如麦芽糖、蔗糖等;多糖,比如糊精、环糊精等;和糖醇,比如木糖醇、山梨糖醇、赤藓糖醇等。天然甜味剂,比如奇异果甜蛋白、甜叶菊提取物等;和合成甜味剂,比如糖精、天冬甜素等可以用作甜味剂。基于按重量计100份的本公开内容的组合物,另外的组分的比例的范围可以为按重量计0.01至0.04份,具体地按重量计0.02至0.03份。

[0103] 除了上述组分以外,本公开内容的组合物可以包含各种营养补充剂、维生素、电解质、调味剂、着色剂、果胶酸和其盐、藻酸和其盐、有机酸、保护性胶体增稠剂、pH控制剂、稳定剂、防腐剂、甘油、醇、碳酸饮料中使用的碳酸化剂等。这种添加剂的比例并不重要,但是基于按重量计100份的本公开内容的组合物,通常在按重量计0.01至0.1份的范围内选择。而且,本公开内容的组合物可以包括用于制备天然果汁、果汁饮料或蔬菜饮料的果肉。这种果肉的比例并不重要,但是基于按重量计100份的本公开内容的组合物,通常在按重量计0.01至10份的范围内选择。这种组分可以单独使用或组合使用。

[0104] 在本公开内容的仍又另一方面中,提供了包括该组合物的化妆品。

[0105] 具体地,本公开内容的组合物通过免疫刺激而具有抗炎作用和抗病毒活性抑制作用,并且因此可以用作化妆品。组合物为如上所述。

[0106] 当将根据本公开内容的组合物用作化妆品时,该组合物可以制备成化妆品领域中已知的常规制剂的各种化妆品。在制备成每种制剂时,其可以通过添加载体或赋形剂来制备,该载体或赋形剂在制造每种制剂的化妆品中是可接受的和必需的。载体可以是非天然存在的物质或天然存在的物质,但不限于此。在另一个实施方式中,载体可以是不与植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株天然接触的物质,或者是与这两种菌株不同时天然包含的物质,但不限于此。

[0107] 在本公开内容的仍又另一方面中,提供了包括该组合物的药物。具体地,本公开内容的组合物通过促进生长、减少腹泻发生率和刺激免疫而具有抗炎作用和抗病毒活性抑制作用,并且因此可以用作药物。组合物为如上所述。

[0108] 当将根据本公开内容的组合物用作药物时,该组合物可以制备成本领域已知的常规药物制剂。药物可以具体地制备成用于口服施用的制剂,比如液体、悬浮液、粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊、丸剂或提取物。在制备成每种制剂时,它可以通过添加载体或赋形剂来制备,该载体或赋形剂在制造每种制剂的化妆品中是可接受的和必需的。载体可以是非天然存在的物质或天然存在的物质,但不限于此。在另一个实施方式中,载体可以是不与植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株天然接触的物质,或者是与这两种菌株不同时天然包含的物质,但不限于此。典型地,当将该组合物制备成用于口服施用的制剂时,可以使用选自稀释剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂、甜味剂、稳定剂和防腐剂的至少一种载体,并且可以使用选自调味剂、维生素和抗氧化剂的至少一种添加剂。可以使用任何药学上可接受的赋形剂或添加剂。具体地,能够使用乳糖、玉米淀粉、大豆油、微晶纤维素或甘露醇作为稀

释剂;硬脂酸镁或滑石作为润滑剂;和聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基纤维素作为粘合剂。另外,能够使用羧甲基纤维素钙、羧甲基淀粉钠、波拉克林钾或交聚维酮作为崩解剂;白糖、果糖、山梨糖醇或天冬甜素作为甜味剂;羧甲基纤维素钠、 $\beta$ -环糊精、白蜡或黄原胶作为稳定剂;和对氧苯甲酸甲酯、对氧苯甲酸丙酯或山梨酸钾作为防腐剂。

[0109] 在本公开内容的仍又另一方面中,提供了用于将本公开内容的组合物施用至受试者的步骤。组合物和受试者为如上所述。

[0110] 通过施用,受试者可以展现该组合物的效力,即,免疫增强活性、抗病毒活性等。

[0111] 基于植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的混合物,施用剂量可以是但不限于 $10^6$ CFU/天或更多、 $10^7$ CFU/天或更多、 $10^8$ CFU/天或更多、 $10^9$ CFU/天或更多、 $10^{10}$ CFU/天或更多或 $10^{11}$ CFU/天或更多。

[0112] 在本公开内容的仍又另一方面中,提供了用于增强受试者的免疫力的方法,包括将该组合物施用于有需要的受试者。组合物和受试者为如上所述。

[0113] 如本文所使用,术语“施用”意思是通过任何合适的方法将本公开内容的组合物引入受试者,并且组合物的施用途径可以包括各种途径,比如口服或肠胃外施用,只要它可以到达靶组织。

[0114] 在本公开内容的仍又另一方面中,提供了用于预防或治疗受试者的病毒感染疾病的方法,包括将该组合物施用于有需要的受试者。组合物为如上所述。

[0115] 如本文所使用,术语“预防(prevention或preventing)”意思是旨在通过施用本公开内容的组合物来抑制、阻抑或延迟病毒感染疾病的所有活动。此外,如本文所使用,术语“治疗(treatment或treating)”意思是旨在通过施用本公开内容的组合物来减轻或有益地改变病毒感染疾病的症状的所有活动。

[0116] 实施例

[0117] 在下文中,将通过实施例更详细地描述本公开内容。然而,这些实施例仅出于说明性目的,并且本发明的范围不旨在被这些实施例限制。

[0118] 实施例1:菌株的分离和选择

[0119] 1-1. 植物乳杆菌CJLP475菌株的样品收集和分离

[0120] 将从酱油中分离的植物乳杆菌CJLP475菌株涂在含有1.5%琼脂的固体MRS培养基(Difco,USA)上,并在 $37^{\circ}\text{C}$ 下温育24小时。通过将每个样品中分离出的菌株转移到新鲜培养基中而使它们被纯化地分离,并且在 $-70^{\circ}\text{C}$ 或更低下将如此分离出的菌株储存在补充有20%甘油的营养培养基中。结果,总共收集了1,552个菌株,并通过以下实施例选择具有优异的抗病毒活性的菌株。

[0121] 作为16S rDNA测序分析的结果,植物乳杆菌CJLP475菌株显示与植物乳杆菌标准菌株(NBRC1589,GenBank获取号AB326351)最高的同源性(99.9%),并且因此被鉴定为植物乳杆菌,并命名为“植物乳杆菌CJLP475”,并根据布达佩斯条约于2018年7月11日保藏在国际保藏机构韩国微生物保藏中心,获取号为KCCM12287P。结果,植物乳杆菌CJLP475菌株的16S rDNA核苷酸序列由SEQ ID NO:1表示。

[0122] 同时,发现作为革兰氏染色的结果,植物乳杆菌CJLP475菌株为革兰氏阳性的。此外,为了分析生化特征,通过API 50CHL系统(biomerieux Vitek,Inc.,France)分析了菌株的糖发酵模式(表1)。

[0123] 表1植物乳杆菌CJLP475的糖发酵模式分析

菌株名称	CJLP475	菌株名称	CJLP475
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	+
核糖	+	蜜二糖	+
D-木糖	-	蔗糖	+
L-木糖	-	海藻糖	+
核糖醇	-	菊粉	-
$\beta$ 甲基木糖苷	-	松三糖	+
半乳糖	+	D-棉子糖	+
D-葡萄糖	+	阿米酮(Amidon)	-
D-果糖	+	糖原	-
D-甘露糖	+	木糖醇	-
L-山梨糖	-	$\beta$ -龙胆二糖	+
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-岩藻糖	-
山梨糖醇	+	L-岩藻糖	-
$\alpha$ 甲基-D-甘露糖苷	+	D-阿糖醇	-
$\alpha$ 甲基-D-葡萄糖苷	-	L-阿糖醇	-
N 乙酰基葡萄糖胺	+	葡萄糖酸盐	+
扁桃苷(Amygdaline)	+	2-乙酰(ceto)-葡萄糖酸盐	-
熊果苷	+	5-乙酰-葡萄糖酸盐	-

[0126] +:阳性,-:阴性

[0127] 1-2.植物乳杆菌CJLP243菌株的样品收集和分离

[0128] 获得在韩国专利特开公布号0-2011-0046020(KR 10-2011-0046020 A)中公开的植物乳杆菌CJLP243菌株。在上述专利公开中,通过下述方法获得植物乳杆菌CJLP243菌株。

[0129] 将从朝鲜泡菜分离的植物乳杆菌CJLP243菌株涂在含有1.5%琼脂的固体MRS培养基(Difco,USA)上,并在37℃下温育24小时。使用环收集被证明是纯净的菌落,并在液体MRS培养基(Difco,USA)中在37℃下温育18至24小时,并且将如此温育的菌株保持在-70℃或更低下。

[0130] 作为16S rDNA测序分析的结果,植物乳杆菌CJLP243菌株显示与植物乳杆菌标准菌株(NBRC15891,GenBank获取号AB326351)最高的同源性(99.9%),并且因此鉴定为植物乳杆菌,并命名为“植物乳杆菌CJLP243”,并根据布达佩斯条约于2009年10月14日保藏在国际保藏机构韩国微生物保藏中心,获取号为KCCM11045P。结果,植物乳杆菌KCCM11045P菌株的16S rDNA核苷酸序列由SEQ ID NO:2表示。

[0131] 实施例2:菌株的耐酸性和耐胆汁性的评估

[0132] 为了选择可用作益生菌的菌株,评估了所获得菌株的耐酸性和耐胆汁性活性。

[0133] 制备了人造胃液培养基以评估耐酸性。更具体地,通过将胃蛋白酶添加到液体MRS培养基中以将pH调节至2.5,然后灭菌来制备人造胃液培养基。

[0134] 第二次继代培养后,在37℃下将实施例1的菌株在液体MRS培养基中经历静态培养18小时。将1%的预温育的(pre-incubated)菌株接种到人造胃液培养基中,并在37℃下经历静态培养,并且在0小时和3小时对培养肉汤进行取样。将取样的培养肉汤连续稀释并涂在固体MRS培养基上,并在37℃下温育48小时以测量活细胞数。

[0135] 制备了人造胆汁培养基用于评估耐胆汁性。更具体地,通过将0.5%牛胆汁(公牛胆汁)添加到液体MRS培养基中,随后灭菌来制备人造胆汁培养基。

[0136] 第二次继代培养后,在37℃下将实施例1的菌株在液体MRS培养基中经历静态培养18小时。将1%的预温育的菌株接种到人造胆汁培养基中,并在37℃下经历静态培养,并在0小时和24小时对培养肉汤取样。将取样的培养肉汤连续稀释并涂在固体MRS培养基上,并在37℃下温育48小时以测量活细胞数。

[0137] 通过以上评估,选择了显示优异的耐酸性和耐胆汁性的植物乳杆菌CJLP475和植物乳杆菌CJLP243。为了比较植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的耐酸性和耐胆汁性与常规已知菌株的耐酸性和耐胆汁性,与上述方法相同的方式评估了从韩国微生物保藏中心获得的植物乳杆菌标准菌株(KCCM12116)的耐酸性和耐胆汁性。

[0138] 表2耐酸性评估(单位:CFU/mL)

	0 小时	3 小时
[0139] 植物乳杆菌 CJLP243 (KCCM11045P)	$4.5 \times 10^7$	$4.4 \times 10^7$
植物乳杆菌 CJLP475 (KCCM12287P)	$1.1 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$
植物乳杆菌(KCCM12116)	$2.3 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$

[0140] 表3耐胆汁性评估(单位:CFU/mL)

	0 小时	24 小时
[0141] 植物乳杆菌 CJLP243 (KCCM11045P)	$3.2 \times 10^7$	$7.3 \times 10^8$
植物乳杆菌 CJLP475 (KCCM12287P)	$1.3 \times 10^8$	$1.1 \times 10^7$
植物乳杆菌(KCCM12116)	$2.1 \times 10^7$	$1.6 \times 10^6$

[0142] 根据上述表2和表3,在人造胃液培养基和人造胆汁培养基中的植物乳杆菌标准菌株(KCCM12116)中的细胞数量减少。因此,可以看出并非所有通常已知的植物乳杆菌都具有耐酸性和耐胆汁性。

[0143] 相比之下,在耐酸性评估中,与植物乳杆菌标准菌株(KCCM12116)相比,植物乳杆菌CJLP475菌株中的细胞数量增加,并且植物乳杆菌CJLP243菌株中的细胞数量具有较小的减少,这表明这两种菌株都具有优异的耐酸性。

[0144] 此外,在耐胆汁性评估中,与植物乳杆菌标准菌株(KCCM12116)相比,植物乳杆菌CJLP243菌株中的细胞数量增加,并且植物乳杆菌CJLP475菌株的细胞数量具有较小的减少,这表明这两种菌株都具有优异的耐胆汁性。

[0145] 另外,因为每种菌株均具有优异的耐酸性和耐胆汁性,所以可以暗示包括这两种菌株的组合物具有优异的耐酸性和耐胆汁性。

[0146] 实施例3:菌株安全性的评估

[0147] 3-1. 菌株的溶血活性的确认

[0148]  $\beta$ -溶血是其中红细胞提供的磷脂被由有害细菌产生的磷脂酶水解,这导致红细胞溶血的现象。为了确定植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的溶血活性,使用了血琼脂平板(绵羊血5%琼脂,Hanilkomed,Korea)。将菌株划线接种至制备的血琼脂平板中,并在37°C下温育24小时以确认溶血。

[0149] 结果,如图1中所显示,确认植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株没有显示溶血。这些结果表明这两种菌株在体内不充当有害细菌。

[0150] 3-2. 抗生素敏感性的评估

[0151] 将植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株独立地接种到液体MRS培养基中,并在37°C下经历静态培养,持续24小时。将如此培养的细菌吸入灭菌棉拭子中,并涂在Mueller Hinton II固体培养基(Difco)上,并且然后将抗生素片置于该培养基上,并在37°C下温育24小时。将氨苄西林、克林霉素、庆大霉素、卡那霉素、红霉素、氨苄西林/舒巴坦、氯霉素和链霉素片(Oxoid,UK)用作用于抗生素测试的抗生素片。

[0152] 作为植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的抗生素敏感性测试的结果,这两种菌株对上述抗生素都没有耐药性(表4)。因此,可以发现,即使在药物、保健功能食品、饲料添加剂等中使用植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株,考虑到它们对抗生素没有耐药性,也不太可能出现关于耐药性的问题和环境问题。

[0153] 表4根据抗生素抑制细菌生长

	抗生素	以抗生素为中心的生长抑制区域的半径(mm)
		CJLP475
[0154]	Amp10 (氨苄西林)	7.5
	C30 (克林霉素)	7
	CN120 (庆大霉素)	5
	K30 (卡那霉素)	1.5
	E15 (红霉素)	12
	SAM20 (氨苄西林/ 舒巴坦)	7
	S10 (氯霉素)	3.5
	DA2 (链霉素)	4.5

[0155] 实施例4:细胞毒性的评估

[0156] 为了研究菌株对细胞存活率的影响,使用(3-(4,5-二甲基-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑(promega,USA)进行MTS试验以评估对IPEC-J2细胞(肠道猪上皮细胞)的细胞毒性水平。将每种细胞在96孔细胞培养板上温育,并且然后用该组合物处理,其中植物乳杆菌CJLP475和植物乳杆菌CJLP243在不同的浓度( $10^5$ 到 $10^7$ CFU/mL)下以1:1的比例混合,并进一步温育。在所有下述实施例中植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的混合比例为1:1。为了评估细胞毒性,在24小时之后将MTS溶液添加到细胞培养肉汤中,并将细胞温育2小时,并且用酶标仪通过在490nm处测量吸光度来计算细胞存活率(%)。

[0157] 结果,如图2中所显示,当在三种不同浓度下处理细胞时,确认在 $10^7$ CFU/mL或更低的浓度下几乎观察不到细胞死亡。因此,可以看出,在 $10^7$ CFU/mL或更低的浓度下组合物基本上不显示细胞毒性。

[0158] 实施例5:免疫增强活性的评估

[0159] 为了确认包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物的免疫增强作用,将IPEC-J2细胞在DMEM/F-12培养基(Dulbecco's改良伊格尔培养基:营养混合物F-12)中温育。另外,从21日龄断奶仔猪收集外周血单核细胞(PBMC)。

[0160] 将收集的血液与PBS以1:1的比例混合,并在Ficoll-Paque Plus(GE Healthcare Life Sciences,NJ,USA)上离心,以分离WBC(白细胞)聚集层,并从分离的层获得外周血单核细胞。

[0161] 为了评估免疫增强作用,将包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物与外周血单核细胞以10:1的比例混合,并在37°C下将该混合物在包含5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中温育20小时。在温育完成后,将细胞离心,并使用细胞因子ELISA(酶联免疫吸附试验)评估培养上清液的免疫激活作用。更具体地,针对IL-12(白细胞介素-12)——IL-12激活防御外部入侵因子(病原体)的Th1(T辅助1)相关的免疫机制、调节过度的炎症反应的Th2(T辅助2)相关的IL-10(白细胞介素10)和抑制炎症的TGF-β,进行ELISA(R&D

Systems,USA)。

[0162] 在图3至5中分别显示了图表,该图表显示了IL-12、IL-10和TGF- $\beta$ 的测量结果。在每个图表中,将对照用作没有菌株处理的阴性对照。

[0163] 结果,如图3、4和5中所显示,确认包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物显示通过刺激免疫细胞增加IL-12、IL-10和TGF- $\beta$ 分泌的活性。因此,可以看出,该组合物展现同时增强Th2免疫机制以及Th1免疫机制和抑制炎症的作用。

[0164] 实施例6:针对病毒感染的抑制作用

[0165] 为了测量包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物对病毒感染的抑制作用,制备了猪流行性腹泻病毒(PEDV、SM98或KPEDV9菌株)。具体地,病毒在Vero细胞(CCL-81,从绿猴属提取的肾上皮细胞)中增殖,并且MEM(伊格尔最低必需培养基,Gibco BRL,USA)、热灭活的10%FBS(胎牛血清,v/v)和1%(v/v)青霉素/链霉素作为用于培养Vero细胞的培养基。将Vero细胞作为单层温育,用培养基冲洗两次,并且然后除去所有溶液。将病毒以0.1MOI(感染复数)的水平在包含胰蛋白酶的不含FBS的MEM中混合,用5 $\mu$ g/ml TPCK(N-甲苯磺酰基-L-苯丙氨酸氯甲基酮)处理、用最小体积的制备的培养细胞处理,并且然后在37 $^{\circ}$ C的含有5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中温育2至3天。

[0166] 通过形成病毒合胞体来确定病毒感染。当形成病毒合胞体时,在3至6小时内收集病毒培养肉汤,并使用离心机除去细胞并储存在-80 $^{\circ}$ C下。为了计算病毒的感染滴度,将Vero细胞以2 $\times$ 10<sup>4</sup>个细胞/0.1ml的密度在96孔板中温育,并用PBS冲洗细胞。随后,向细胞添加培养肉汤,其中使病毒经历2倍连续稀释,并温育24至48小时以确认病毒感染,并通过Reed&Muench方法计算病毒滴度。

[0167] 为了测量包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物对病毒感染的抑制作用,使该组合物与外周血单核细胞(PBMC)反应20至24小时以获得培养肉汤。将培养肉汤在其中温育IPEC-J2的96孔细胞培养板上处理,并在37 $^{\circ}$ C的含有5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中温育2至4小时。将剂量为100TCID<sub>50</sub>/mL(组织细胞感染剂量的50%)的PED病毒(SM98或KPEDV9)等分到平板上,并温育48小时。为了确认病毒感染,在培养完成后,用甲醇固定细胞培养板,用结晶紫染色,然后用显微镜检查其中细胞变性的孔,从而确认病毒感染。以与上述相同的方式评估植物乳杆菌CJLP243菌株和植物乳杆菌CJLP475菌株中的每一种对病毒感染的抑制作用。

[0168] 结果,如图6中显示,确认当该组合物包括植物乳杆菌CJLP243菌株、植物乳杆菌CJLP475菌株,并且植物乳杆菌CJLP243菌株和植物乳杆菌CJLP475菌株被猪免疫细胞处理时,在所有实验组中免疫细胞被菌株激活,并且病毒感染被抑制。

[0169] 实施例7:当用该组合物饲喂时,根据断奶仔猪的免疫增强来确认抗病毒作用

[0170] 为了确认包括植物乳杆菌CJLP243菌株和植物乳杆菌CJLP475菌株的组合物对进食后免疫力的影响,进行了以下实验:

[0171] 购买了32只21日龄的断奶仔猪,并在一个集装箱农场饲养了3周。饲料以不含抗生素的普通粉碎饲料的形式提供。包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物以冻干粉的形式产生,并储存在冰箱中,并且以每天10<sup>10</sup>CFU的量给每个仔猪饲料。在口服施用3周后,对每个治疗组的4只仔猪进行尸检以收集血液和组织样品,以便确定组合物对仔猪免疫力的影响。

[0172] 为了从脾 (Spln) 和肠系膜淋巴结 (mLN) 获得免疫细胞,使用注射器的活塞和70微米的细胞过滤器 (BD Falcon) 将切碎的组织粉末化,并且然后使用RPMI-1640培养基 (Roswell Park Memorial Institute-1640,Gibco BRL,Grand Island,NY,USA) 冲洗细胞。在最后的冲洗步骤之前,使用RBC (红细胞) 裂解缓冲液 (eBioscience,USA) 去除剩余的RBC。在最后的冲洗步骤之后收集的免疫细胞用台盼蓝染色,并使用血细胞计数器计数。

[0173] 为了评估对病毒感染的抑制作用,与上述实施例6相同的方式温育PED病毒,并测量其含量。将从未饲喂该组合物的断奶仔猪获得的免疫细胞用作阴性对照。

[0174] 表5根据组合物通过激活的免疫细胞针对PED病毒感染 (SM98/KPEDV9菌株) 的抑制作用

[0175]	mLN		Spln	
	SM98	KPEDV9	SM98	KPEDV9
阴性对照	-	-	-	-
[0176]				
CJLP475	++	++	++	++
CJLP243	+	++	++	++
CJLP475 和 CJLP243	++	++	++	++

[0177] ++:完全的抑制,+ :部分抑制,- :感染的

[0178] 结果,如表5中所显示,通过在断奶仔猪中培养脾 (Spln) 或肠系膜淋巴结 (mLN) 的免疫细胞获得的所有培养上清液提供了含有植物乳杆菌CJLP475菌株、植物乳杆菌CJLP243菌株的饲料,并且包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物对PED病毒具有抗性。具体地,确认通过在断奶仔猪中培养脾 (Spln) 或肠系膜淋巴结 (mLN) 的免疫细胞获得的培养上清液提供了仅含CJLP475菌株的饲料,并且包括这两种菌株的组合物对SM98和KPEDV9的两种PED病毒具有优异的免疫防御功能。因此,确认当用CJLP475菌株或包括这两种菌株的组合物饲喂仔猪时,CJLP475菌株和该组合物可以允许仔猪处于暂时的 (tentative) 免疫激活状态,该状态可以保护它们免受PED病毒的危害。在表5中,在三个实验组 (CJLP475、CJLP243、CJLP475和CJLP243) 的每一个中的菌株总数是相同的。

[0179] 实施例8:确认对断奶仔猪的生长和腹泻的作用

[0180] 为了确认当用包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物饲喂时,该组合物对断奶仔猪的生长性能和腹泻发生率的影响,与实施例7中描述的方式进行实验。

[0181] 在图7和图8中分别显示了该组合物对断奶仔猪的生产力和腹泻/苍白大便发生率的影响。

[0182] 结果,确认与对照相比,用含有该组合物的饲料饲喂的断奶仔猪的ADG的平均值比较高 (图7)。另外,确认与对照组相比,在用含有该组合物的饲料饲喂的断奶仔猪组中观察到改善腹泻发生率的效果 (图8)。

[0183] 因此,发现与对照组和饲喂每种菌株的实验组相比,用包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株二者的组合物饲喂的实验组不仅显示出家畜生长即生产力的显著增加,而且还展现出显著降低腹泻发生率的作用。

[0184] 实施例9:确认对母猪的免疫力和初乳的作用

[0185] 为了确认当将包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物给予母猪时,该组合物对母猪的免疫力和初乳的影响,进行了如下实验:从没有发生PED病毒的农场中为每个实验组随机选择在相同分娩期的分娩前6周的15头母猪。实验中使用的所有母猪均在分娩前5周和2周接种PED病毒疫苗。在总共四个实验组中进行该实验,即,不饲喂菌株的对照组,仅饲喂CJLP475的组,仅饲喂CJLP243的组和饲喂包括CJLP475菌株和CJLP243菌株的组合物的组。饲料以不含抗生素的普通饲料形式提供,并且提供水以自由地饮用。植物乳杆菌CJLP475菌株、植物乳杆菌CJLP243菌株和组合物以冻干粉的形式产生并储存在冰箱中,并且然后在提供给母猪时添加到饲料上面,从而根据治疗条件每天给予每头母猪的饲料量为 $10^{10}$ 至 $10^{11}$ CFU。将母猪饲喂总共4周,并且然后使用IgA和IgG ELISA试剂盒来检查母猪的血清和初乳。在图9、10和11中显示了菌株对母猪的免疫力和初乳的影响。

[0186] 结果,如图9和10中显示,用含有CJLP475菌株、CJLP243菌株和组合物的饲料饲喂的母猪血清中的总IgG和IgA含量高于没有饲喂该菌株的对照组中的总IgG和IgA含量。具体地,用该组合物饲喂的母猪血清中的总IgG和IgA含量显著高于对照组中的母猪或用单一菌株饲喂的母猪。

[0187] 如图11中显示,观察根据饲喂的组合物在分娩期间初乳中的总IgA抗体滴度的变化,并且结果,与对照组相比,仅饲喂CJLP475的实验组和饲喂组合物的实验组中的总IgA抗体滴度更高。具体地,与用单一菌株饲喂的组相比,用该组合物饲喂的实验组中的抗体滴度得到了更大的改善。

[0188] 因此,与对照组或用单一菌株中的每一种饲喂的组相比,当将包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株二者的组合物饲喂给母猪时,母猪的免疫力显著提高,并且初乳中的抗体滴度也显著增加。

[0189] 实施例10:根据母猪中组合物的饲喂提高仔猪免疫力的作用

[0190] 为了确认包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物对从用该组合物饲喂的母猪所生仔猪的免疫力的影响,使用母猪如实施例9进行了实验。此外,在给予初乳后4天从母猪所生仔猪中收集血液,以使用IgA ELISA试剂盒进行免疫学分析。图12显示了组合物饲喂对从母猪所生仔猪的免疫力的影响,总共4周。

[0191] 结果,发现与对照组相比,在用CJLP475和组合物饲喂的组中仔猪血清中的总IgA含量更高。具体地,发现从用该组合物饲喂的母猪所生仔猪中的总IgA含量非常高。这些结果表明,仔猪从母猪的初乳中得到了高IgA抗体滴度,并且因此可以发现通过用组合物饲喂母猪可以提高仔猪的免疫力。

[0192] 因此,可以看出,与对照组或用单一菌株中的每一种饲喂母猪相比,当将包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株二者的组合物给予母猪时,仔猪的免疫力可以显著提高。

[0193] 实施例11:根据母猪中组合物的饲喂改善仔猪的临床症状的影响

[0194] 为了确认当包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物饲喂的母猪所生仔猪感染PED病毒时,组合物饲喂对改善临床症状的影响,进行了如下实验。因为该实验需要用PED病毒对仔猪进行攻击试验,因此根据动物保护和使用委员会的建议,将实验组最小化,以这样的方式,不对包含单一菌株的实验组进行测试,而仅对包含该组合

物的组进行测试。

[0195] 从没有发生PED病毒的农场中,为每个实验组随机选择在相同分娩期分娩前6周的15头母猪。实验中使用的所有母猪均在分娩前3周和8周接种PED病毒疫苗。在总共两个实验组中进行实验,即,不饲喂该组合物的对照组和饲喂该组合物的组。饲料以不含抗生素的普通饲料形式提供,并且提供水以自由地饮用。该组合物以冻干粉的形式产生并储存在冰箱中,并且然后当提供给母猪时被添加到饲料上面,使得每头母猪被提供的饲料的量为每天 $10^{10}$ 或更多。

[0196] 每个实验组选择具有平均重量1.49kg的从该母猪所生的二十头仔猪。对于每个实验组,将4只3日龄的仔猪放置在温度和湿度可调的猪培养箱中。仔猪被驯养,同时提供代乳品,一天三次。通过检查所有仔猪在4日龄时的粪便来确认仔猪已经稳定后,以 $100LD_{50}/ml$ 口服接种PEDV,并检查体温、腹泻评分、存活率和PEDV的粪便检测,持续7天。然后对仔猪进行尸检,并收集消化器官以检查PED病毒的含量。在图13至16中显示了PEDV攻击后组合物饲喂对仔猪的影响。

[0197] 作为检查在PEDV攻击后仔猪的体温变化的结果,确认与对照组相比,实验组中的体温保持在正常范围内(图13)。

[0198] 作为确认由PEDV引起的仔猪的腹泻评分(临床显著性评分)的结果,在5、6和7dpi下用该组合物饲喂的实验组中的腹泻评分显著低于对照组的腹泻评分(图14)。

[0199] 直到PEDV攻击4日龄仔猪之后7天观察存活率。结果,当感染PEDV时,对照组的存活率为55%,并且用该组合物饲喂的母猪所生仔猪的存活率为65%,从而显示出与对照组相比更优异的抗病毒作用(图15)。

[0200] 表6显示了PEDV攻击后从仔猪粪便中释放的病毒量的实时PCR结果。与对照相比,在PEDV攻击后第3、5和7天,用该组合物饲喂的母猪所生仔猪的粪便中释放的病毒量减少。

[0201] 表6从用该组合物饲喂的母猪所生仔猪的粪便中释放的PEDV量( $\log_{10}/ml$ )

[0202]	0dpi	3dpi	5dpi	7dpi
对照	0	$1.913 \pm 1.601$	$4.920 \pm 0.514$	$3.183 \pm 1.726$
组合物的饲喂	0	$1.576 \pm 1.792$	$4.551 \pm 1.016$	$2.444 \pm 1.381$

[0203] dpi:接种后天数

[0204] 对PEDV攻击后存活7天的仔猪的消化器官进行尸检,以通过实时PCR检查每个器官中的PEDV含量。结果,在用该组合物饲喂的母猪所生仔猪的消化器官,比如十二指肠、空肠、回肠、盲肠和结肠中检测到少量的PEDV(图16)。

[0205] 如上述实验结果所显示,与对照组相比,从用该组合物饲喂的母猪所生仔猪的腹泻评分降低,这导致体温损失减少,最终导致在第7天的死亡率降低。此外,因为发现从用该组合物饲喂的母猪所生仔猪的粪便和组织中的PEDV含量小于对照中的PEDV含量,因此证明该组合物具有抗病毒作用。

[0206] 实施例12:根据母猪中组合物的饲喂来改善母猪和仔猪中和抗体滴度的作用

[0207] 为了证明当从用包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物饲喂的母猪所生仔猪感染PEDV时,如实施例11中临床症状改善的原因,在母猪和仔猪中检查了PEDV中和抗体滴度。

[0208] PEDV中和抗体滴度的测试基于以下原理:存在于血清或初乳中的PEDV特异性抗体

与PEDV的外部表位结合并去除病毒的感染性。因此,该测试基本上允许评估防御PEDV的能力。具体地,在96孔板中,使用MEM(伊格尔最低必需培养基,Gibco BRL,Grand Island,NY,USA)将由实施例11收集的血清或初乳从原始溶液以50 $\mu$ L/孔进行2倍稀释至2048倍,并且然后与PEDV以1:1的比例以200TCID/ml的剂量混合。之后,将细胞在37 $^{\circ}$ C下在CO<sub>2</sub>培养箱中中和1小时,添加100 $\mu$ L的2 $\times$ 10<sup>4</sup>个细胞/0.1mL预先制备为单细胞的Vero细胞,并在37 $^{\circ}$ C下在CO<sub>2</sub>培养箱中温育3到5天以观察细胞致病作用(CPE)。中和抗体滴度是未发现CPE的最大稀释因子。在图17和18中显示了实验结果。

[0209] 在将组合物饲喂给母猪后,发现与对照组相比,用该组合物饲喂的组中的PEDV中和抗体滴度较高,如图17中所显示。具体地,在饲喂该组合物之后母猪中和抗体滴度——在饲喂组合物之前,其与对照组相比较低——显著增加。类似地,发现与对照组相比,在用该组合物饲喂的母猪中,母猪初乳中的PEDV中和抗体滴度较高,如图18中所显示。另外,还发现在从用该组合物饲喂的母猪所生仔猪中,仔猪血清中的PEDV中和抗体滴度较高,如图17中所显示。

[0210] 如上所述,给予用组合物饲喂的母猪初乳的仔猪具有高的PEDV中和抗体滴度,并且基于这些发现,能够解释在实施例11的PEDV攻击测试中与对照组相比,改善临床症状的作用。

[0211] 虽然已经参考具体的说明性实施方式描述了本公开内容,但是本公开内容所属领域的技术人员将理解,在不脱离技术精神或本质特征的情况下,可以以其他特定形式来体现本公开内容。因此,上述实施方式在所有方面都被认为是说明性的而不是限制性的。此外,本公开内容的范围由所附权利要求书限定而不是由具体实施方式来限定,并且应当理解,从本公开内容的含义和范围及其等同物得出的所有修改或变化都包括在所附权利要求的范围内。

国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约  
国际表格

### 原始保藏接收证明

由该页下部确定的国际保藏机构根据第 7.1 条发出

至：CJ 第一制糖株式会社

CJ 第一制糖中心

330, DONGHO-RO, JUNG-GU, 首尔 100-400

大韩民国

[0212]

I. 微生物鉴定	
由保藏人提供的标识参考： 植物乳杆菌 CJLP475	由国际保藏机构提供的登录号： KCCCM12287P
II. 科学描述和/或建议的分类学名称	
如上 I 标识的微生物带有： <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用，用叉号标记)	
III. 收到和接收	
该国际保藏机构接收如上 I 标识的微生物，其于 2018 年 7 月 11 日收到 (原始保藏日) <sup>1</sup> 。	
V. 国际保藏机构	
名称：韩国微生物保藏中心 地址：Yurim B/D 45, Hongjena-e-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 03641 大韩民国	具有代表该国际保藏机构的权利的自然人或授权官员签名 (盖章)：  日期：2018 年 7 月 11 日

证明上述翻译与原文内容没有相互违背

2018 年 7 月 18 日

专利代理人 Son Min 印

国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约  
国际表格

### 原始保藏接收证明

由该页下部确定的国际保藏机构根据第 7.1 条发出

至：CJ 第一制糖株式会社

500 5-GA, NAMDAEMUN-RO, CHUNG-KU, 首尔  
大韩民国

[0213]

I. 微生物鉴定	
由保藏人提供的标识参考： 植物乳杆菌 CJLP243	由国际保藏机构提供的登录号： KCCCM11045P
II. 科学描述和/或建议的分类学名称	
如上 I 标识的微生物带有： <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用，用叉号标记)	
III. 收到和接收	
该国际保藏机构接收如上 I 标识的微生物，其于 2009 年 10 月 14 日收到（原始保藏日） <sup>1</sup> 。	
V. 国际保藏机构	
名称：韩国微生物保藏中心 地址：361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun-gu 首尔 120-091 大韩民国	具有代表该国际保藏机构的权利的自然人或授权官员签名（盖章）：  日期：2009 年 10 月 14 日

证明上述翻译与原文内容没有相互违背

2018 年 7 月 18 日

专利代理人 Son Min 印

- [0001] <110> CJ第一制糖株式会社
- [0002] <120> 包括植物乳杆菌CJLP475菌株和植物乳杆菌CJLP243菌株的组合物及其用途
- [0003] <130> OPA19038
- [0004] <150> KR 10-2018-0081910
- [0005] <151> 2018-07-13
- [0006] <160> 2
- [0007] <170> KoPatentIn 3.0
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 1454
- [0010] <212> DNA
- [0011] <213> 未知的
- [0012] <220>
- [0013] <223> 植物乳杆菌CJLP475
- [0014] <400> 1
- [0015] acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60
- [0016] ggtgagtaac acgtgggaaa cctgccaga agcgggggat aacacctgga aacagatget 120
- [0017] aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagtttga aagatggctt cggctatcac 180
- [0018] ttttgatgg tcccgcggcg tattagctag atggtgggt aacggctcac catggcaatg 240
- [0019] atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300
- [0020] ctacgggagg cagcagtagg gaatctcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
- [0021] gcgtgagtga agaagggtt cggctcgtaa aactctgtt ttaaagaaga acatatctga 420
- [0022] gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480
- [0023] cagcccggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggct aaagcgagcg 540
- [0024] caggcggtt ttaagctg atgtgaaagc cttcggctca accgaagaag tgcacgga 600
- [0025] actgggaaac ttgagtgcag aagaggacag tggaaactca tgtgtagcgg tgaatgcgt 660
- [0026] agatatatgg aagaacacca gtggcgaag cggctgtctg gtctgtaact gacgctgagg 720
- [0027] ctcgaaagta tggtagcaa acaggattag ataccctggt agtccatacc gtaaacgatg 780
- [0028] aatgctaagt gttggagggt ttccgccctt cagtgtctca gctaacgcat taagcattcc 840
- [0029] gcctggggag tacggccga aggctgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc 900
- [0030] ggtggagcat gtggtttaat tcgaagctac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatact 960
- [0031] atgcaaatct aagagattag acgttccctt cggggacatg gatacaggtg gtgcatggtt 1020
- [0032] gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca acccttatta 1080
- [0033] tcagttgcca gcattaagtt gggcactctg gtgagactgc cggtgacaaa ccgaggaag 1140
- [0034] gtgggatga cgtcaaatca tcatgccct tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg 1200
- [0035] gatgtacaa cgagttgcga actcgcgaga gtaagctaat ctcttaaagc cattctcagt 1260
- [0036] tcgattgta ggctgcaact cgcctacatg aagtccgaat cgctagtaat cgcggatcag 1320
- [0037] catgcccggt gaatacgtt cccgggctt gtacacaccg cccgtcacac catgagagtt 1380
- [0038] tgtaacaccc aaagtcggtg gggtaacctt ttaggaacca gccgcctaag gtgggacaga 1440
- [0039] tgattagggt gaag 1454
- [0040] <210> 2
- [0041] <211> 1461

[0042]	<212> DNA	
[0043]	<213> 未知的	
[0044]	<220>	
[0045]	<223> 植物乳杆菌CJLP243	
[0046]	<400> 2	
[0047]	agtcgaacga actctggtat tgattggtgc ttgcatcatg atttacattt gaggtagtgg	60
[0048]	cgaactggtg agtaacacgt gggaaacctg cccagaagcg ggggataaca cctggaaaca	120
[0049]	gatgctaata ccgcataaca acttggaccg catggtccga gcttgaaaga tggcttcggc	180
[0050]	tatcactttt ggatggtccc gcggcgtatt agctagatgg tggggtaacg gctcaccatg	240
[0051]	gcaatgatac gtagccgacc tgagagggtg atcggccaca ttgggactga gacacggccc	300
[0052]	aaactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccacaat ggacgaaagt ctgatggagc	360
[0053]	aacgccgctg gaggtaagaa gggtttcggc tcgtaaaact ctgttggtta agaagaacat	420
[0054]	atctgagagt aactgttcag gtattgacgg tatttaacca gaaagccacg gctaactacg	480
[0055]	tgccaacagc cgcggttaata cgtaggtggc aagcgttctc cggatttatt gggcgtaaag	540
[0056]	cgagcgcagg cggtttttta aatctgatgt gaaagccttc ggctcaaccg aagaagtgca	600
[0057]	tcgaaactg gaaacttga gtgcagaaaa agacaatgga actccatgtg tagcgggtgaa	660
[0058]	aatgcgtaat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc tgtctggtct gtaactgacg	720
[0059]	ctgagctcag aaagtatggg tagcaaacag gattagatac cctggtagtc cataccgtaa	780
[0060]	acgatgaatg ctaagtgttg gagggttcc gcccttcagt gctgcagcta acgcattaag	840
[0061]	cattccgcct ggggagtacg gccgcaaggc tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc	900
[0062]	acaagcgtg gagcatgtgg ttttaattcga agctacgcga agaaccttac caggtcttga	960
[0063]	catactatgc aatctaaga gattagacgt tcccttcggg gacatggata caggtggtgc	1020
[0064]	atggtgtctg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgaacg agcgaacc	1080
[0065]	ttattatcag ttgccagcat taagttggc actctggtga gactgccggt gacaaaccgg	1140
[0066]	aggaaggtgg ggatgacgtc aatcatcat gcccttatg acctgggcta cacacgtgct	1200
[0067]	acaatggatg gtacaacgag ttgcgaactc gcgagagtaa gctaattctt taaagccatt	1260
[0068]	ctcagttcgg attgtaggct gcaactgcc tacatgaagt cggaatcgtc agtaatcgcg	1320
[0069]	gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag acaccgccg tcacaccatg	1380
[0070]	agagtttgta acacccaaag tcggtggggg aaccttttag gaaccagccg cctaaggtgg	1440
[0071]	gacagatgat taggtgaag t	1461



图1

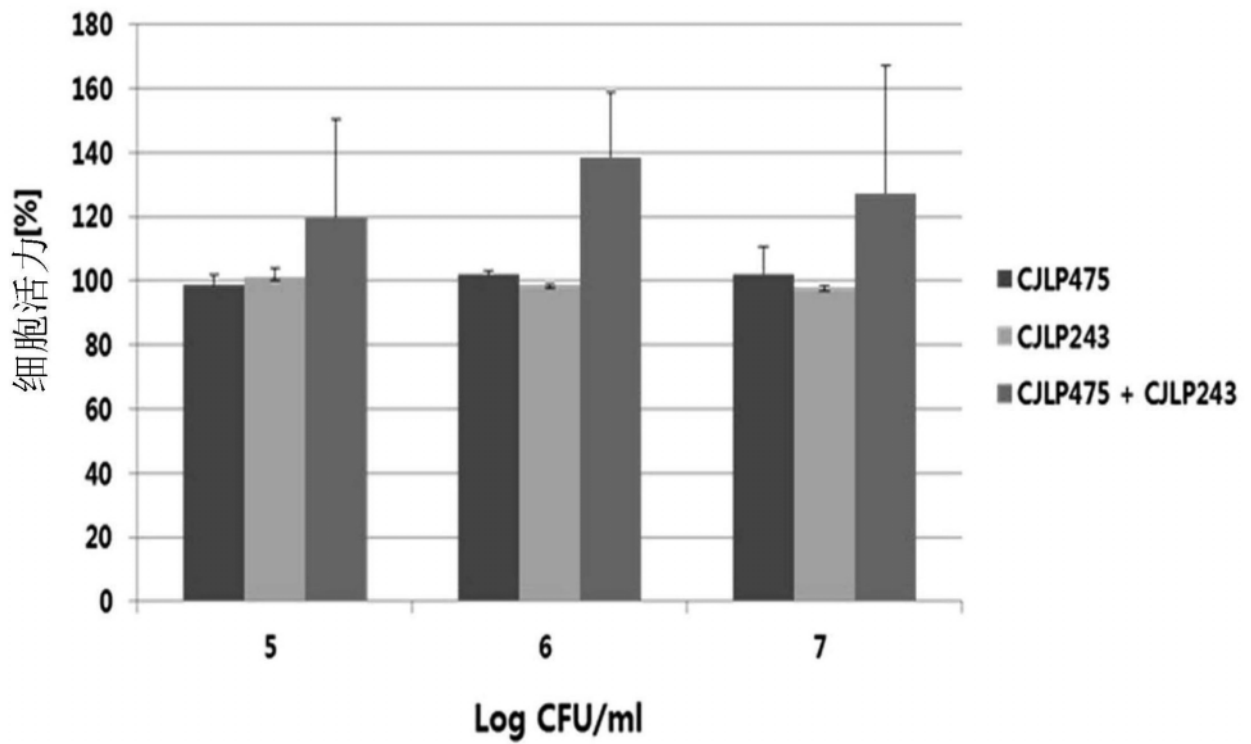


图2

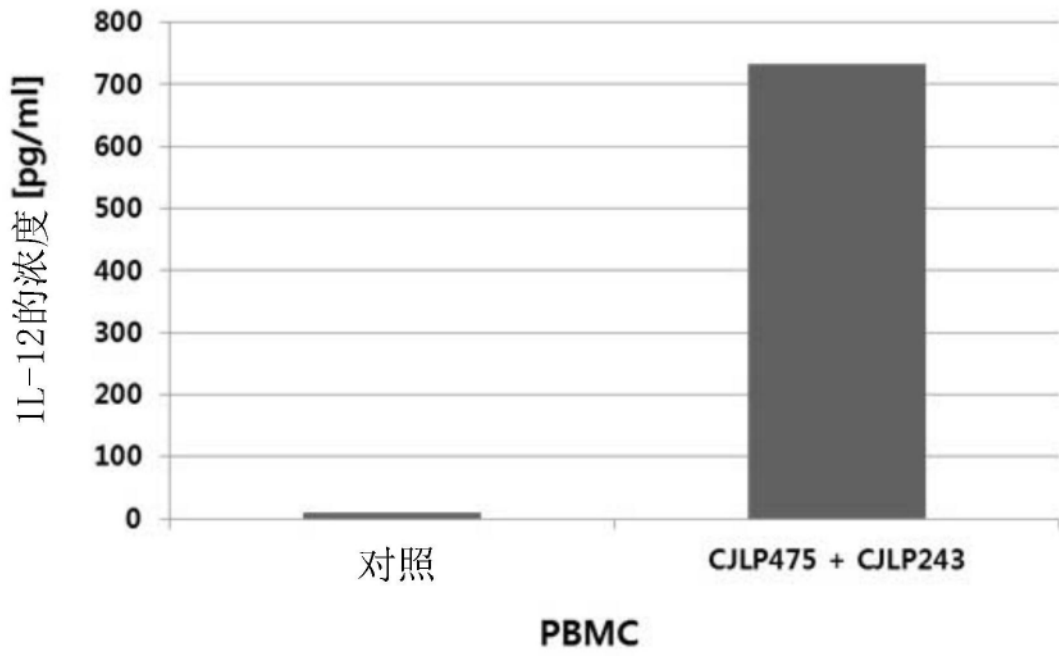


图3

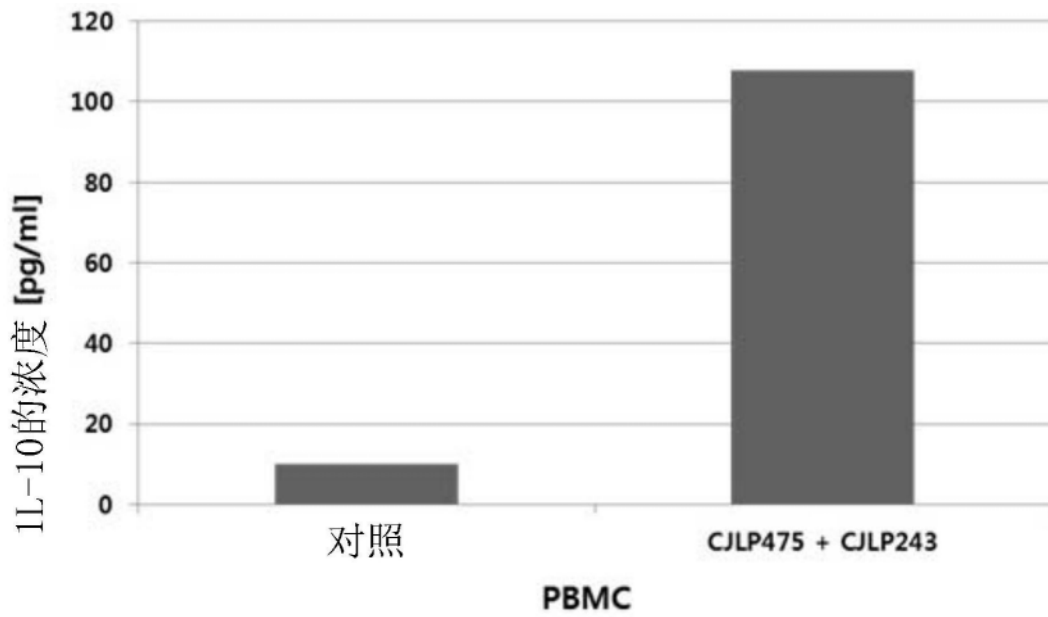


图4

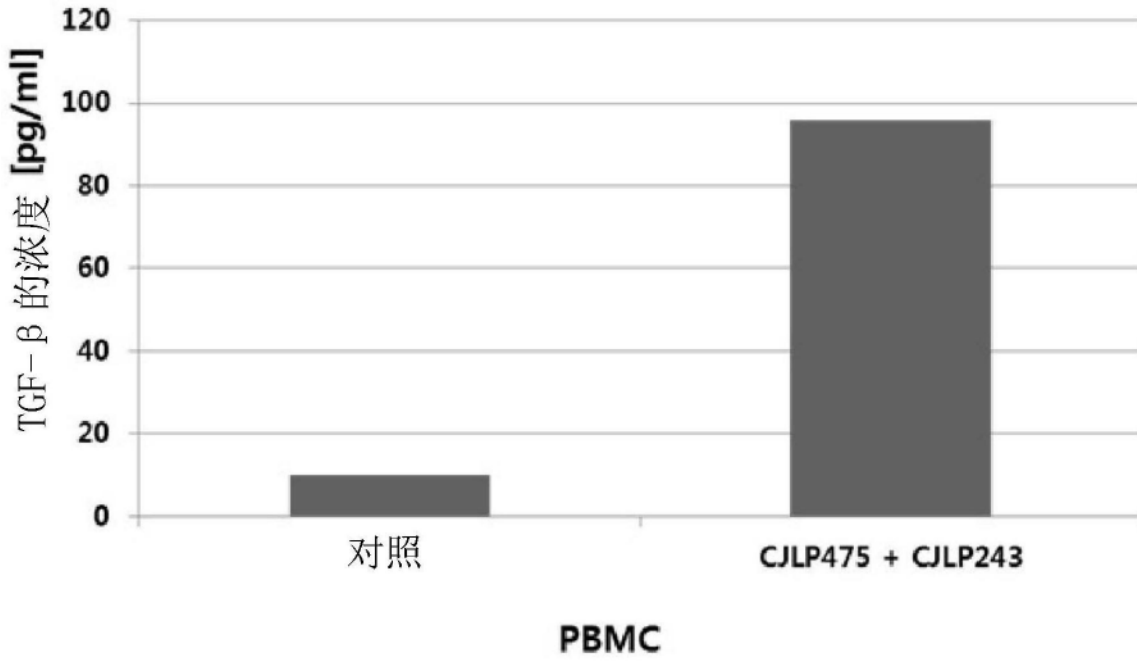


图5

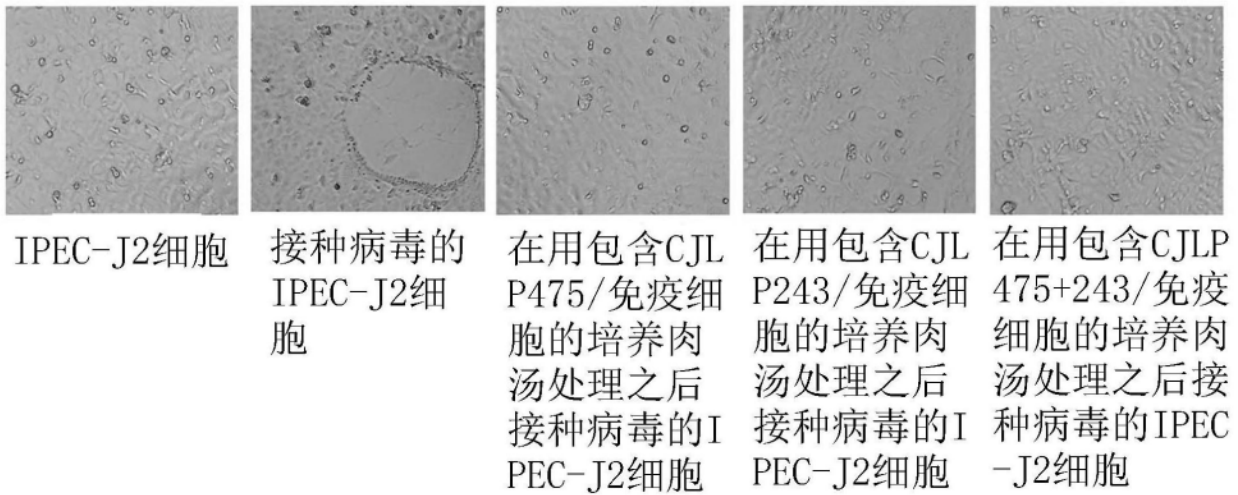


图6

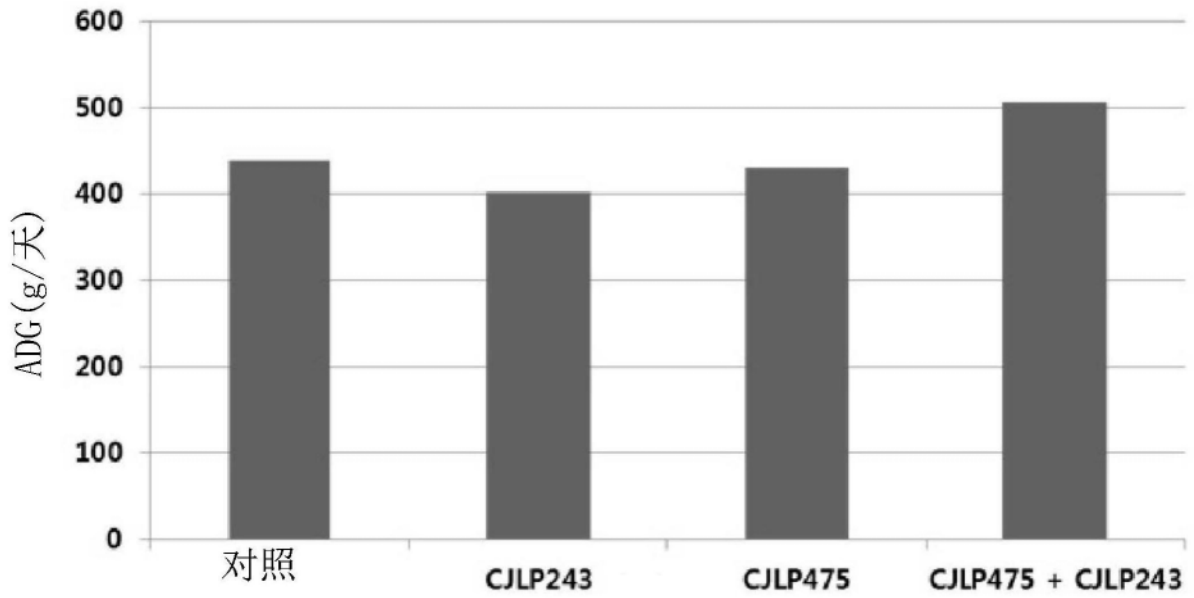


图7

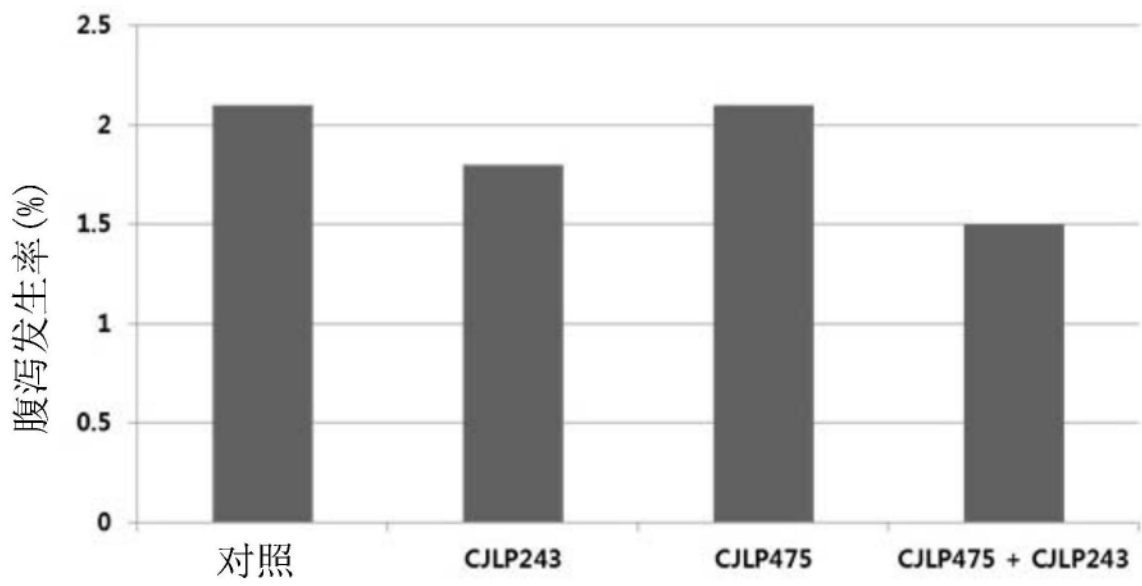


图8

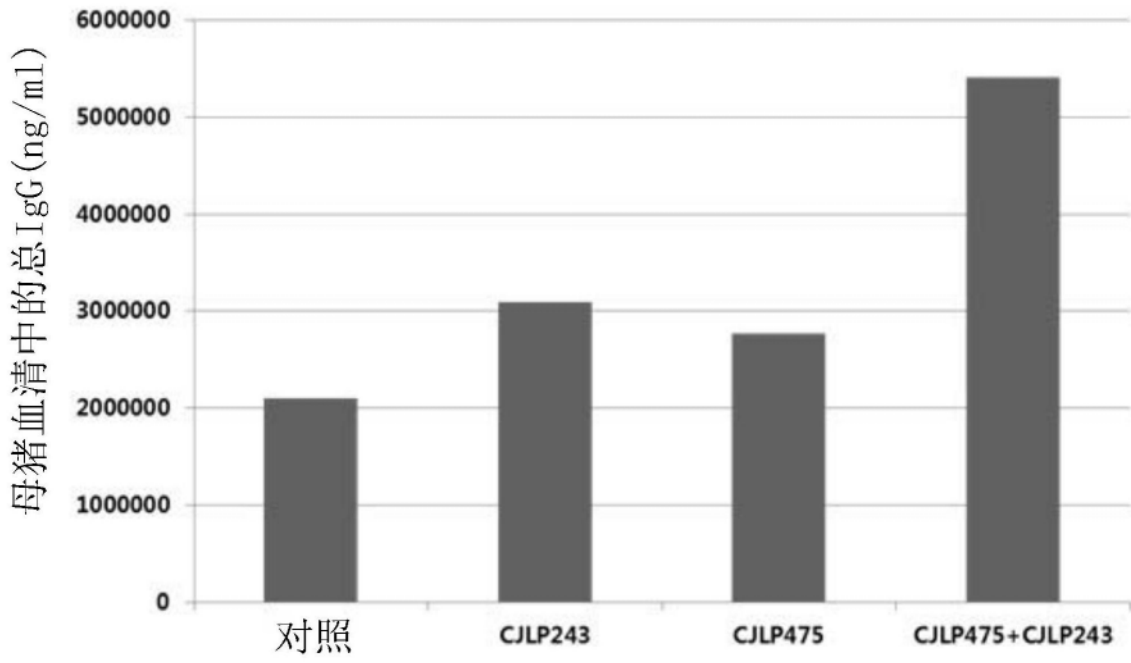


图9

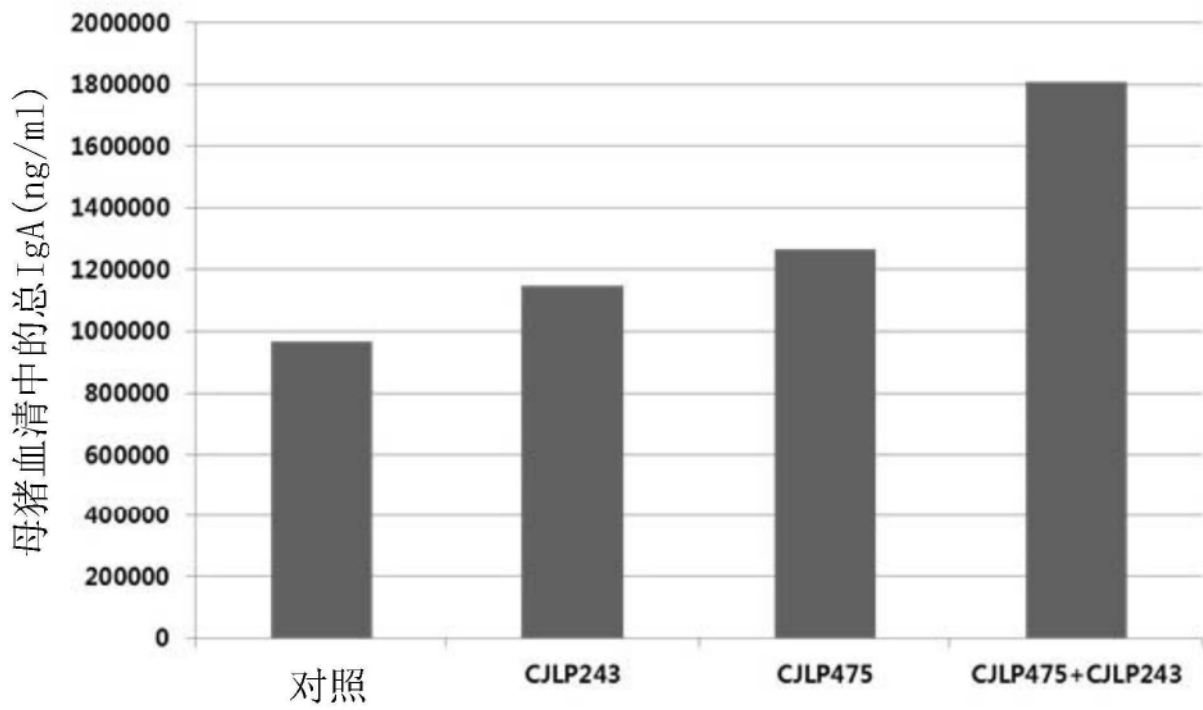


图10

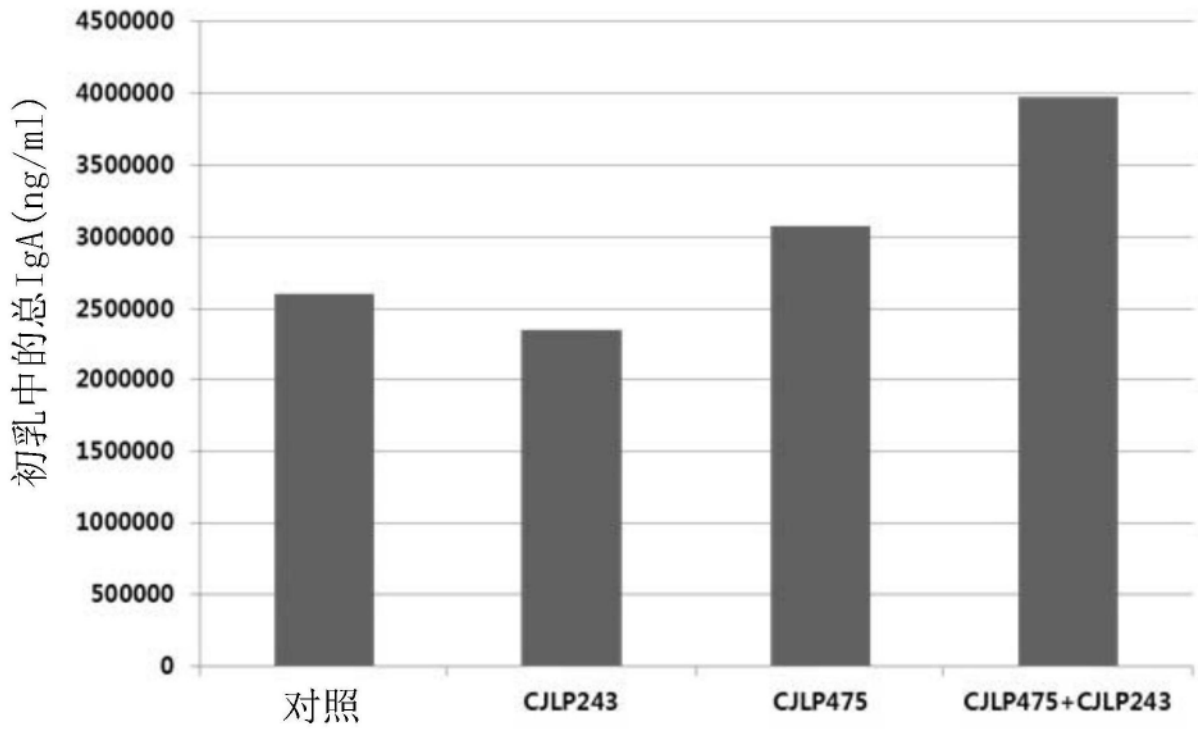


图11

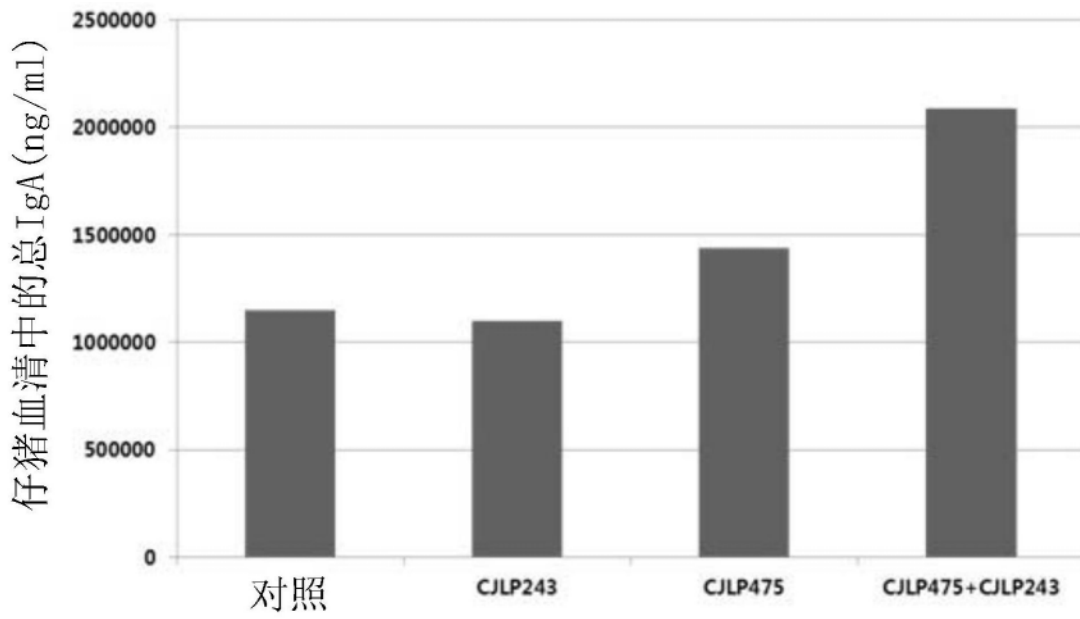


图12

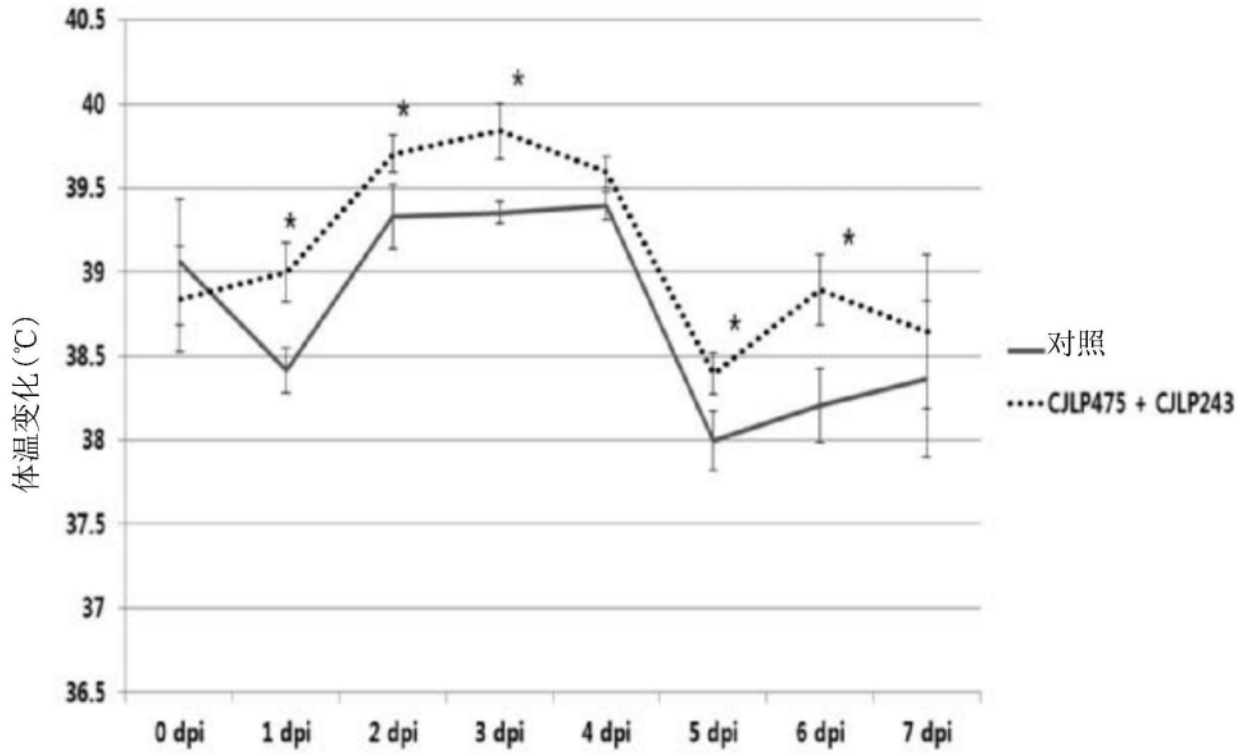


图13

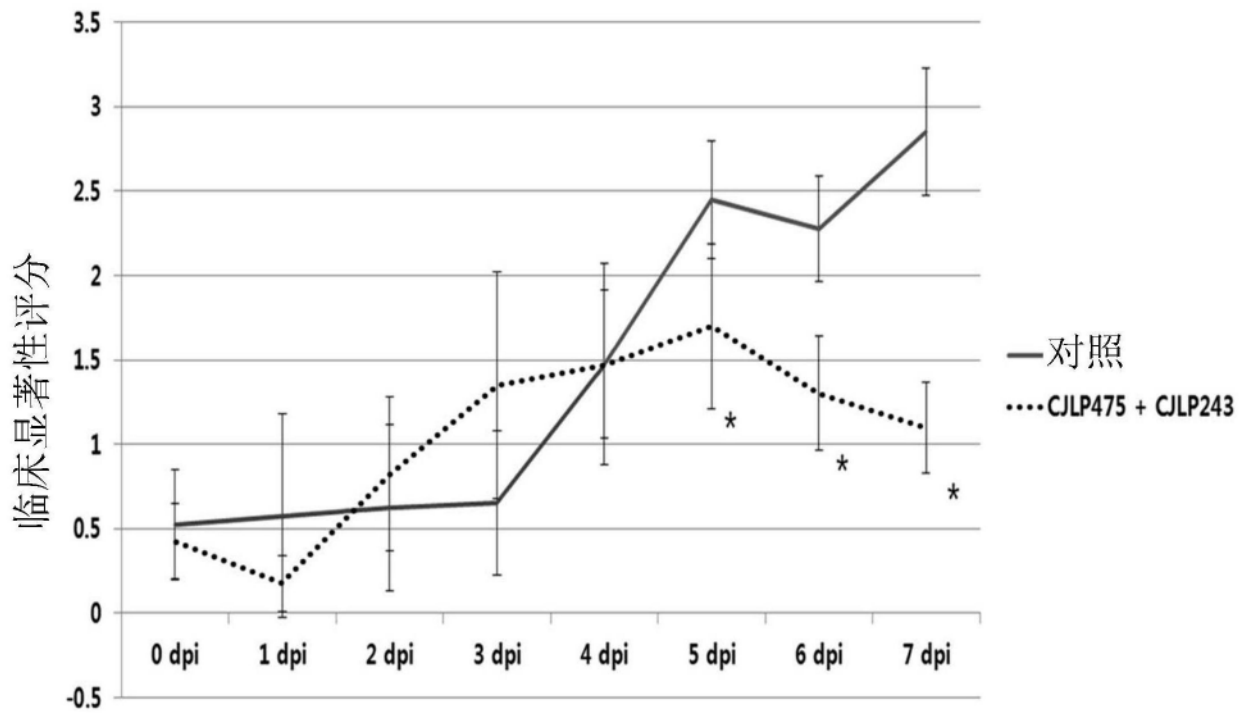


图14

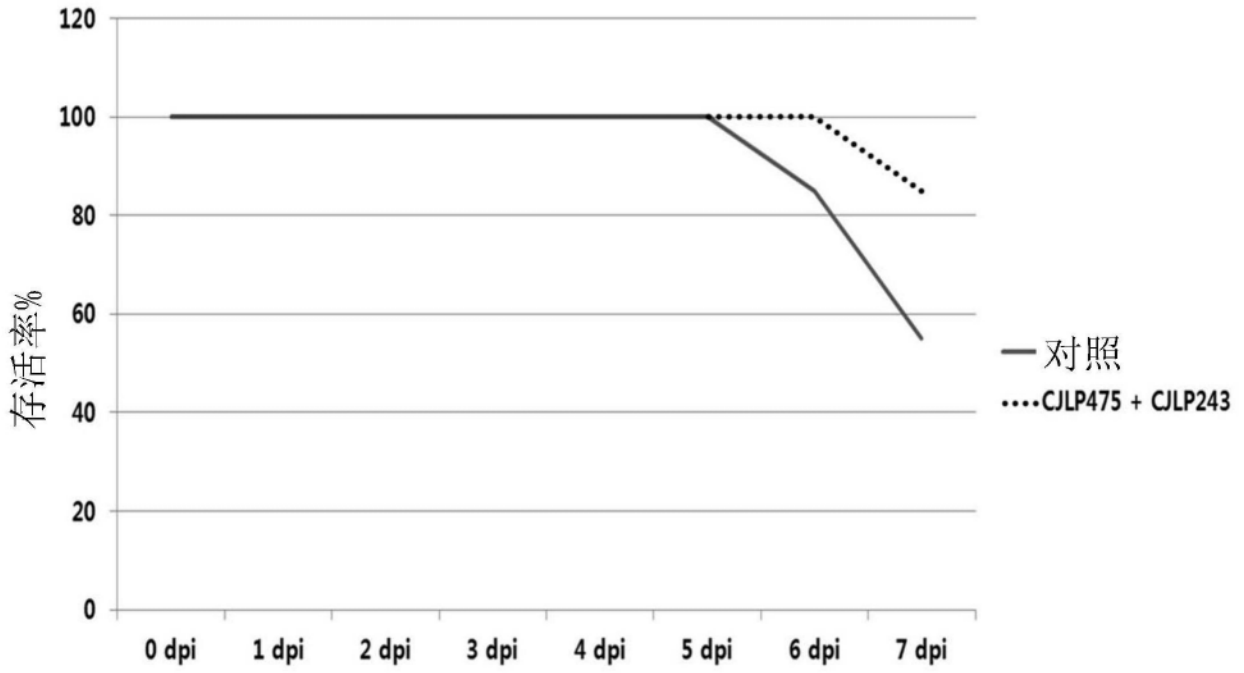


图15

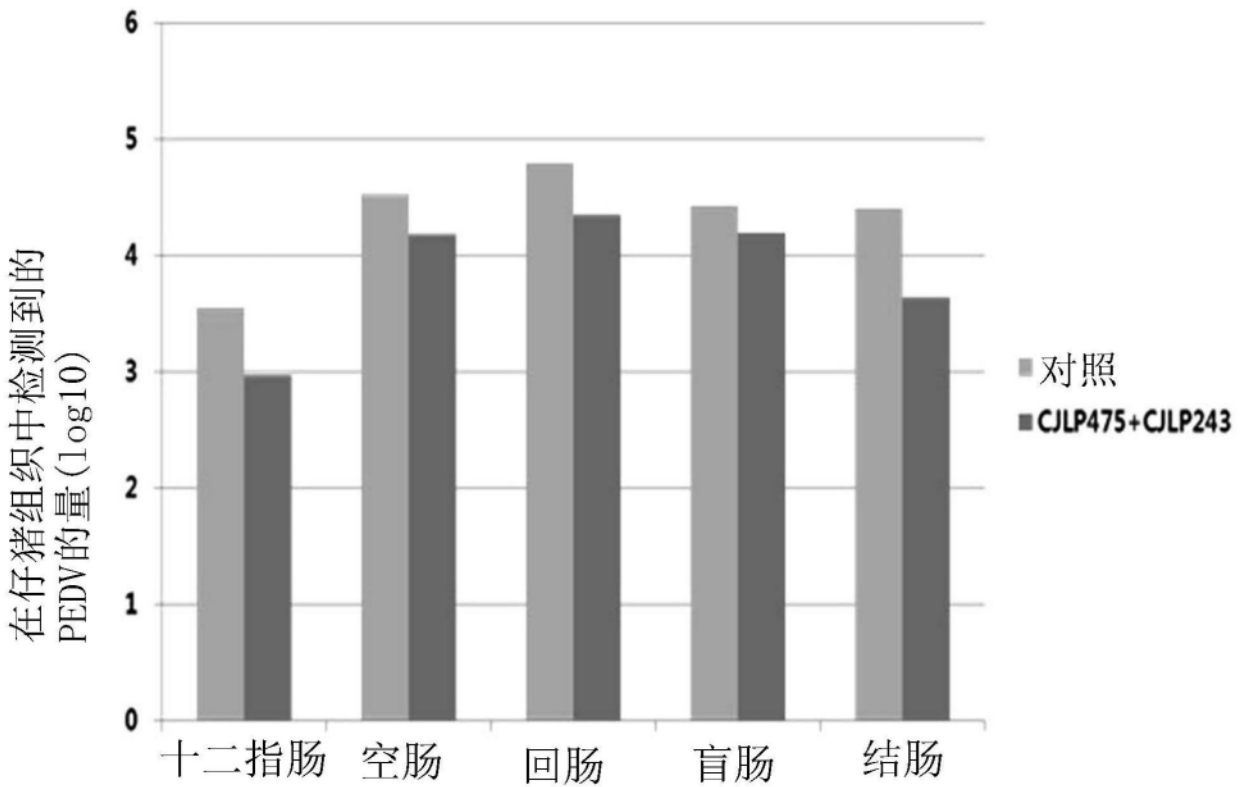


图16

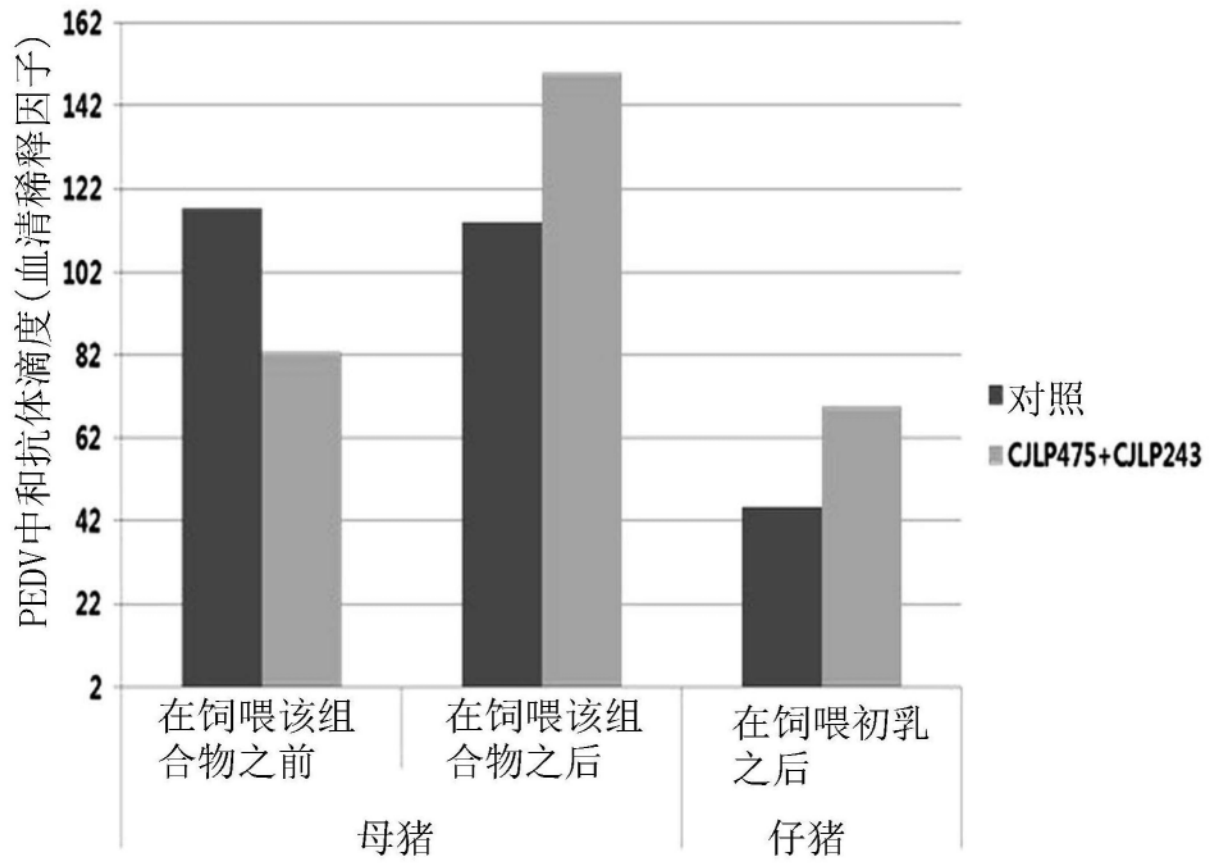


图17

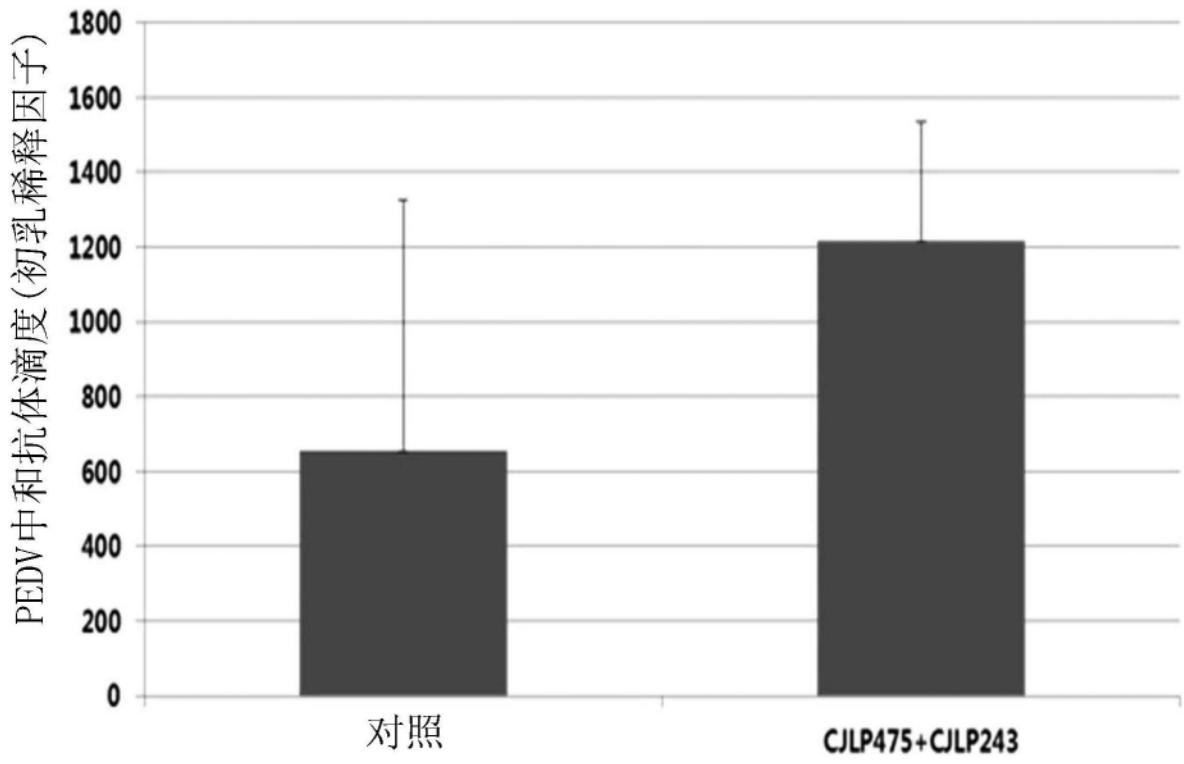


图18