

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 2월 20일 (20.02.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/027864 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/007410
- (22) 국제출원일: 2013년 8월 16일 (16.08.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0089714 2012년 8월 16일 (16.08.2012) KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 446-701 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김동현 (KIM, Dong-Hyun); 136-822 서울시 성북구 선잠로 92-24, Seoul (KR). 한명주 (HAN, Myung Joo); 136-822 서울시 성북구 선잠로 92-24, Seoul (KR). 정일훈 (JUNG, Il-Hoon); 431-760 경기도 안양시 동안구 관악대로 135, 131 동 1007 호, Gyeonggi-do (KR). 정명아 (JUNG, Myung-Ah); 480-731 경기도 의정부시 신곡로 13, 207 동 903 호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 유수미 (YU, Su Mi); 135-080 서울시 강남구 봉은사로 116, 5 층 스카이특허법률사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

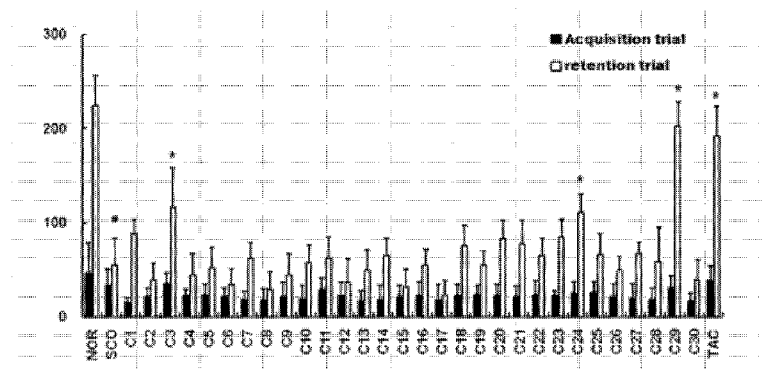
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: LACTIC ACID BACTERIA CAPABLE OF PREVENTING AND/OR TREATING SENESCENCE AND DEMENTIA

(54) 발명의 명칭: 노화 및 치매의 예방 및/또는 치료 활성을 갖는 유산균



(57) Abstract: The present invention provides a novel lactic acid bacterium having antioxidant and antiaging functions and a dementia alleviation effect, and more specifically, provides *Lactobacillus pentosus* var. plantarum C29 KCCM11291P and *Lactobacillus curvatus* C3 KCCM430009. In addition, the present invention provides an antioxidant and antiaging pharmaceutical composition and a dietary supplement containing the *Lactobacillus pentosus* var. plantarum C29 KCCM11291P or *Lactobacillus curvatus* C3 KCCM430009 of the present invention as an active ingredient, and a composition for preventing or treating dementia and a dietary supplement for preventing or alleviating dementia, containing *Lactobacillus pentosus* var. plantarum C29 KCCM11291P or *Lactobacillus curvatus* C3 KCCM430009 as an active ingredient. Additionally, the present invention provides a composition for preventing or treating dementia, containing a fermentation composition, as an active ingredient, fermented by *Lactobacillus pentosus* var. plantarum C29 KCCM11291P or *Lactobacillus curvatus* C3 KCCM430009.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2014/027864 A1



본 발명은 항산화 및 항노화 기능 및 치매 개선 효과를 갖는 신규의 유산균을 제공하며, 보다 구체적으로 락토바실러스 펜토시스 변종 플란타룸(*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29 KCCM11291P 및 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) C3 KCCM430009를 제공한다. 또한 본 발명은 본 발명의 락토바실러스 펜토시스 변종 플란타룸 C29 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3를 유효성분으로 포함하는 항산화 및 항노화 약학 조성물 및 건강기능식품, 및 락토바실러스 펜토시스 변종 플란타룸 C29 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3를 유효성분으로 포함하는 치매 예방 또는 치료용 조성물 및 치매 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토시스 변종 플란타룸 C29 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주로 발효한 발효 조성물을 유효 성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

명세서

발명의 명칭: 노화 및 치매의 예방 및/또는 치료 활성을 갖는 유산균 기술분야

- [1] 본 발명은 김치에서 분리된 신규의 유산균에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 노화 및 치매의 예방 및/또는 치료 활성을 가진 신규의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸(*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29 및 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) C3에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 고령화 사회로 빠르게 진행되고 있는 현대 사회에서 노화 과정을 지연시키는 것은 중요한 보건 과제 중 하나이다. 우리나라의 경우 2010년에 65세 이상의 인구가 11.3%를 차지하였으며, 2050년에는 37.3%로 급증할 것으로 예상되고 있다. 이와 같은 고령화 사회에서는 질병 이환율의 상승 및 막대한 의료비 지출이 예상되며 치매 등의 노인성 질환의 급증이 사회적으로 문제가 될 것으로 예상된다.
- [3] 노화가 진행되는 과정은 유전, 환경, 그리고 생활 방식의 복합적인 작용에 의해 영향을 받으며, 다양한 형태적, 생화학적 변화가 수반되는데, 특히, 산화스트레스의 증가와 염증 반응의 증가는 노화 촉진에 관여하는 주요 원인으로 여겨지고 있다. 산화스트레스는 반응성이 강한 산소 라디칼 (ROS, reactive oxygen species)의 생성 증가나 체내 항산화 방어 메커니즘의 감소로 일어나게 되는데, 그 결과 DNA 등의 생체 고분자가 파괴되고 세포 손상을 유발하여 노화를 촉진시키고, 치매를 비롯한 신경퇴행성 질환, 암, 심혈관계 질환 등의 노화 질병의 위험도를 높이게 된다.
- [4] Adler등 (Adler AS, Sinha S, Kawahara TL, Zhang JY, Segal E, Chang HY. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev.* 2007;21:3244-57)은 다수의 인체 조직과 실험 동물 조직에서 NF-κB 활성화 모티프(motif)와 노화과정을 조절하는 단위의 관련성을 입증하여 NF-κB로 매개되는 염증 반응과 노화 과정이 매우 밀접하게 연관되어 있음을 입증하였다. 또한, 노화는 PI3K/AKT를 활성화시키고, 이는 FOXO3를 인산화하여 ROS 생성을 억제하지 못하여 유전자 변이 등이 일어나게 됨이 알려져 있다.
- [5] 노화 질병 중 하나인 치매는 뇌의 만성적인 혹은 진행성 질환으로 인해 발생하며, 뇌조직의 퇴행, 변성 및 노화 중추신경계 감염(신경매독, 결핵성 뇌막염, 바이러스성 뇌염 등), 뇌경색, 뇌손상, 독성대사장애, 신경계질환(파킨슨병) 등이 치매를 일으키는 주요 원인으로 알려져 있다. 치매에는 알츠하이머형 치매(Alzheimer's disease), 혈관성 치매, 및 기타 혼합형이 있으며, 우리나라 65세 이상의 노인 치매 환자중 50~60%가 알츠하이머형 치매이고 15~30%가 혈관성 치매이며 나머지 10~15%가 이 두 가지 질환의

혼합형이다. 뇌속 노폐물인 베타아밀로이드(AB)가 알츠하이머형 치매의 주요 발병 원인으로 알려져 있으며, 알츠하이머형 치매의 치료를 위해 많은 약물들이 치료제로 시도되었으나 아직까지 뚜렷한 효과가 입증된 약물은 없다.

알츠하이머형 치매 환자들에게 부족한 뇌속 중요 신경전달물질 중 하나인 아세틸콜린(acetylcholine)에 작용하는

아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase) 제해제가 치료제로서 유일하게 사용되고 있으나, 이 약물은 부분적으로 인지기능의 호전은 보이지만 알츠하이머병의 진행에는 전혀 작용을 하지 못하는 것으로 알려져 있으며, 효과적인 치매 예방 또는 치료제의 개발이 요구되고 있다.

- [6] 한편, 유산균은 오랫동안 이용되어 왔으며 유산균의 정장 작용, 항암 효과, 면역증강 효과 등의 유익한 효과가 보고되어 왔다. 이에 본 발명자들은 노화와 치매에 유익한 효과를 갖는 유산균을 찾기 위하여 연구한 결과, 김치로부터 분리된 신규의 유산균이 노화와 치매에 대해 예방 또는 치료 효과를 가짐을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 노화와 치매에 대해 예방 또는 치료 효과를 갖는 유산균의 제공을 목적으로 한다.
- [8] 또한, 본 발명은 상기 유산균을 포함하는, 항산화 및 항노화 조성물 및 치매의 예방 또는 치료용 조성물의 제공을 목적으로 한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 유산균으로 발효시킨, 항산화 및 항노화 발효 조성물 및 치매의 예방 또는 치료용 발효 조성물의 제공을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [10] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 김치에서 분리된 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨(*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29 KCCM11291P를 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29를 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 약학 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29를 유효 성분으로 포함하는, 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29를 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 효과를 가진 건강기능식품을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29를 유효 성분으로 포함하는, 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29로 발효된 발효 조성물을 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 조성물을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29로 발효된 발효

조성물을 유효 성분으로 포함하는, 치매의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[17]

[18] 또한, 본 발명은 김치에서 분리된 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) C3 KCCM43009를 제공한다.

[19] 또한, 본 발명은 락토바실러스 쿠르바투스 C3을 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 약학 조성물을 제공한다.

[20] 또한, 본 발명은 락토바실러스 쿠르바투스 C3을 유효 성분으로 포함하는, 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[21] 또한, 본 발명은 락토바실러스 쿠르바투스 C3을 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 효과를 가진 건강기능식품을 제공한다.

[22] 또한, 본 발명은 락토바실러스 쿠르바투스 C3을 유효 성분으로 포함하는, 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[23] 또한, 본 발명은 락토바실러스 쿠르바투스 C3으로 발효된 발효 조성물을 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 조성물을 제공한다.

[24] 또한, 본 발명은 락토바실러스 쿠르바투스 C3으로 발효된 발효 조성물을 유효 성분으로 포함하는, 치매의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[25]

[26] 이하에서 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[27] 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 및 락토바실러스 쿠르바투스 C3는 배추 김치로부터 분리된 신규의 미생물이다.

[28] 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29는 16s rDNA 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 및 생화학적 특성 분석에서 락토바실러스에 속하는 균주로서 락토바실러스 펜토서스와 락토바실러스 플란타룸 모두에 높은 분자계통학적 유연관계를 나타내는 균주로 동정되었으나 생화학적 특성이 락토바실러스 펜토서스에 좀더 유사하여 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29로 명명하였으며, 국제기탁기관인 한국미생물보존센터에 2012년 7월 9일에 기탁 번호 KCCM11291P로 기탁되었다.

[29] 또한, 본 발명의 락토바실러스 쿠르바투스 C3는 16s rDNA 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석에서 락토바실러스에 속하는 균주로서 락토바실러스 쿠르바투스에 속하는 균주로 동정되어 락토바실러스 쿠르바투스 C3으로 명명되었으며, 국제기탁기관인 한국미생물보존센터에 2012년 7월 9일에 기탁 번호 KCCM43009로 기탁되었다.

[30] 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29(이하에서는 "C29"라고도 함) 및 락토바실러스 쿠르바투스 C3(이하에서는 "C3"라고도 함)는 알츠하이머병 동물 모델인 마우스를 이용한 수동회피반응 시험에서 C29 균주 또는 C3 균주의 투여에 의해 마우스의 기억이 개선되는 효과가 확인되었으며, C29 균주는 Y자형 미로 시험과 수중미로 시험에서도 기억개선 효과가 확인되어, 치매의 예방 및 치료 효과가 입증되었다(실시예 2 참조).

- [31] 본 발명에 있어서, 치매란 다양한 원인에 의해 뇌기능이 손상되면서 이전에 비해 기억력, 언어 능력, 판단력 등의 인지 기능이 지속적이고 전반적으로 저하되어 일상생활에 지장이 나타나고 있는 상태를 말하며, 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 물질로 유발된 치매 등을 포함한다.
- [32] 또한, 16개월령 마우스에 C29 균주 또는 C3 균주를 3개월간 투여한 후 지질 과산화물, 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(Superoxide dismutase) 활성, 카탈라아제(Catalase) 활성, 및 글루타치온 농도를 측정한 결과, 생리식염수를 3개월간 투여한 16개월령 마우스에 비하여 현저하게 우수한 항산화 효과를 나타내었으며 노화관련 유전자들의 발현 감소를 나타내어, 항산화 및 항노화 효과가 입증되었다(표 6 및 실시예 3 참조).
- [33] 이로써 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29와 락토바실러스 쿠르바투스 C3는 치매와 노화의 예방 및 치료에 우수한 효과를 갖는 균주임이 확인되었다.
- [34] 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29의 형태적 특징과 생리학적 특징, 수크로스 발효 분석 결과, 및 세포 지방산 조성이 각각 하기 표 1, 표 2 및 표 3에서 공지된 엘. 플란타룸(*L.plantarum*) ATCC 14917 및 엘.펜토서스(*L.pentosus*) DSM20314의 특성과 함께 나타난다.
- [35]
- [36] [표 1]
- [37] 균주 C29, 엘. 플란타룸 ATCC 14917 및 엘.펜토서스 DSM20314의 형태적 특징 및 생리학적 특징
- [38]

특징	균주 C29	열. 플란타툼 ATCC 14917™	열. 펜토서스 DSM20314™
형태적 특징			
세포 모양	막대형 (Rod)	막대형	막대형
그람 염색	양성	양성	양성
세포 크기(μm)	1-1.2 × 2.2-2.6	0.4-0.6 × 0.8-2	0.8-1 × 2-6
생리학적 특징			
인돌 생성	-	-	-
글루코스의 가스 생성	-	-	-
카탈라아제	-	-	-
옥시다아제	-	-	-
MRS 배지에서의 성장			
10 °C	+	+	+
15 °C	+	+	+
45 °C	+	-	-
다양한 pH에서의 성장			
pH 3	+	-	-
pH 5	+	+	+
pH 7	+	+	+
NaCl의 존재하에서의 성장			
5%	+	+	+
8%	+	+	+
10%	-	-	-
위액에서의 안정성	안정 함	불안정 함	불안정 함
장액에서의 안정성	안정 함	불안정 함	불안정 함
G+C (mol%)	50.7	44.1 ^a	46.1 ^a

[39] + : 양성 반응; - : 음성 반응

[40] a : Zanoni, P., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Collins, M.D. (1987) *Lactobacillus pentosus*(fred, peterson, and anderson) sp. Nov., norn, rev. Int J Syst Bacteriol 37, 339-341으로부터 입수

[41]

[42] [표 2]

[43] API 20E 및 API 50CHL을 이용한 유산균의 수크로스 발효의 분석

[44]

	균주 C29	엘. 플리타쿰 ^a ATCC 14917 TM	엘. 펜도시스 ^b DSM 20314 TM
API 20E			
ONPG	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	-	-	-
ADH	-	-	-
LDC	-	-	-
ODC	-	-	-
URE	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
VP	+	+	+
API 50CHL			
글리세롤	-	-	+
D-아라비노스	+	+	+
D-리보오스	+	+	+
D-자일로스	-	-	+
아도니톨	-	-	-
D-갈락토스	+	+	+
D-글루코스	+	+	+
D-프럭토스	+	+	+
D-만노스	+	+	+
L-람노스	+	-	D
둘시톨	-	-	D
마니톨	+	+	+
소르비톨	+	+	+
α -메틸-D-만노시드	+	+	-
α -메틸-D-글루코시드	-	-	D
N-아세틸-D-글루코사민	+	+	+
아미그달린	+	+	+
알부틴	+	+	+
에스쿨린	+	+	+
살리신	+	+	+
셀로비오스	+	+	+
말토스	+	+	+
락토스	+	+	+
멜리비오스	+	+	+
수크로스	+	+	+
트레할로스	+	+	+
이눌린	+	-	-
멜레지투스	+	+	D
리피노스	+	+	+
젠티오비오스	+	+	+
D-투라노스	+	+	D
D-아라비톨	-	+	D
글루코네이트	+	-	+

[45] + : 양성 반응; - : 음성 반응; D : 가변적 반응

[46] 상기 세 가지 유산균 중 어느 것도 2-케토-글루코네이트, 5-케토-글루코네이트, 에리트리톨, D-아라비노스, L-자일로스, β -메틸-D-자일로시드, L-솔보스, 이노시톨, 글리코젠, 자일리톨, D-라이소스, D-타가토스, D-푸코스, L-푸코스, L-아라비톨을 발효하지 않았음.

- [47] a : Van Reenen, C.A., Dicks, L.M. (1996) Evaluation of numerical analysis of random amplified polymorphic DNA (rapd)-pcr as a method to differentiate lactobacillus plantarum and lactobacillus pentosus. Curr Microbiol 32, 183-187로부터 입수.
- [48] b : Zanoni, P., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Collins, M.D. (1987) Lactobacillus pentosus(fred, peterson, and anderson) sp. Nov., norn, rev. Int J Syst Bacteriol 37, 339-341로부터 입수.
- [49]
- [50] [표 3]
- [51] 균주 C29, 엘.플란타룸 ATCC 14917 및 엘.펜토서스 DSM20314의 세포 지방산 조성

지방산	균주 C29	엘.플란타룸 ^a ATCC 14917 TM	엘.펜토서스 ^a DSM20314 TM
포화 지방산			
C _{12:0}	1.1	T	T
C _{14:0}	3.9	4.1	3.9
C _{16:0}	45.5	34.1	20.8
C _{18:0}	5.0	3.3	4.3
불포화 지방산			
C _{16:1} ω 7c	8.7	3.9	5.6
C _{18:1} ω 7c	25.5	27.2	45.1
분지쇄 지방산			
C _{19:0} cyclo ω 8c	10.1	8.7	5.7

- [53] T : 1% 미만의 미량의 산
- [54] a : 엘.플란타룸 : Van Reenen, C.A., Dicks, L.M. (1996) Evaluation of numerical analysis of random amplified polymorphic DNA (rapd)-pcr as a method to differentiate lactobacillus plantarum and lactobacillus pentosus. Curr Microbiol 32, 183-187로부터 입수.
- [55] 엘.펜토서스: Zanoni, P., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Collins, M.D. (1987) Lactobacillus pentosus(fred, peterson, and anderson) sp. Nov., norn, rev. Int J Syst Bacteriol 37, 339-341로부터 입수.
- [56]
- [57] 또한, 본 발명의 락토바실러스 쿠르바투스 C3의 형태적 특징과 생리학적 특징, 및 수크로스 발효 분석 결과가 각각 하기 표 4 및 표 5에서 공지된 엘. 쿠르바투스 ATCC25601의 특성과 함께 나타난다.

[58]

[59] [표 4]

[60] 균주 C3, 엘. 쿠르바투스 ATCC25601의 형태적 특징 및 생리학적 특징

[61]

특징	균주 C3	엘.쿠르바투스 ATCC25601
형태적 특징		
세포 모양	막대형(Rod)	막대형
그램 염색	양성	양성
세포 크기(μm)	1-1.2×2.2-2.6	0.4-0.6 × 0.8-2
생리학적 특징		
인돌 생성	-	-
글루코스의 가스 생성	-	-
카탈라아제	-	-
옥시다아제	-	-
MRS 배지에서의 성장		
10 °C	+	+
15 °C	+	+
45 °C	-	-
다양한 pH에서의 성장		
pH 3	-	-
pH 5	+	+
pH 7	+	+
G+C (mol%)	41.9	

[62] + : 양성 반응; - : 음성 반응

[63]

[64] [표 5]

[65] API 20E 및 API 50CHL을 이용한 유산균의 수크로스 발효의 분석

[66]

	균주 C3	열. 쿠르바투스 ATCC25601
API 20E		
H ₂ S	-	-
VP	+	+
API 50CHL		
L-아라비노스	-	-
D-리보오스	+	+
D-자일로스	-	-
D-갈락토스	+	+
D-글루코스	+	+
D-프럭토스	+	+
D-만노스	+	+
L-캡노스	+	+
소르비톨	-	-
아미그달린	-	-
에스쿨린	+	+
실리신	+	+
셀로비오스	+	+
말토스	+	+
락토스	+	+
멜리비오스	-	-
수크로스	-	-
트리 할로스	-	-
멜리지토스	-	-
라피노스	-	-

[67] + : 양성 반응; - : 음성 반응;

[68] 상기 유산균 중 어느 것도 2-케토-글루코네이트, 5-케토-글루코네이트, 에리트ρί톨, D-아라비노스, L-자일로스, β-메틸-D-자일로시드, L-솔보스, 이노시톨, 글리코젠, 자일리톨, D-라이소스, D-타가토스, D-푸코스, L-푸코스, L-아라비톨을 발효하지 않았음.

[69]

[70] 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 균주와 락토바실러스

쿠르바투스 C3 균주는 노화와 치매의 예방 및 치료를 위해 이용될 수 있으며, 따라서, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 균주 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주를 유효 성분으로 포함하는 항산화 및 항노화 약학 조성물, 및 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[71] 본 발명의 약학 조성물은 경구적으로 (예를 들면, 복용 또는 흡입) 또는 비경구적으로 (예를 들면, 주사, 경피흡수, 직장투여) 투여될 수 있으며, 주사는 예를 들면, 정맥주사, 피하주사, 근육내주사 또는 복강내주사일 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 투여 경로에 따라, 정제, 캡슐제, 과립제, 파인 서브틸레(fine subtilae), 분제, 설하 정제, 좌약, 연고, 주사제, 유탁액제, 현탁액제, 시럽제, 분무제 등으로 제형화될 수 있다. 상기 여러 가지 형태의 본 발명에 따른 약학 조성물은 각 제형에 통상적으로 사용되는 약학적으로 허용되는 담체(carrier)를 사용하여 공지기술에 의해 제조될 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체의 예는 부형제, 결합제, 붕해제(disintegrating agent), 윤활제, 방부제, 항산화제, 등장제(isotonic agent), 완충제, 피막제, 감미제, 용해제, 기재(base), 분산제, 습윤제, 현탁화제, 안정제, 착색제 등을 포함한다.

[72] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제의 형태에 따라 다르지만, 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 균주 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주를 약 0.01 내지 100 중량%로 포함한다.

[73] 본 발명의 약학 조성물의 구체적인 투여량은 치료되는 사람을 포함한 포유동물의 종류, 체중, 성별, 질환의 정도, 의사의 판단 등에 따라 다를 수 있으며, 본 기술분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 특정한 용도에 따른 적절한 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 바람직하게는, 경구투여의 경우에는 하루에 체중 1kg당 활성성분 0.001 내지 500 mg이 투여되고, 비경구투여의 경우에는 하루에 체중 1kg당 활성성분 0.01 내지 200 mg이 투여된다. 보다 바람직하게는, 하루에 체중 1 kg 당 활성성분 100 mg이 투여된다. 상기 총 일일 투여량은 질환의 정도, 의사의 판단 등에 따라 한번에 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

[74]

[75] 본 발명은 또한 C29 균주 또는 C3 균주를 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 효과를 가진 건강기능식품과 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[76] 본 발명의 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액제, 에멀전, 시럽제 등의 경구형 제제 형태이거나, 캔디, 과자, 껌, 아이스크림, 면류, 빵, 음료 등 일반적인 식품에 첨가될 수 있다.

[77] 본 발명의 건강기능식품은 형태에 따라 통상적인 방법으로 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 감미제, 방향제, 보존제, 계면활성제, 윤활제, 부형제 등을 적절히 사용하여 제조될 수 있다.

[78] 상기 건강기능식품의 제조에 있어서 C29 균주 또는 C3 균주의 함량은 건강기능식품의 형태에 따라 다르지만, 대략 0.01 내지 100 중량%의 농도이다.

[79]

[80] 또한, 본 발명은 C29 균주 또는 C3 균주로 발효한 발효 조성물을 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 효과를 가진 조성물과 치매의 예방 또는 개선용 조성물을 제공한다.

[81] 본 발명에 있어서, 상기 발효 조성물은 콩 또는 탈지콩 발효 조성물, 해동피 발효 조성물, 인삼 발효 조성물, 및 더덕 발효 조성물을 포함한다.

[82] 본 발명에 있어서, 콩 또는 탈지콩 분말의 물 현탁물은 건조한 콩 또는 탈지콩 분말에 중량대비 5 내지 15배의 물을 첨가하여 현탁하여 사용하는 것을 의미하나, 이에 한정되는 것은 아니며 본 발명의 목적에 부합하는 한 물에 불린 콩을 갈아서 두유 형태로 제조하여 사용할 수도 있다.

[83] 본 발명에 있어서, 상기 해동피, 인삼, 및 더덕은 추출물 또는 엑기스 형태일 수 있으며 바람직하게는 열수추출법, 주정(酒精)추출법 또는 혼합추출법에 의해 제조된 추출물 형태인 것을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출물의 추출효율을 높이기 위하여 분쇄 또는 분말화할 수 있으며, 당업계에 공지된 통상적인 추출법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들면 물 추출법, 알코올 추출법, 유기용매 추출법 및 초임계 추출법 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 물 추출법을 이용하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[84] 상기 알코올 추출법에 있어 사용되는 추출용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 6의 저급 알코올 등을 사용할 수 있으며, 상기 유기용매 추출법의 추출용매로는 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산, 염산, 초산, 포름산, 구연산, 시클로헥산 및 석유에테르 등의 유기용매; 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다.

[85] 이때, 추출시 첨가되는 추출용매의 비율은 특별히 한정되지 않으나, 해동피, 인삼 또는 더덕 건조 중량에 대하여 추출용매를 2배 내지 20배(중량기준)로 사용할 수 있다. 추출효율을 증가시키기 위해서는 바람직하게는, 해동피, 인삼 또는 더덕에 대하여 추출용매 5배 내지 15배(중량기준)를 사용하여 2회 이상 수회 반복할 수 있다.

[86] 이때, 추출온도는 50 내지 110°C가 바람직하며, 더욱 바람직하게는 70 내지 100°C이다. 추출시간은 추출온도에 따라 다르지만, 1시간 내지 48시간, 바람직하게는 2시간 내지 8시간 추출한다. 또한, 추출시 교반기(shaker)로 교반할 경우에 더욱 추출효율을 증대시킬 수 있다.

[87] 상기 엑기스는 감압증류법이나 박막증류법으로 제조할 수 있다.

[88] 본 발명에 있어서, C29 균주 또는 C3 균주를 접종하여 발효시킨 콩 또는 탈지콩 발효 조성물, 해동피 발효 조성물, 인삼 발효 조성물, 및 더덕 발효 조성물은 알츠하이머병 동물 모델인 마우스를 이용한 수동회피반응 시험에서 상기 발효 조성물의 투여에 의해 마우스의 기억이 개선되는 효과가 확인되어, 치매의 예방 및 치료 효과가 입증되었다(실시예 5 참조).

[89] 본 발명에 있어서, 상기 추출물에 C29 균주 또는 C3 균주 접종시 잡균의 생장을 억제하기 위해 100°C 이상에서 15분 내지 1시간 동안 가열하여 멸균하여 사용한다.

[90] 상기 C29 균주 또는 C3 균주의 접종량은 발효에 이용되는 추출물의 종류에 따라 다르지만 1×10^8 CFU/ml 이상이 되게 하고 발효온도는 20 내지 40°C가 바람직하다. 본 발명의 목적에 부합되는 것이라면 발효 시간은 특별한 제한은 없으나, C29 균주 또는 C3 균주를 접종하여 10 내지 30시간 동안 발효할 수 있다. 여기서, 10시간 이하로 발효하면 발효 조성물이 충분히 만들어지지 않고, 30시간 이상으로 발효하면 유기산이 많이 만들어져 신맛이 강하여 식감이 떨어지기 때문에 상술한 발효 시간 범위 내에서 발효하는 것이 바람직하다.

[91]

[92] 또한, 본 발명에 있어서, 발효에 사용되는 재료에 따라 다양한 발효 식품을 제조할 수 있으며, 일례로 분유 또는 우유에 C29 균주 또는 C3 균주를 접종하고 상기와 같은 방법으로 발효시킴으로써 요쿠르트 등의 유산균 발효음료를 제조할 수 있다.

발명의 효과

[93] 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주는 노화와 치매에 대해 우수한 예방 및 개선 효과를 가짐이 확인되어 노화와 치매의 예방 또는 치료를 위해 유용하게 이용될 수 있다. 따라서 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 균주 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주를 포함하는 약학 조성물과 건강기능식품은 노화와 치매를 예방하거나 치료하기 위하여 효과적으로 이용될 수 있으며, 일상적으로 섭취하는 김치에 존재하는 균주가 유효 성분이므로 부작용이나 독성 등의 염려없이 이용될 수 있을 것이다. 또한, 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주를 접종하여 발효 조성물을 제조함으로써 노화와 치매를 예방하거나 치료하기 위한 조성물로 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[94] 도 1은 C29 유산균의 16S rDNA 서열(서열 번호 1)을 보여준다.

[95] 도 2는 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29의 위치를 보여주는 계통수이다.

[96] 도 3은 수동회피반응 시험 결과를 보여주는 그래프이다.

[97] 도 4는 C29 균주의 기억 개선 효과가 농도의존적으로 커짐을 보여주는 그래프이다.

[98] 도 5는 C29 균주의 기억 개선 효과를 보여주는 젤 사진이다.

[99] 도 6은 실시예 2의 Y자형 미로 시험의 결과를 보여주는 그래프이다.

[100] 도 7은 실시예 2의 수중미로 시험의 결과를 보여주는 그래프로서, 검은

사각형은 스코폴아민 + (1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스 C29)이고, 흰색 사각형은 스코폴아민 + (1×10^{10} CFU/마우스 C29)이고, 검은 삼각형은 스코폴아민 + (10 mg/kg 타크린 양성대조약물)이고, 흰색 원은 스코폴아민 단독이고, 검은 원은 정상 대조 마우스이다. 값은 평균 $\pm$ SEM (n=6)이다.

[101] *p<0.05 vs. 정상 대조군이며, *p<0.05 vs. 스코폴아민 단독처리 대조군이다.

[102] 도 8은 C29 균주의 투여에 따른 노화관련 유전자 인산체의 발현량 변화를 보여주는 젤 사진이다.

[103] 도 9는 실시예 3의 Y자형 미로 시험의 결과를 보여주는 그래프로서, Y는 어린 마우스이고, O는 노화 마우스이고, O/C29는 C29 유산균(1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스)을 투여한 노화 마우스이고, O/C3은 C3 유산균(1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스)을 투여한 노화 마우스이고, O/C24는 C24 유산균(1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스)을 투여한 노화 마우스이다.

[104] 도 10은 실시예 3의 수중미로 시험의 결과를 보여주는 그래프로서, Y는 어린 마우스이고, O는 노화 마우스이고, O/C29는 C29 유산균(1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스)을 투여한 노화 마우스이고, O/C3은 C3 유산균(1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스)을 투여한 노화 마우스이고, O/C24는 C24 유산균(1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스)을 투여한 노화 마우스이다. 값은 평균 $\pm$ SEM (n=6)이다.

[105] 도 11은 C3 유산균의 16S rDNA 서열(서열 번호 2)을 보여준다.

[106] 도 12는 C29 또는 C3 균주로 발효된 발효 조성물의 인지 기능 개선효과를 보여주는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

[107] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[108]

[109] 실시예 1. 유산균 분리

[110] 배추김치를 MRS 브로쓰(broth)에 현탁하고, 상등액을 MRS 한천(agar) 배지에 이식한 다음, 24시간 동안 37°C에서 혐기적으로 배양하여 자라나온 콜로니를 선별하여 그람 염색과 16S rDNA를 분석하여 락토바실러스 균주를 분리하였다.

[111] 또한, 사람의 분변을 GAM 브로쓰(Nissui Pharmaceutical Company, Ltd., 일본)에 현탁하고, 상등액을 BL 한천 배지(Nissui 제약)에 이식한 다음, 48시간 동안 37°C에서 혐기적으로 배양하여 자라나온 콜로니를 선별하여 그람 염색과 16S rDNA를 분석하여 락토바실러스와 비피도박테리움 균주를 분리하였다.

[112] 분리된 균주는 다음과 같다.

[113] 1) 김치에서 분리하여 사용한 유산균

[114] 류코노스톡 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) C1

- [115] 류코노스톡 김치(*Leuconostoc kimchii*) C2
- [116] 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) C3
- [117] 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) C4
- [118] 락토바실러스 브레비스 C5
- [119] 락토코커스 플란타룸(*Lactococcus plantarum*) C6
- [120] 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) C7
- [121] 페디오코커스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*) C8
- [122] 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) C9
- [123] 락토바실러스 락티스(*Lactobacillus lactis*) C10
- [124] 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*) C11
- [125] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) C12
- [126] 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*) C13
- [127] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) C14
- [128] 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus pentosus*) C15
- [129] 락토바실러스 사케이 C21
- [130] 락토바실러스 사케이 C22
- [131] 락토바실러스 사케이 C23
- [132] 락토바실러스 플란타룸 C24
- [133] 락토바실러스 플란타룸 C25
- [134] 락토바실러스 플란타룸 C26
- [135] 락토바실러스 펜토서스 C27
- [136] 락토바실러스 펜토서스 C28
- [137] 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29
- [138] 락토바실러스 사케이 C30
- [139]
- [140] 2) 사람소화관에서 분리하여 사용한 유산균
- [141] 비피도박테리움 브레비(*Bifidobacterium breve*) C16
- [142] 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) C17
- [143] 비피도박테리움 애돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) C18
- [144] 비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*) C19
- [145] 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) C20
- [146]
- [147] 실시예 2. 항치매 효과의 확인
- [148] 김치와 분변에서 분리된 30가지 유산균 중에서 항치매 효과를 갖는 유산균을 확인하기 위하여 상기한 C1 내지 C30 균주와 실험 동물을 이용하여 실험을 실시하였다.
- [149] 실험에 사용된 모든 동물은 28~30 g의 수컷 ICR계 마우스로 실험동물 사용 및 관리에 관한 지침 (NIH publication No. 85-23)에 의거하여 실험을 수행하였다.

실험동물들을 우리(cage) 당 5~6 마리 유치하고 먹이 섭취는 자유롭게 방치하였다. 사육장내 온도는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 $60 \pm 10\%$ 이고, 12 시간 (07:30 ~ 19:30) 일장을 항상 유지하였다.

[150]

[151] 2-1. 수동회피반응 시험(Passive avoidance task test)

[152] 실험기구로 실험상자(50 x 15 x 40cm, electrofiable frid floor)는 칸막이를 이용하여 두 구획으로 구분하는데 작은 입구를 통해 한쪽에서 건너편 구획으로 들어가면 자동적으로 입구가 닫히도록 되어있다. 칸막이로 나누어진 구획의 한쪽에 조명을 켜고 동물을 넣으면 주변을 살피다가 조명이 없는 어두운 구획으로 들어가게 되면, 자동적으로 입구가 닫히고, 즉시 0.25 mA의 전류를 바닥의 스테인레스 그리드를 통해 1초 동안 흘려 전기충격(foot shock)을 준다. 익일 조명이 켜진 구획에 실험동물을 넣은 후부터 이 동물이 어두운 구획으로 넘어가 입구가 닫힐 때까지의 시간(latency)을 측정한다. 대조군과 시험군에게 이와 같이 어두운 구획으로 들어가기까지의 시간을 측정, 비교한다. 최대 제한시간은 300초로 하는데, 300초가 넘도록 어두운 구획으로 들어가지 않으면 수동회피반응 시간을 300초로 결정한다. 동물이 어두운 구획으로 넘어가 입구가 닫힐 때까지의 시간이 클수록 학습을 통한 수동 회피에 대한 기억이 잘 유지되는 것으로 판단하였다.

[153] 실험에 사용한 C1 내지 C30의 유산균 30종을 각각 1×10^{10} CFU(개)를 1일 1회씩 2일간 치매 동물 모델인 마우스에 투여하였다. 스코폴라민(Scopolamine) (0.9 mg/kg)은 유산균 마지막 투여 1시간 후에 투여하였다. 그 결과, 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 실험에 사용한 유산균중 C29가 수동 회피에 대한 기억이 가장 잘 유지되며 치매 치료제인 타크린(Tacrin, TAC, 10 mg/kg)보다 효과가 우수한 것으로 나타났으며, 다음으로 C3, C24 순이었다.

[154] 가장 효과가 우수한 것으로 확인된 C29 유산균을 1×10^9 및 1×10^{10} CFU(개)를 1일 1회씩 2일간 마우스에 투여하였다. 스코폴라민 (0.9 mg/kg)은 유산균 마지막 투여 1시간 후에 투여하였다. 그 결과, 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, C29는 농도의존적으로 효과를 나타냈다.

[155] 또한, 이 동물에서 치매개선 효과를 확인하기 위해 뇌의 히포캄퍼스를 분리하여 프로테아제 억제제 콕테일(protease inhibitor cocktail)이 함유된 100 μl 의 RIPA buffer (Gibco사)를 첨가하여 균질화시켰다. 4°C , 13000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 -80°C 에서 보관하면서 p-CREB, CREB, BDNF 및 β -액틴을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다.

[156] 먼저, 상등액을 취해 SDS 10%(w/v) 폴리아크릴아미드 젤에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다 (샘플, 50 μg). 전기영동한 것을 니트로셀룰로소지에 100V, 400mA에서 1시간 10분간 트랜스퍼하고, 이 트랜스퍼된 니트로셀룰로소지를 30분간 5% 탈지유로 블로킹한 후 5분씩 3회 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100으로 밤새 반응시켰다. 그 후 10분씩

3회 세척한 후, 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000으로 1시간 20분간 반응시켰다. 그 후 15분씩 3회 세척하고, 형광발색시켜 현상하였다. 그 결과, 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 스코폴라민 만을 투여한 치매모델 동물군에 비해 C29를 스코폴라민과 동시에 투여한 군에서 스코폴라민 투여에 의해 감소한 p-CREB 및 BDNF가 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 C29 유산균이 기억 개선 효과를 가짐을 보여주는 것이다.

[157] 상기와 같은 실험 결과는 C29와 C3 유산균이 기억력 개선을 통해 치매 개선 효과를 나타냄을 잘 보여준다.

[158]

[159] 2-2. Y자형 미로 실험 (Y-maze task)

[160] Y자형 미로 측정장치는 3개의 통로 (arm)를 뺀 Y자 모양을 하고 있으며 각 가지는 길이 25 cm, 높이 14 cm, 폭 5 cm 이고 동일한 각도로 위치한다. Y자형 미로의 한 통로의 끝에 실험동물의 머리 부분이 향하도록 두고 8 분 동안 자유롭게 통로를 돌아다니도록 한다. 동물의 움직임을 기록하고 동물의 뒷발까지 통로로 들어간 경우를 통과한 것 (arm entry)으로 본다. 동물의 움직임을 교차횟수 (alternation)로 나타내는데, 교차횟수란 동물이 연속적으로 3개의 통로를 통과하였을 때 한 번 교차한 것으로 정의된다. 자발적인 교차행동량은 실제 교차횟수와 최대 가능한 교차횟수 (즉, 총 교차횟수에서 2를 뺀 값)의 백분비로 표시한다.

[161] 실험에 사용한 유산균 중 가장 우수했던 유산균인 C29를 1×10^9 및 1×10^{10} CFU(개)를 1일 1회씩 2일간 투여하였다. 스코폴라민 (0.9 mg/kg)은 유산균 마지막 투여 1시간 후에 투여하였다.

[162] 그 결과, 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 스코폴라민만을 투여한 시험군에 비하여 C29를 투여한 시험군은 농도의존적으로 기억 개선 효과를 나타냈다.

[163]

[164] 2-3. 수중미로 시험(Water maze task)

[165] 원형의 물탱크(지름 100cm, 높이 35cm)에 온도 23°C의 물 속에 장치한 플랫폼이 보이지 않도록 분유를 넣어 부영계 만든 물을 15cm 깊이로 채웠다. 마우스를 이용하는 경우, 플랫폼(platform, 지름 4.5cm, 높이 14.5cm)을 전체 물 탱크를 4등분한 중 하나의 부채꼴 중앙에 놓아 플랫폼 상단이 수면 0.5cm 밑에 위치하도록 하였다. 이 장치를 위치를 확인할 만한 표식이 있는 실험실에 설치하였다. 훈련 시험(Training trial)은 1일 3회씩 5일간 연속적으로 실시하였다. 일단 마우스가 플랫폼을 찾으면 약 10초간 플랫폼에 머무르도록 두었다가 원래의 우리로 돌아가 있도록 한 5분 후에 다음 시험을 실시하였다. 만일 마우스가 120초 이내에 플랫폼을 찾지 못하면 이를 플랫폼에 10초간 두었다가 시험을 끝냈다. 훈련이 끝난 동물을 대상으로 마지막 훈련 시험 24시간 후에 프로브 시험(probe test)을 실시하였다. 이때는 풀에서 플랫폼을 제거하고 90초 동안에 플랫폼이 놓여 있던 4분원에 머무는 시간을 측정하여 백분율로

나타냈다.

[166] 실험에 사용한 유산균 중 가장 우수했던 C29 유산균을 1×10^9 및 1×10^{10} CFU(개)를 1일 1회씩 4일간 투여하면서 매일 수영 시간을 측정하였다. 스크폴아민 (0.9 mg/kg)은 유산균 첫 투여 1시간 후에 투여하였다.

[167] 그 결과, 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, C29 유산균은 농도의존적으로 기억 개선 효과를 나타냈다.

[168]

[169] 실시에 3. 항산화, 항노화, 및 항치매 효과의 확인

[170] 항산화, 항노화 및 항치매 효과의 확인을 위하여, 16개월령 마우스에 3가지 유산균 C29, C3, C24(각각 1×10^9 CFU)를 주 5일씩 12주간 투여하고 산화반응의 진행이 빠른 대장에서 유산균의 항산화 효과와 노화관련 유전자 AKT, FOXO3, NF-kB(p65), mTor 인산화체를 측정하였다. 비교 유전자로 베타-액틴을 측정하였다. 또한, 기억력 개선 효과를 측정하였다.

[171]

[172] 1) 지질 과산화물 분석

[173] 실험동물의 대장조직 100 mg에 프로테아제 억제제 각테일이 함유된 250 μ l의 RIPA buffer를 첨가하여 균질화시켰다. 그 후 4°C, 13000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 -80°C에서 보관하면서 지질 과산화 분석에 사용하였다.

[174] 대장조직 내 지질 과산화 정도는 TBARS 분석 키트(Cayman chem., USA)를 사용하여 분석하였다. 대장조직의 균질액 100 μ l를 5 ml의 폴리프로필렌 스크류캡 원심분리 튜브에 넣은 다음, 100 μ l의 SDS 용액을 첨가하고 가볍게 흔들었다. 4 ml의 컬러 시약을 튜브에 첨가한 다음, 1시간 동안 끓는 물에 넣어 반응을 중지시켰다. 그 후, 4°C, 13000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 실온에서 30분간 정치하고 ELISA 판독기를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 말론알데히드(MDA)를 사용하여 표준곡선을 작성하고 이것으로부터 생성된 MDA의 양을 측정하였다.

[175]

[176] 2) 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(Superoxide dismutase)(SOD) 활성

[177] Cu, Zn-SOD 활성은 잔틴 옥시다아제-사이토크롬(xanthine oxidase-cytochrome) C 시스템을 사용하여 측정하였다. 50 mM 인산칼륨 버퍼(pH 7.8, 0.1 mM EDTA 함유) 2.4 ml, 0.1 mM 페리사이토크롬 C 0.3 ml, 1% 테옥시콜레이트 0.2 ml, 1.5 mM 시안화칼륨 0.1 ml, 0.5 mM 잔틴 0.3 ml 및 희석 잔틴 옥시다아제 20 ml를 잘 혼합하여, 페리사이토크롬 C의 감소율을 25 °C, 550 nm에서 측정하였다. SOD의 1 unit는 사이토크롬 C의 50% 감소를 저해하기 위한 SOD의 양으로 정의하였다.

[178]

[179] 3) 카탈라아제(Catalase) 활성

[180] 50 mM 인산염 버퍼(pH 7.0) 2 ml에 효소원 100 μ l를 가하고 10 mM H₂O₂ 용액을 1 ml가하여 240 nm에서 2분간 흡광도 감소를 측정하였다. 1 unit는 1분 동안 H₂O₂

1 mol을 분해하는 효소의 양으로 정의하였다.

[181]

[182] 4) 글루타치온(GSH)

[183] GSH 농도는 샘플을 인산염 버퍼로 희석하여 o-프탈알데히드를 가하고, 15분 진탕 후, 여기 파장 345 nm, 방사 파장 425 nm에서 형광을 측정하였다.

[184]

[185] 상기한 바와 같은 4가지의 실험 결과, 하기 표 6에 나타난 바와 같이, 실험에 사용한 3가지의 군주 모두 우수한 항산화 및 항노화 결과를 나타냈다. 가장 우수한 군주는 C29였고, 이어서 C24, C3 순이었다.

[186] [표 6]

[187]

군	효소활성 (mol/min/mg)			
	수퍼옥사이드 디스무타아제 (mol/min/mg)	카탈라아제 (mol/min/mg)	말론알데히드 (μ mol/mg 단백질)	글루타치온 μ g / mg 단백질
2 개 월령 마우스에 생리식염수 (3개월) 투여	2.8 $\pm$ 0.6	6.0 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.9	3.9 $\pm$ 0.2
16 개 월령 마우스에 생리식염수 (3개월) 투여	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.5	9.4 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 1.3
16 개 월령 마우스에 C29 (3개월) 투여	1.6 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 1.0	5.2 $\pm$ 1.9	3.9 $\pm$ 0.5
16 개 월령 마우스에 C3 (3개월) 투여	1.8 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 1.2	5.3 $\pm$ 1.2	2.8 $\pm$ 0.9
16개월 마우스에 C24 (3개월) 투여	1.9 $\pm$ 0.6	4.1 $\pm$ 1.6	4.2 $\pm$ 2.1	4.0 $\pm$ 1.4

[188] 또한, 실험동물의 대장조직 100 mg에 프로테아제 억제제 콕테일이 함유된 250 μ l의 RIPA buffer (Gibco사)를 첨가하여 균질화시켰다. 4°C, 13000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 -80°C에서 보관하면서 포스포르-FOXO3, 포스포르-p65, p65, 포스포르-mTor, 포스포르-AKT 및 β -액틴을 면역블롯팅 방법으로 측정하였다.

[189] 상등액을 취해 SDS 10%(w/v) 폴리아크릴아미드 겔에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다 (샘플, 50 μ g). 전기영동한 것을 니트로셀룰로소지에 100V, 400mA에서 1시간 10분간 트랜스퍼하고, 이 트랜스퍼된 니트로셀룰로소지를 30분간 5% 탈지유로 블로킹한 후 5분씩 3회 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100으로 밤새 반응시켰다. 그 후 10분씩 3회 세척한 후, 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000으로 1시간 20분간 반응시켰다. 그 후 15분씩 3회 세척하고, 형광발색시켜 현상하였다.

[190] 유효성분과 LPS 처리하지 않은 것을 제외하고, 동일하게 처리한 세포를 대조군으로 하였다. 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, C29 또는 C3로 처리한

시험군의 경우, 비처리군에 비하여 p-p65, p-FOXO3, p-mTor, p-AKT 등이 현저하게 줄어드는 것을 볼 수 있으며, 이는 C29 또는 C3에 의한 항산화 및 항노화 효과를 잘 보여주는 것이다.

[191]

[192] 5) Y자형 미로 실험 (Y-maze task)

[193] Y자형 미로 측정장치는 3개의 통로 (arm)를 뺀 알파벳 Y자 모양을 하고 있으며 각 가지는 길이 25 cm, 높이 14 cm, 폭 5 cm 이고 동일한 각도로 위치한다. Y자형 미로의 한 통로의 끝에 실험동물의 머리 부분이 향하도록 두고 8 분 동안 자유롭게 통로를 돌아다니도록 한다. 동물의 움직임을 기록하고 동물의 뒷발까지 통로로 들어간 경우를 통과한 것 (arm entry)으로 본다. 동물의 움직임을 교차횟수 (alternation)로 나타내는데, 교차횟수란 동물이 연속적으로 3개의 통로를 통과하였을 때 한 번 교차한 것으로 정의된다. 자발적인 교차행동량은 실제 교차횟수와 최대 가능한 교차횟수 (즉, 총 교차횟수에서 2를 뺀 값)의 백분비로 표시한다.

[194] 실험에서 C29 유산균, C3 유산균 및 C24 유산균을 16개월령 마우스에 각각 1×10^9 CFU(개)를 1일 1회씩 2일간 투여하였다. 본 시험에서는 어린 마우스에 비하여 노화 마우스는 기억력이 떨어지기 때문에 스코폴라민은 투여하지 않았다.

[195] 그 결과, 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, 노화된 마우스의 기억력 개선효과는 C29 유산균이 가장 우수했으며 그 다음으로 C3 유산균, C24 유산균 순이었다.

[196]

[197] 6) 수중미로 시험 (Morris water maze test)

[198] 원형의 물탱크(지름 100cm, 높이 35cm)에 온도 23°C의 물 속에 장치한 플랫폼이 보이지 않도록 분유를 넣어 부영계 만든 물을 15cm 깊이로 채웠다. 마우스를 이용하는 경우, 플랫폼(platform, 지름 4.5cm, 높이 14.5cm)을 전체 물 탱크를 4등분한 중 하나의 부채꼴 중앙에 놓아 플랫폼 상단이 수면 0.5cm 밑에 위치하도록 하였다. 이 장치를 위치를 확인할 만한 표식이 있는 실험실에 설치하였다. 훈련 시험(Training trial)은 1일 3회씩 5일간 연속적으로 실시하였다. 일단 마우스가 플랫폼을 찾으면 약 10초간 플랫폼에 머무르도록 두었다가 원래의 우리로 돌아가 있도록 한 5분 후에 다음 시험을 실시하였다. 만일 마우스가 120초 이내에 플랫폼을 찾지 못하면 이를 플랫폼에 10초간 두었다가 시험을 끝냈다. 훈련이 끝난 동물을 대상으로 마지막 훈련 시험 24시간 후에 프로브 시험(probe test)을 실시하였다. 이때는 풀에서 플랫폼을 제거하고 90초 동안에 플랫폼이 놓여 있던 4분원에 머무는 시간을 측정하여 백분율로 나타냈다.

[199] 실험에서 C29 유산균, C3 유산균 및 C24 유산균을 16개월령 마우스에 각각 1×10^9 CFU(개)를 1일 1회씩 4일간 투여하면서 매일 수영 시간을 측정하였다. 본

시험에서는 어린 마우스에 비하여 노화 마우스는 기억력이 떨어지기 때문에 스코폴라민은 투여하지 않았다.

[200] 그 결과, 도 10에서 확인할 수 있는 바와 같이, 노화된 마우스의 기억력 개선효과는 C29 유산균이 가장 우수했으며 그 다음으로 C3 유산균, C24 유산균 순이었다.

[201]

[202] 실시에 4. C29 및 C3 유산균의 동정

[203] 상기 실험들에서 우수한 항산화 및 항노화 효과 및 치매 개선 효과를 가진 것으로 확인된 C29 균주와 C3 균주를 동정하기 위하여, 16S rDNA 유전자 서열 비교를 통한 계통유전학적 분석을 실시하였다.

[204] 블라스트 유사성 조사 프로그램을 이용하여 rDNA의 염기 서열을 비교하고, 다양한 락토바실러스 종 균주들의 16S rDNA 유전자 서열과 함께 다중 서열 정렬을 진행한 후 계통수에서의 위치를 판별한 결과, C29 유산균은 락토바실러스 플란타륨 균주 BIM B-536과 락토바실러스 펜토서스 균주 LS3과 99.9% 이상의 상동성을 나타내어 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29로 명명하고, 기탁 기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 2012년 7월 9일자로 기탁 번호 KCCM11291P로 기탁하였다. 또한, C3 유산균은 락토바실러스 쿠르바투스와 99.9% 이상의 상동성을 나타내어 락토바실러스 쿠르바투스 C3으로 명명하고, 기탁 기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 2012년 7월 9일자로 기탁 번호 KCCM43009로 기탁하였다.

[205]

[206] 실시에 5. C29 또는 C3 균주 발효 조성물의 항치매 효과 확인

[207] C29 또는 C3 균주로 발효된 콩 또는 탈지콩 발효 조성물, 해동피 발효 조성물, 인삼 발효 조성물, 및 더덕 발효 조성물의 항치매 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 실험 동물을 이용하여 수동회피반응 시험(Passive avoidance task test)을 실시하였다.

[208]

[209] 5-1. 발효 조성물 제조

[210] 콩 또는 탈지콩 분말 10g을 물 90ml에 현탁하고 멸균하여 1×10^8 CFU(개)/0.1ml의 C29 또는 C3 균주 10ml를 넣어 24시간 동안 배양하였다.

[211] 해동피 물 추출물, 인삼 물 추출물 및 더덕 물 추출물 각각 10g을 물 90ml에 현탁하고 멸균하여 1×10^8 /0.1ml의 C29 또는 C3 균주 10ml를 넣어 24시간 동안 배양하였다.

[212]

[213] 5-2. 수동회피반응 시험(Passive avoidance task test)

[214] 상기 방법에 의해 제조된 콩 또는 탈지콩 발효 조성물, 해동피 발효 조성물, 인삼 발효 조성물, 및 더덕 발효 조성물 각각 0.1ml를 1일 1회씩 2일간 치매 동물 모델인 마우스에 투여하였다. 스코폴라민(Scopolamine) (0.9 mg/kg)은 유산균

마지막 투여 1시간 후에 투여하였다. 그 결과, 도 12에서 확인할 수 있는 바와 같이, C29로 발효시킨 콩 발효 조성물이 수동 회피에 대한 기억이 가장 잘 유지되며 치매 치료제인 타크린(Tacrin, TAC, 10 mg/kg)보다 효과가 우수한 것으로 나타났으며, 다음으로 C29로 발효시킨 인삼 발효 조성물, C3으로 발효시킨 콩 발효 조성물, C29로 발효시킨 더덕 발효 조성물 순이었다. 이는 C29 또는 C3 균주로 발효시킨 발효 조성물이 기억 개선 효과를 가짐을 보여주는 것이다.

- [215] 상기와 같은 실험 결과는 C29 또는 C3 균주로 발효시킨 발효 조성물이 기억력 개선을 통해 치매 개선 효과를 나타냄을 잘 보여준다.

청구범위

- [청구항 1] 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸(*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29 KCCM11291P.
- [청구항 2] 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 KCCM11291P 균주를 유효 성분으로 포함하는 항산화 및 항노화 약학 조성물.
- [청구항 3] 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 KCCM11291P 균주를 유효 성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 KCCM11291P 균주를 유효 성분으로 포함하는 항산화 및 항노화 효과를 가진 건강기능식품.
- [청구항 5] 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 KCCM11291P 균주를 유효 성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 균으로부터 선택되는 약학 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 균으로부터 선택되는 건강기능식품.
- [청구항 8] 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) C3 KCCM43009 균주를 유효 성분으로 포함하는 항산화 및 항노화 약학 조성물.
- [청구항 9] 락토바실러스 쿠르바투스 C3 KCCM43009 균주를 유효 성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 10] 락토바실러스 쿠르바투스 C3 KCCM43009 균주를 유효 성분으로 포함하는 항산화 및 항노화 효과를 가진 건강기능식품.
- [청구항 11] 락토바실러스 쿠르바투스 C3 KCCM43009 균주를 유효 성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 12] 제9항에 있어서, 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 균으로부터 선택되는 약학 조성물.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 균으로부터 선택되는 건강기능식품.
- [청구항 14] 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 KCCM11291P 균주

또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 KCCM43009 균주로 발효된 발효 조성물을 유효 성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 조성물.

[청구항 15]

제14항에 있어서, 상기 발효 조성물은 콩 또는 탈지콩 발효 조성물, 해동피 발효 조성물, 인삼 발효 조성물, 및 더덕 발효 조성물로 이루어진 군으로부터 선택되는 치매의 예방 또는 치료용 조성물.

[청구항 16]

제14항 또는 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 치매의 예방 또는 치료용 조성물.



미생물 일반 기탁 번호 통지서

제 2012-40호	
2012년 7월 9일 제 2012-40 호로 귀하가 일련기탁 신청한 미생물에 대하여, 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 일반 기탁번호를 통지합니다.	
다 음	
1. 기탁미생물 명칭	<i>Lactobacillus curvatus</i> C3
2. 동제시 미생물 명칭	
3. 미생물 기탁번호	KCCM 43009
4. 기탁 일자	2012년 7월 9일

◇ 상기 미생물을 생물학, 산업적 용도로 국내 및 국외 모든 연구자에게 제공없이 분양이 가능합니다.

한국미생물보존센터(장)



경희대학교 김 동 현 귀하

(GD-form2)

【제출함】



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To: Kim, Young Jin
Office of University-Industry Cooperation,
Kyung Hee University,
1 Hocgi-dong, Dongdaemun-gu,
Seoul 130-701, Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Lactobacillus pentosus</i> var. <i>plantarum</i> C29	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM11291P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on July. 09, 2012. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong Seodaemun-gu SEOUL 120-091 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: July. 09, 2012.

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

Form BP/4

Sole page

한국문화유산재단

KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

Seodaemun-gu, Seoul 120-091, Korea Tel: 82-2-620-0000, 620-0000 Fax: 82-2-620-0000, 620-0000 E-mail: kccm@kccm.or.kr

특허절차상 미생물 기탁의 국제적 인정에 관한 부다페스트 조약

국제 양식

하기 국제 기탁 기관에 의해 규칙 제 7.1 조에 따라 발행된
원기탁의 수탁증

수신인: 김 영 진
대한민국 서울시 동대문구 회기동 1
경희대학교 산학협력단 (130-701)

I. 미생물의 동정	
기탁자에 의한 동정명: 락토바실러스 케토티스 변종 풀란타룸 C29	국제 기탁 기관에 의한 수탁번호: KCCM11291P
II. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학상의 위치	
상기 I에 동정된 미생물에 하기가 정부립: [] 과학적 설명 [] 제안된 분류학상의 위치	
III. 수리 및 승인	
본 국제 기탁 기관은 2012년 7월 9일자 수리된 상기 I에 동정된 미생물을 승인한다.	
V. 국제 기탁 기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제1동 361-221 유림빌딩 (120-091)	국제 기탁 기관을 대표하는 권한을 가진 자의 서명: 날짜: 2012년 7월 9일

양식 B/1

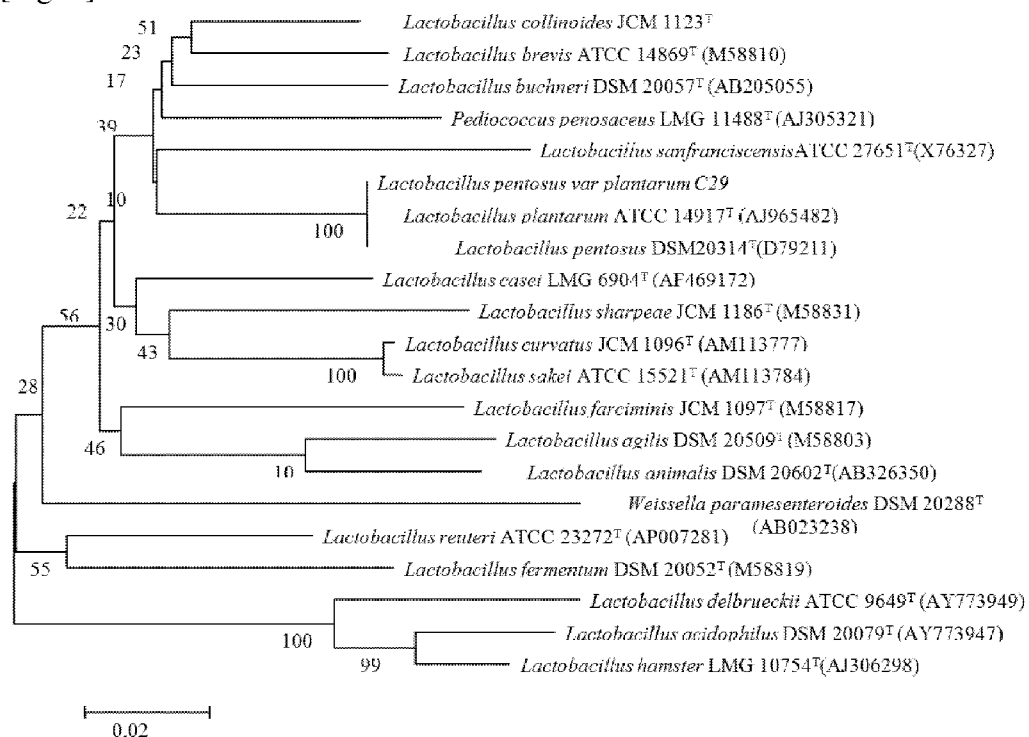
[Fig. 1]

[C-29 16S rDNA sequence (1428bp)]

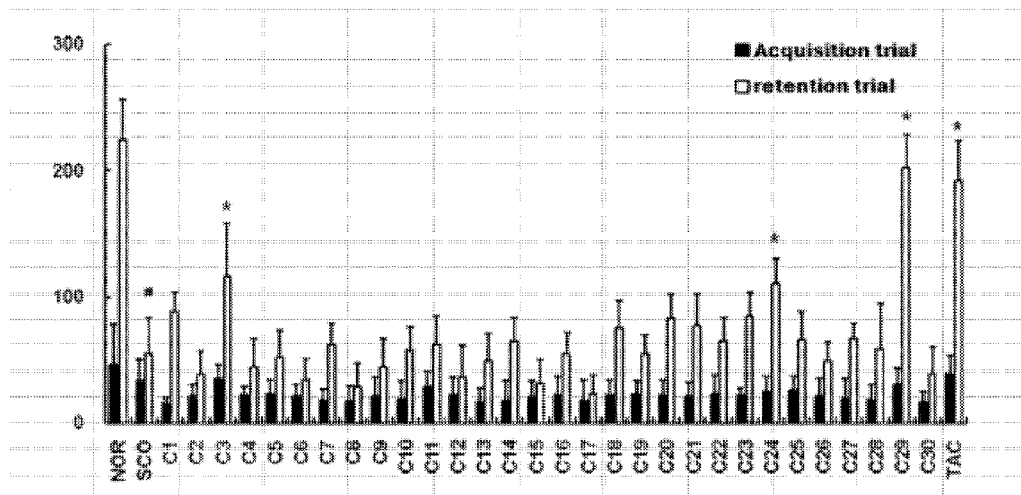
Lactobacillus pentosus strain L35 16S ribosomal RNA gene 1427/1428bp] homology (99.98%)*Lactobacillus plantarum* strain BIM B-536 16S ribosomal RNA gene 1427/1428 homology (99.98%)

ACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGGTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACA
 CGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGGAT AACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTGG
 ACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC GCGBCGTATTAGCTAGA
 TGSTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCACATTTGGGAC
 TGAGACACGGCCC AAACCTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAATGGACGAAAAGTCTGATG
 GAGCAACGCGCGGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA
 GAGTAACTGTTCAAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AATAAGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCCGGATTATTGGGGTAAAGCGAGCGCAGGC GGTTTTTAAAGTCTG
 ATGTGAAAGCGCTTCGGCTCAACC GAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAGAGGACA
 GTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCT
 GGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATAC
 CGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGGCTTCAGTGTGCAAGCTAACGCAATTAGGCAATCC
 GGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC AAGCGGTGGAGC
 ATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGC GAAGAACC TTACCAGGCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATT
 GACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCAGCTC GTGTCGTGABATGTTGGT
 TAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTGGGC ACTCTGGTGAGACTGCC
 GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGT
 GCTACAAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTC
 GGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
 AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGG
 GTAACCTTTTAGGAAC CAGCCGCT

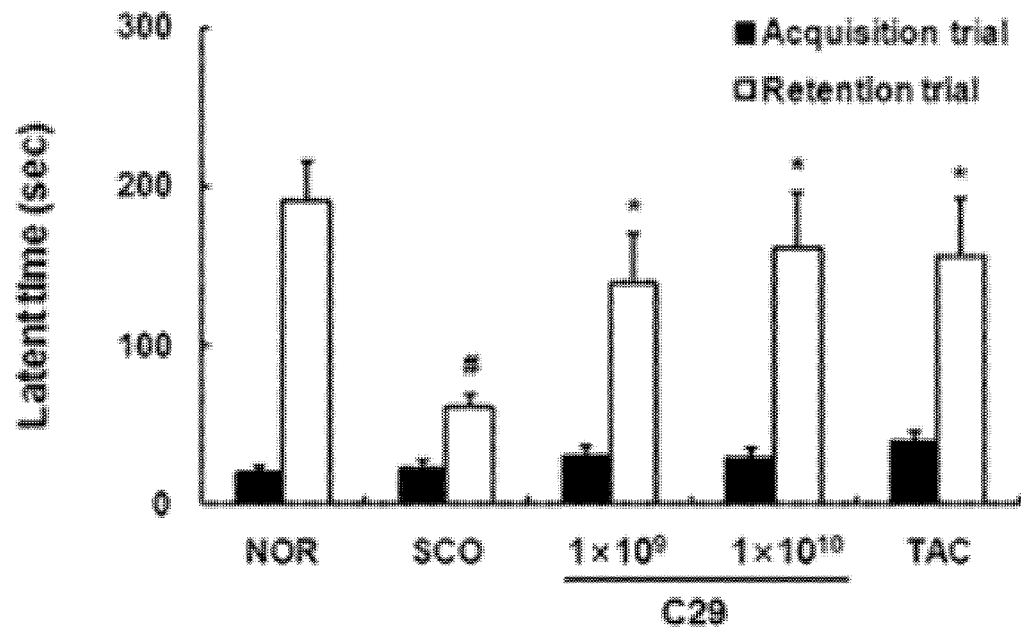
[Fig. 2]



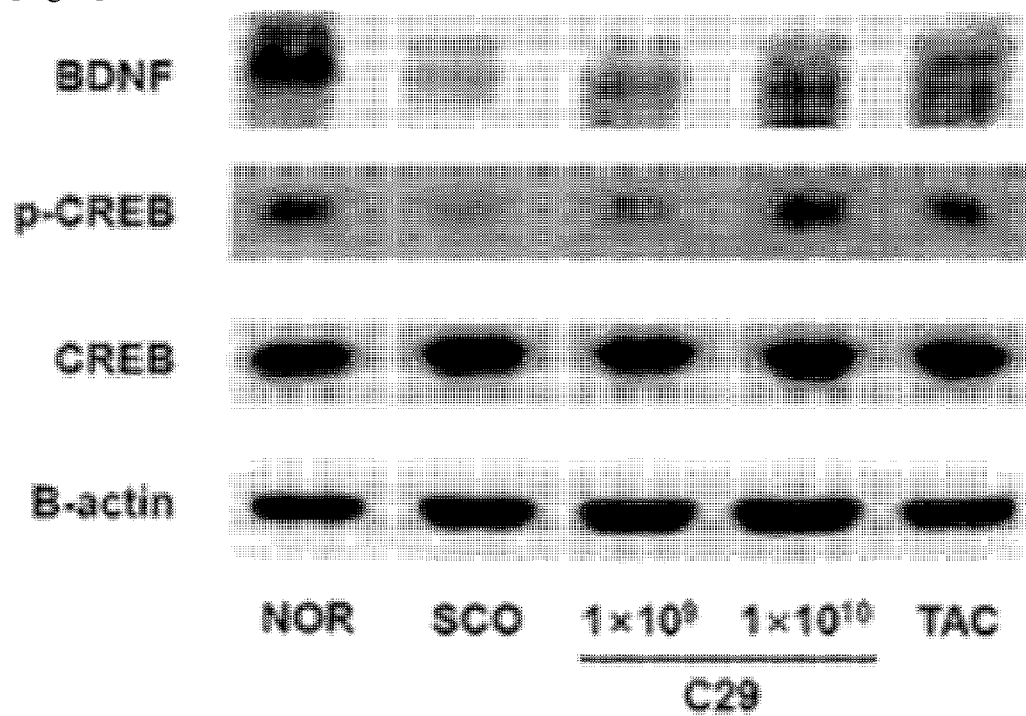
[Fig. 3]



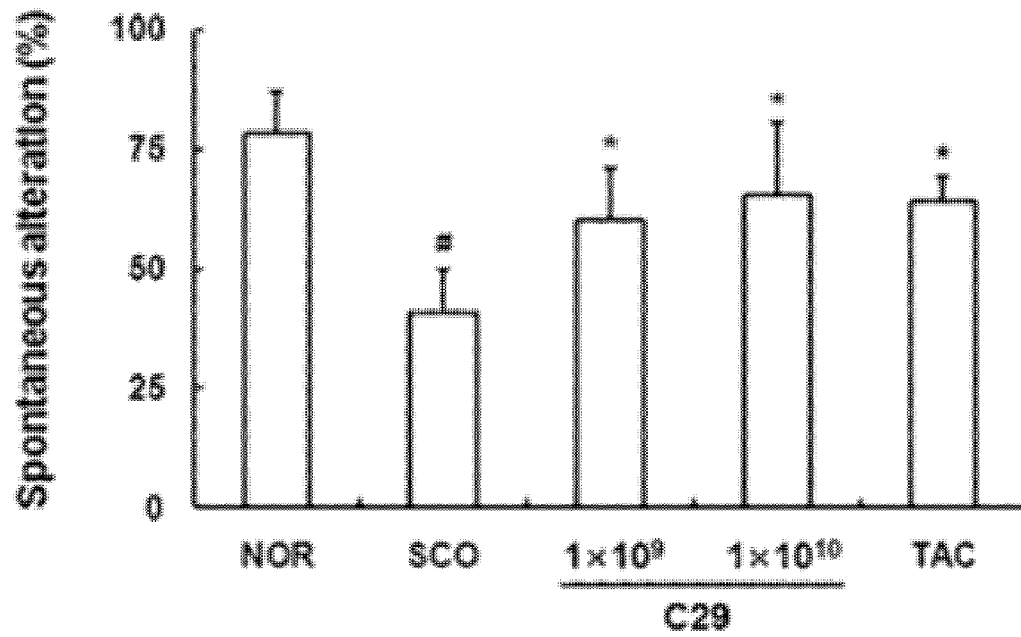
[Fig. 4]



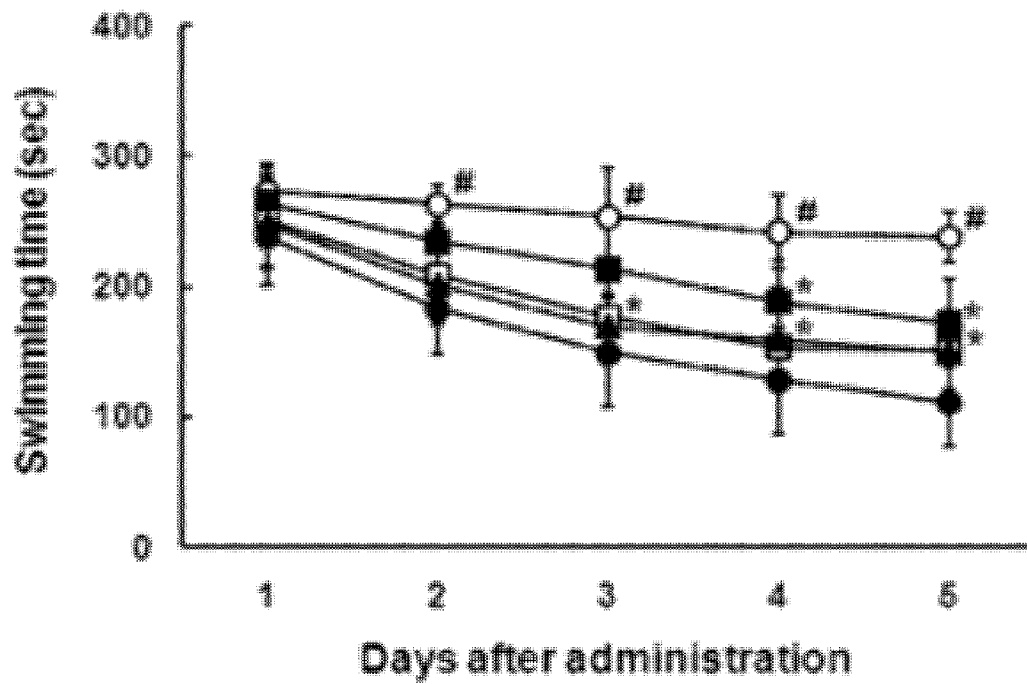
[Fig. 5]



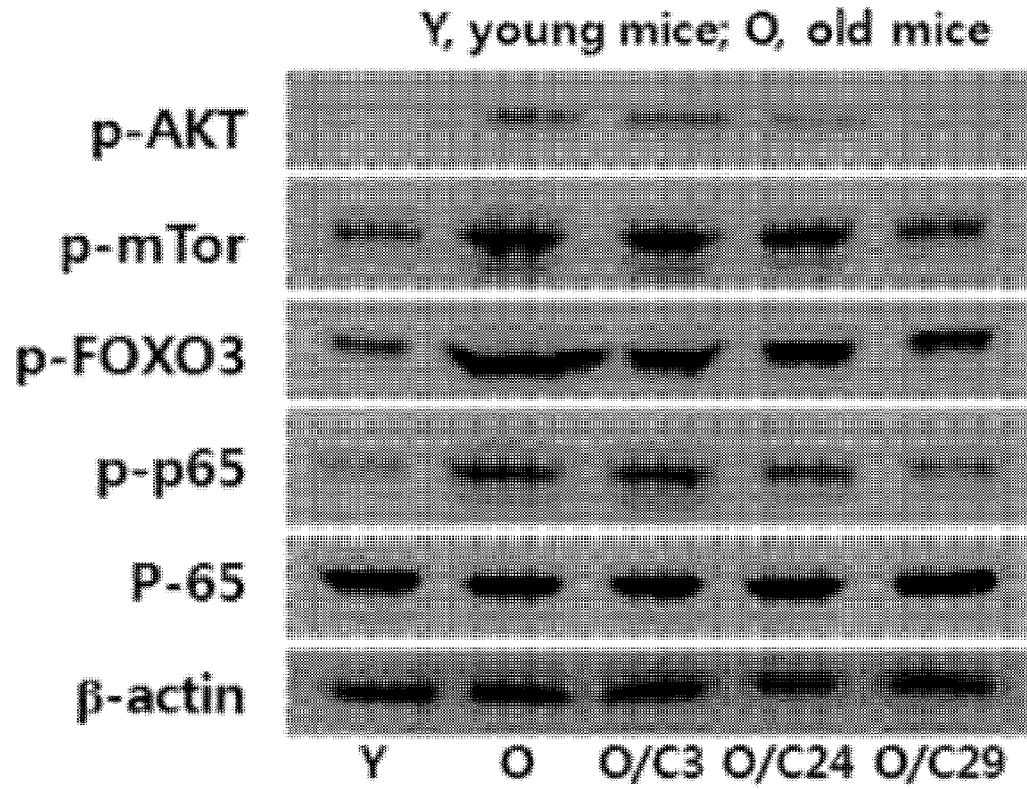
[Fig. 6]



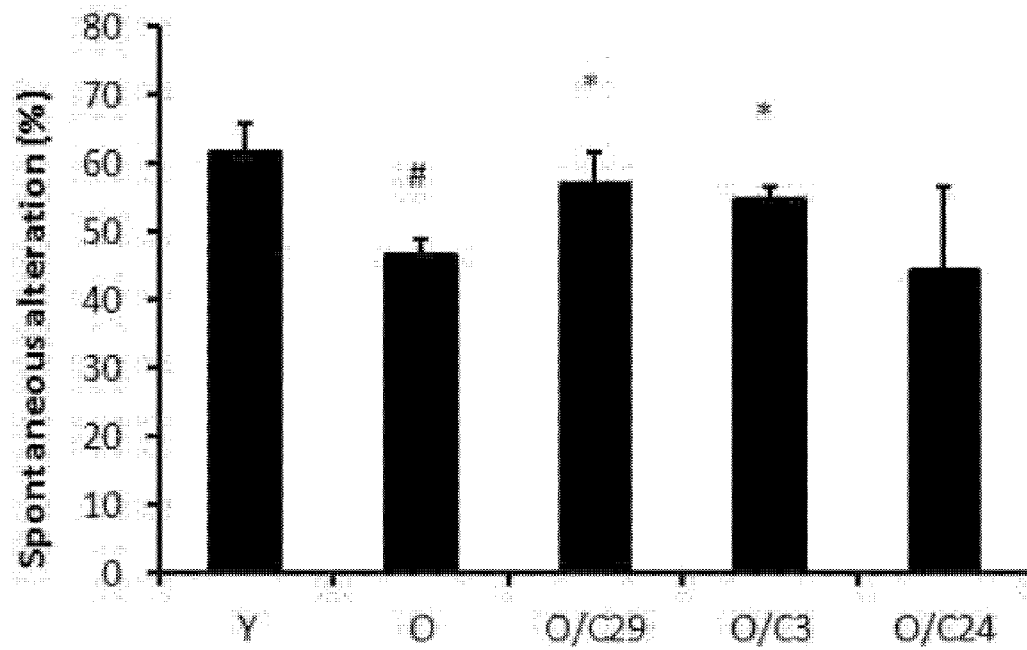
[Fig. 7]



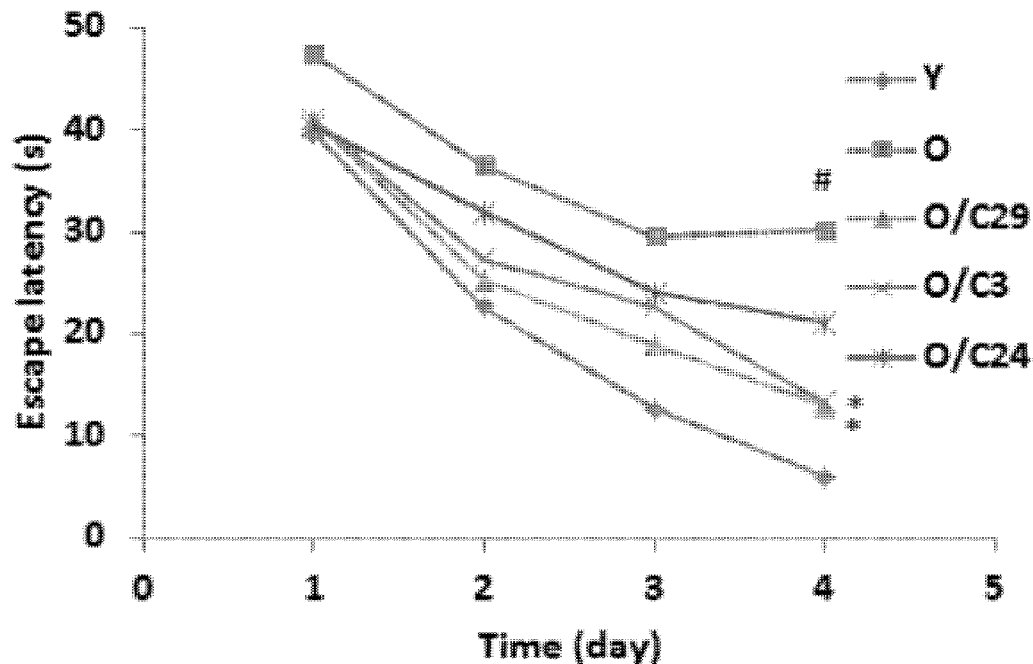
[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]



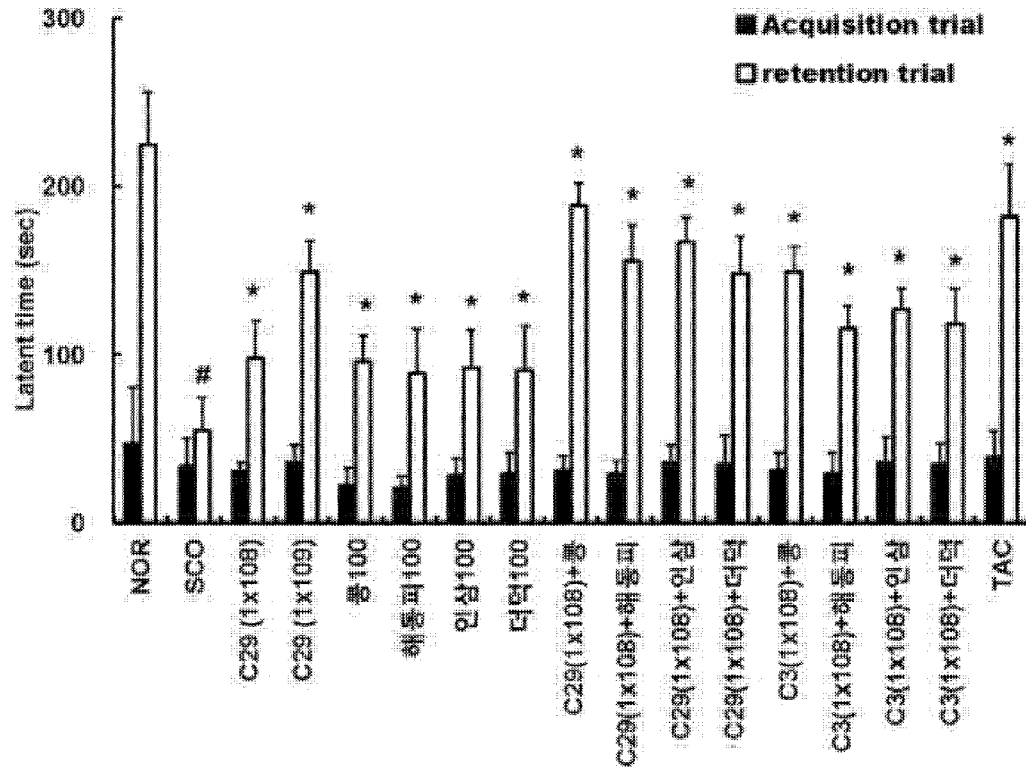
[Fig. 11]

[C3 sequence (893bp)]

Lactobacillus curvatus gene for 16S rRNA 864/866bp homology (99%)

AGTCGTAACAAAGGTAACCGTAGAAGTCTTGATTGGATAACATTTGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACG
 TGGGTAACCTGCCCCCTAAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTATACCGCATAAACCTAGCACCGCA
 TGGTGCAAGGTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTAGGATGGACCCCGCGGTGCATTAGT TAGTTGGTGAGG
 TAAAGGCTCACCAAGACCGTGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
 CGTGAGTGAAAGAAAGTTTTCGGATCGTAAACCTCTGTGTGTGGAGAAAGAACGTATTTGATAGTAACTGATCAG
 GTAGTGACGGSTATCCAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
 GCGTTGTCCGGATTATTTGGGCGTAAAGC GAGCGCAGGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTC
 AACCGAAGAAGTGTCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAAGAAAGAGGACA GTGGAACTCCATGTGTAGCGG
 TGAAATGCGTAGATATATGGAAAGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTC
 GAAAGCATGGGTAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTGGA
 GGGTTTCGGCCTTCAGTGCCGCAAGCTAACGCATTAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCCGC

[Fig. 12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/007410**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 1/20(2006.01)i, A61K 35/74(2006.01)i, A23L 1/29(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20; A61K 36/07; A61K 8/99; A61K 36/61; A61K 35/74; A61P 25/28; A61K 39/07; A23L 1/30; A61K 8/19; A23L 1/29

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: lactobacillus pentosus, antioxidant, anti-aging, dementia, pharmaceutical composition, health functional food

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2007-0055372 A (JEJU TECHNOPARK etc.) 30 May 2007 See the entire document	1-16
A	KR 10-2011-0057550 A (ILDONG PHARM CO.,LTD.) 01 June 2011 See the entire document	1-16
A	WO 2011-078781 A1 (PROBI AB etc.) 30 June 2011 See the entire document	1-16
A	KR 10-2007-0070153 A (L'OREAL etc.) 03 July 2007 See the entire document	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 DECEMBER 2013 (11.12.2013)

Date of mailing of the international search report

11 DECEMBER 2013 (11.12.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/007410

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2007-0055372 A	30/05/2007	KR 10-0847104 B1	18/07/2008
KR 10-2011-0057550 A	01/06/2011	NONE	
WO 2011-078781 A1	30/06/2011	AU 2010-334993 A1	21/06/2012
		CA 2784723 A1	30/06/2011
		CN 102770155 A	07/11/2012
		EP 2515937 A1	31/10/2012
		JP 2013-515051 A	02/05/2013
		KR 10-2012-0107106 A	28/09/2012
		MX 2012007240 A	15/10/2012
		US 2012-0301451 A1	29/11/2012
KR 10-2007-0070153 A	03/07/2007	AU 2005-257033 A1	05/01/2006
		AU 2005-257033 B2	12/05/2011
		CA 2510308 A1	23/12/2005
		CA 2510308 C	21/02/2012
		CN 1712022 A	28/12/2005
		CN 1712022 B	15/02/2012
		CN 1712022 C0	28/12/2005
		EP 1609463 A1	28/12/2005
		EP 1609463 B1	18/05/2011
		JP 2008-503563 A	07/02/2008
		US 2006-0008453 A1	12/01/2006
		US 7651680 B2	26/01/2010
		WO 2006-000992 A1	05/01/2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 1/20(2006.01)i, A61K 35/74(2006.01)i, A23L 1/29(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 1/20; A61K 36/07; A61K 8/99; A61K 36/61; A61K 35/74; A61P 25/28; A61K 39/07; A23L 1/30; A61K 8/19; A23L 1/29

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 락토바실러스 펜토서스, 향산화, 항노화, 치매, 약학조성물, 건강기능식품

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2007-0055372 A (재단법인 제주하이테크산업진흥원 등) 2007.05.30 전체 문헌 참조	1-16
A	KR 10-2011-0057550 A (일동제약주식회사) 2011.06.01 전체 문헌 참조	1-16
A	WO 2011-078781 A1 (PROBI AB 등) 2011.06.30 전체 문헌 참조	1-16
A	KR 10-2007-0070153 A (로레알 등) 2007.07.03 전체 문헌 참조	1-16

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 12월 11일 (11.12.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 12월 11일 (11.12.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



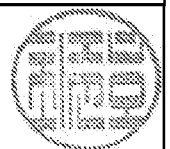
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

최준호

전화번호 +82-42-481-5569



국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2013/007410

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2007-0055372 A	2007/05/30	KR 10-0847104 B1	2008/07/18
KR 10-2011-0057550 A	2011/06/01	없음	
WO 2011-078781 A1	2011/06/30	AU 2010-334993 A1	2012/06/21
		CA 2784723 A1	2011/06/30
		CN 102770155 A	2012/11/07
		EP 2515937 A1	2012/10/31
		JP 2013-515051 A	2013/05/02
		KR 10-2012-0107106 A	2012/09/28
		MX 2012007240 A	2012/10/15
		US 2012-0301451 A1	2012/11/29
KR 10-2007-0070153 A	2007/07/03	AU 2005-257033 A1	2006/01/05
		AU 2005-257033 B2	2011/05/12
		CA 2510308 A1	2005/12/23
		CA 2510308 C	2012/02/21
		CN 1712022 A	2005/12/28
		CN 1712022 B	2012/02/15
		CN 1712022 C0	2005/12/28
		EP 1609463 A1	2005/12/28
		EP 1609463 B1	2011/05/18
		JP 2008-503563 A	2008/02/07
		US 2006-0008453 A1	2006/01/12
		US 7651680 B2	2010/01/26
		WO 2006-000992 A1	2006/01/05



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104781390 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201380044004. 3

(22) 申请日 2013. 08. 16

(30) 优先权数据

10-2012-0089714 2012. 08. 16 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 02. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2013/007410 2013. 08. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/027864 KO 2014. 02. 20

(83) 生物保藏信息

KCCM43009 2012. 07. 09

KCCM11291P 2012. 07. 09

(71) 申请人 庆熙大学校产学协力团

地址 韩国京畿道龙仁市

(72) 发明人 金东炫 韩明珠 郑一勋 郑明娥

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 吕琳 刘明海

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

A61K 35/747(2015. 01)

A61P 39/06(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

A23L 1/29(2006. 01)

C12R 1/25(2006. 01)

权利要求书4页 说明书18页

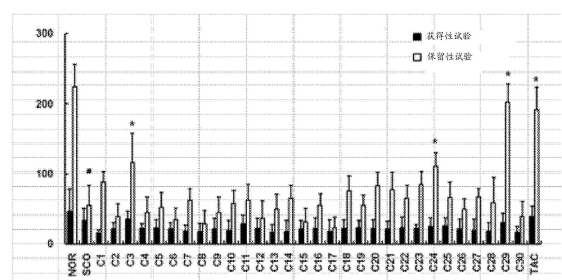
序列表2页 附图7页

(54) 发明名称

具有对衰老及痴呆的预防和 / 或治疗活性的
乳酸菌

(57) 摘要

本发明提供一种具有抗氧化及抗衰老功能和改善痴呆效果的新型的乳酸菌,更具体而言,提供戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29KCCM11291P 和弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*) C3KCCM43009。并且,本发明提供含有戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 或弯曲乳杆菌 C3 作为有效成分的抗氧化及抗衰老的药用组合物和保健功能食品;以及含有戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 或弯曲乳杆菌 C3 作为有效成分的痴呆的预防或治疗用组合物和痴呆的预防或改善用保健功能食品。此外,本发明提供含有戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 或弯曲乳杆菌 C3 菌株进行发酵的发酵组合物作为有效成分的痴呆的预防或治疗用组合物。



1. 一种戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29KCCM11291P。
2. 一种抗氧化及抗衰老的药用组合物,其包含戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29KCCM11291P 菌株作为有效成分。
3. 一种痴呆的预防或治疗用的药用组合物,其包含戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29KCCM11291P 菌株作为有效成分。
4. 一种具有抗氧化及抗衰老效果的保健功能食品,其包含戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29KCCM11291P 菌株作为有效成分。
5. 一种痴呆的预防或改善用保健功能食品,其包含戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29KCCM11291P 菌株作为有效成分。
6. 根据权利要求 3 所述的药用组合物,其中,
痴呆选自老年性痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞叶痴呆、帕金森氏病性痴呆、亨廷顿氏病性痴呆、正常颅压脑积水症引起的痴呆、头部外伤引起的痴呆、物质引起的痴呆等构成的组。
7. 根据权利要求 5 所述的保健功能食品,其中,
痴呆选自老年性痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞叶痴呆、帕金森氏病性痴呆、亨廷顿氏病性痴呆、正常颅压脑积水症引起的痴呆、头部外伤引起的痴呆、物质引起的痴呆等构成的组。
8. 一种抗氧化及抗衰老的药用组合物,其包含弯曲乳杆菌 C3KCCM43009 菌株作为有效成分。
9. 一种痴呆的预防或治疗用的药用组合物,其包含弯曲乳杆菌 C3KCCM43009 菌株作为有效成分。
10. 一种具有抗氧化及抗衰老效果的保健功能食品,其包含弯曲乳杆菌 C3KCCM43009 菌株作为有效成分。
11. 一种痴呆的预防或改善用的保健功能食品,其包含弯曲乳杆菌 C3KCCM43009 菌株作为有效成分。
12. 根据权利要求 9 所述的药用组合物,其中,
痴呆选自老年性痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞叶痴呆、帕金森氏病性痴呆、亨廷顿氏病性痴呆、正常颅压脑积水症引起的痴呆、头部外伤引起的痴呆、物质引起的痴呆等构成的组。
13. 根据权利要求 11 所述的保健功能食品,其中,
痴呆选自老年性痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞叶痴呆、帕金森氏病性痴呆、亨廷顿氏病性痴呆、正常颅压脑积水症引起的痴呆、头部外伤引起的痴呆、物质引起的痴呆等构成的组。
14. 一种痴呆的预防或治疗用组合物,其包含用戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29KCCM11291P 菌株或弯曲乳杆菌 C3KCCM43009 菌株进行发酵的发酵组合物作为有效成分。
15. 根据权利要求 14 所述的痴呆的预防或治疗用组合物,其中,
所述发酵组合物选自大豆或脱脂大豆发酵组合物、海桐皮发酵组合物、人参发酵组合物及党参发酵组合物构成的组。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的痴呆的预防或治疗用组合物, 其中,

痴呆选自老年性痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞叶痴呆、帕金森氏病性痴呆、亨廷顿氏病性痴呆、正常颅压脑积水症引起的痴呆、头部外伤引起的痴呆、物质引起的痴呆等构成的组。



微生物普通保藏号通知书

第2012-40号	
2012年7月9日, 受理了阁下于第2012-40号进行的普通保藏申请的微生物, 并颁发以下保藏号	
下面	
1. 保藏微生物名称	弯曲乳杆菌 03
2. 登记微生物名称	
3. 微生物保藏号	KCCM 43009
4. 保藏日期	2012年7月9日

○ 所述微生物会对所有国内和国外的研究人员在学术产业用途没有预售限制

韩国微生物保藏中心



庆熙大学 金东贤 阁下

IGD-form2

(再发行)

한국화학연구원
Korea Research Institute of Chemical Technology
P.O. Box 107, Yusong, Taejeon 305-380, Korea
Tel: +82-41-9700-2100 Fax: +82-41-9700-2101 E-mail: kRICT@kRICT.ac.kr
www.kRICT.ac.kr
KRICT is a member of the Korea Research Network (KRN) and the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To: Kim, Young Jin
Office of University-Industry Cooperation,
Kyung Hee University,
1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu,
Seoul 130-701, Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Lactobacillus pentosus</i> var. <i>plantarum</i> C29	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCMI1291P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on July. 09. 2012. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : 361-221, Yurin B/D Hongje-1-dong Seodaeun-gu SEOUL 120-081 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: July. 09. 2012.

¹ Where Rule 64(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

Form HP/4

Sole page

한국미생물보존센터

120-081 서울지 사대우 아파트 361-221 유린동, 서울특별시 서대문구 홍제1동, 서울특별시 서대문구 홍제1동, 서울특별시 서대문구 홍제1동

KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

120-081 Seoul, Korea, 361-221 Hongje-bong, Seodaemun-gu, Seoul 120-081, Korea. Tel: 82-2-312-3456, Fax: 82-2-312-3457, E-mail: kccmi@kccmi.or.kr

关于专利程序上微生物保藏的国际认证的布达佩斯条约
国际格式

通过下列国际保藏机构按照规则第7.1条所发行的
原保藏的保藏证明

收件人：金永镇
大韩民国首尔市东大门区回基洞1
庆熙大学校 产学协力团 (130-701)

I 微生物的鉴定	
受委托者的鉴定名称： 戊糖乳杆菌变种植物乳 杆菌C29	由国际保藏机构的保藏号： KCCM11291P
II 科学说明和/或已提出的分类学上的位置	
由所述 I 鉴定的微生物上附着下列： ☐ 科学说明 ☐ 已提出的分类学上的位置	
III. 受理及承认	
本国际保藏机关承认在2012年7月9日受理的上述 I 鉴定的微生物。	
V 国际保藏机关	
名称：韩国微生物保藏中心 地址：大韩民国首尔市西大 门区弘济一洞361-221儒林 大楼 (120-091)	有权代表国际保藏机构人的 签名： 日期：2012年7月9日

格式BP/1

具有对衰老及痴呆的预防和 / 或治疗活性的乳酸菌

技术领域

[0001] 本发明涉及一种从泡菜中分离出的新型的乳酸菌。更具体而言,本发明涉及一种具有衰老及痴呆的预防和 / 或治疗活性的新型戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29 和弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*) C3。

背景技术

[0002] 现代社会正快速进入高龄化社会,因此如何延缓衰老过程是重要的保健课题之一。对于韩国而言,在 2010 年 65 岁以上的人口占 11.3%,且预计到 2050 年会激增至 37.3%。预计在如此的高龄化社会的疾病发病率将会上升,且由此将支出巨大的医疗费用,同时预计痴呆等老年疾病的激增会成为社会问题。

[0003] 衰老过程受到遗传、环境、以及生活方式的多种作用的影响,并伴随着各种形态以及生物化学的变化,尤其是,氧化应激的增加和炎症反应的增加被认为是促进衰老的主要原因。氧化应激是由反应性强的氧自由基 (ROS, reactive oxygen species) 的产生增加或体内抗氧化防御机制的减少而引起,其结果是破坏 DNA 等的生物高分子并诱发细胞损伤而促进衰老,提高痴呆在内的神经退化性疾病、癌、心血管疾病等的衰老疾病的危险性。

[0004] 艾德勒等人 (Adler AS, Sinha S, Kawahara TL, Zhang JY, Segal E, Chang HY. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF- κ B activity. *Genes Dev.* 2007 ;21 :3244-57) 在多个人体组织和实验动物组织中,论证了 NF- κ B 激活基序 (motif) 和调节衰老过程的单元的相关性,从而论证了由 NF- κ B 介导的炎症反应和衰老过程有很密切地关系。此外,已知衰老会激活 PI3K/AKT,其由于会磷酸化 FOXO3,无法抑制 ROS 的生成,使得引起基因突变等。

[0005] 衰老疾病之一的痴呆由脑部慢性或渐进性疾病引起,其中脑组织的退化、变性及衰老中枢神经系统的感染 (神经梅毒,结核性脑膜炎,病毒性脑炎等)、脑梗塞、脑损伤、毒性代谢障碍、神经系统疾病 (帕金森氏病) 等被认为是引起痴呆的主要原因。痴呆有阿尔茨海默型痴呆 (Alzheimer's disease)、血管性痴呆和其它混合型痴呆,韩国 65 岁以上的老年痴呆患者中 50%~60% 是阿尔茨海默型痴呆,15%~30% 是血管性痴呆,而其余 10%~15% 是这两种疾病的混合型。脑中的代谢废物的 β -淀粉样蛋白 (A β) 被认为是阿尔茨海默型痴呆发病的主要原因,为了治疗阿尔茨海默型痴呆尝试过将很多药物用作治疗剂,但目前还没有论证显著效果的药物。乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase) 的抑制剂被作为唯一的治疗剂而使用,其中乙酰胆碱酯酶作用于阿尔茨海默型痴呆患者所缺乏的重要的脑神经递质之一的乙酰胆碱 (acetylcholine)。但众所周知的是,这种药物只能使部分认知功能好转,而对于阿尔茨海默氏病的进展完全没有作用,因此要求开发有效的用于痴呆预防或治疗的制剂的开发。

[0006] 另一方面,乳酸菌已经使用了很长时间,且报告为具有肠调节作用、抗癌效果、免疫增强效果等的有益效果。为此本发明人为了能够找到对衰老和痴呆具有有益效果的乳酸

菌而研究的结果,发现从泡菜分离出的新型的乳酸菌对衰老和痴呆具有预防或治疗效果,从而完成了本发明。

发明内容

本发明要解决的技术问题

[0007] 本发明的所要解决的技术问题在于,提供对衰老和痴呆具有预防或治疗效果的乳酸菌。

[0008] 此外,本发明所要解决的技术问题还在于,提供含有所述乳酸菌的抗氧化及抗衰老的组合物和痴呆的预防或治疗用的组合物。

[0009] 并且,本发明所要解决的技术问题还在于,提供用乳酸菌进行发酵的抗氧化及抗衰老的发酵组合物和痴呆的预防或治疗用的发酵组合物。

技术方案

[0010] 为了达到如上所述的目的,本发明提供一种从泡菜分离出的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29KCCM11291P。

[0011] 此外,本发明提供含有戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 作为有效成分的抗氧化及抗衰老的药用组合物。

[0012] 并且,本发明提供含有戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 作为有效成分的痴呆的预防或治疗用的药用组合物。

[0013] 此外,本发明提供含有戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 作为有效成分的具有抗氧化及抗衰老效果的保健功能食品。

[0014] 并且,本发明提供含有戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 作为有效成分的痴呆的预防或改善用的保健功能食品。

[0015] 此外,本发明提供含有用戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 发酵的发酵组合物作为有效成分的抗氧化及抗衰老的组合物。

[0016] 并且,本发明提供含有用戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 发酵的发酵组合物作为有效成分的痴呆的预防或治疗用的组合物。

[0017] 此外,本发明提供从泡菜分离出的弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*) C3KCCM43009。

[0018] 并且,本发明提供含有弯曲乳杆菌 C3 作为有效成分的抗氧化及抗衰老的药用组合物。

[0019] 此外,本发明提供含有弯曲乳杆菌 C3 作为有效成分的痴呆的预防或治疗用的药用组合物。

[0020] 并且,本发明提供含有弯曲乳杆菌 C3 作为有效成分的具有抗氧化及抗衰老效果的保健功能食品。

[0021] 此外,本发明提供含有弯曲乳杆菌 C3 作为有效成分的痴呆的预防或改善用的保健功能食品。

[0022] 并且,本发明提供含有用弯曲乳杆菌 C3 发酵的发酵组合物作为有效成分的抗氧化及抗衰老的组合物。

[0023] 此外,本发明提供含有用弯曲乳杆菌 C3 发酵的发酵组合物作为有效成分的痴呆

的预防或治疗用的组合物。

[0024] 以下,将对本发明进行更详细地说明。

[0025] 本发明的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 和弯曲乳杆菌 C3 是从泡菜分离出的新型的微生物。

[0026] 在基于 16s rDNA 碱基序列的分子系统分类学和生化特性分析中,本发明的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 属于乳酸菌菌株,其被鉴定为是与戊糖乳杆菌和植物乳杆菌均具有高的分子系统学亲缘关系(유연관계)的菌株,但其生化特性更类似于戊糖乳杆菌,因此被命名为戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29。2012 年 7 月 9 日,将其委托给作为国际保藏机构的韩国微生物保藏中心进行了保藏,其保藏号为 KCCM11291P。

[0027] 此外,在基于 16s rDNA 碱基序列的分子系统分类学分析中,本发明的弯曲乳杆菌 C3 属于乳酸菌菌株,其被认定为是属于弯曲乳杆菌的菌株,因此被命名为弯曲乳杆菌 C3。2012 年 7 月 9 日,将其委托给国际保藏机关韩国微生物保藏中心进行了保藏,其保藏号为 KCCM43009。

[0028] 对于本发明的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29(以下也简称为“C29”)和弯曲乳杆菌 C3(以下也简称为“C3”)而言,在利用阿尔茨海默氏病的动物模型小鼠的被动回避反应试验中,确认了通过摄入 C29 菌株或 C3 菌株能够改善小鼠记忆的效果,且也确认了 C29 菌株在 Y 型迷宫试验和水迷宫试验中也具有改善记忆的效果,从而论证了痴呆的预防和治疗效果(参照实施例 2)。

[0029] 对于本发明,痴呆是指由各种原因脑功能破损的同时,记忆力、语言能力、判断力等认知功能较之前持续且整体性退化,从而对日常生活产生影响的状态;其包括:老年性痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞叶痴呆、帕金森氏病性痴呆、亨廷顿氏病性痴呆、正常颅压脑积水症引起的痴呆、头部外伤引起的痴呆、物质引起的痴呆等。

[0030] 并且,给 16 个月大的小鼠给予 C29 菌株或 C3 菌株 3 个月后,测定脂质过氧化物、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase)活性、过氧化氢酶(Catalase)活性和谷胱甘肽浓度的结果,发现相比于给予 3 个月生理盐水的 16 个月大的小鼠表现出显著优异的抗氧化效果,并表现出衰老相关的基因的表达减少,从而论证了抗氧化和抗衰老的效果(参照表 6 和实施例 3)。

[0031] 由此确认了本发明的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 和弯曲乳杆菌 C3 是对痴呆和衰老的预防和治疗具有优异效果的菌株。

[0032] 本发明的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 的形态特征和生理学特征、蔗糖发酵分析结果、以及细胞脂肪酸组成,分别在以下表 1、表 2 和表 3 中,与已知的植物乳杆菌(*L. plantarum*)ATCC 14917 和戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)DSM20314 的特性一同表示。

[0033] [表 1]

[0034] 菌株 C29、植物乳杆菌 ATCC14917 和戊糖乳杆菌 DSM20314 的形态特征和生理学特征。

特征	菌株 C29	植物乳杆菌	戊糖乳杆菌
		ATCC 14917 TM	DSM20314 TM

形态特征			
细胞形态	杆状 (Rod)	杆状	杆状
革兰氏染色	阳性	阳性	阳性
细胞大小 (μm)	1-1.2×2.2-2.6	0.4-0.6×0.8-2	0.8-1×2-6
生理学特征			
吲哚生成	-	-	-
葡萄糖的气体生成	-	-	-
氧化氢酶	-	-	-
氧化酶	-	-	-
MRS 培养基中的生长			
10°C	+	+	+
15°C	+	+	+
45°C	+	-	-
各种 PH 值下的生长			
PH3	+	-	-
PH5	+	+	+
PH7	+	+	+
NaCl 中的生长			
6%	+	+	+
8%	+	+	+
10%	-	-	-
胃液中的稳定性	稳定	不稳定	不稳定
肠液中的稳定性	稳定	不稳定	不稳定
G+C (mol%)	50.7	44.1 ^θ	46.1 ^θ

[0035] + :阳性反应 ; - :阴性反应。

[0036] a :Zanoni, P. , Farrow, J. A. E. , Phillips, B. A. , Collins, M. D. (1987) *Lactobacillus pentosus* (fred, peterson, and anderson) sp. Nov. , norn, rev. Int J Syst Bacteriol 37, 339-341 中获得。

[0037] [表 2]

[0038] 利用 API 20E 和 API 50CHL 的乳酸菌的蔗糖发酵分析。

	菌株	植物乳杆菌 ^a	戊糖乳杆菌 ^b
	C29	ATCC 14917 TM	DSM20314 TM
API 20E			
ONPG	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	-	-	-
ADH	-	-	-
LDC	-	-	-
ODC	-	-	-
URE	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
VP	+	+	+
API 50CHL			
甘油	-	-	+
L-阿拉伯糖	+	+	+
D-核糖	+	+	+
D-木糖	-	-	+
福寿草醇	-	-	-
D-半乳糖	+	+	+
D-葡萄糖	+	+	+
D-果糖	+	+	+
D-甘露糖	+	+	+
L-鼠李糖	+	-	D
半乳糖醇	-	-	D

甘露醇	+	+	+
山梨糖醇	+	+	+
α -甲基-D-甘露糖苷	+	+	-
α -甲基-D-葡萄糖苷	-	-	D
N-乙酰-	+	+	+
葡萄糖胺			
苦杏仁甙	+	+	+
熊果苷	+	+	+
秦皮甲素	+	+	+
水杨苷	+	+	+
纤维二糖	+	+	+
麦芽糖	+	+	+
乳糖	+	+	+
蜜二糖	+	+	+
蔗糖	+	+	+
海藻糖	+	+	+
菊粉	+	-	-
松三糖	+	+	D
棉子糖	+	+	+
龙胆二糖	+	+	+
D-松二糖	+	+	D
D-阿拉伯糖醇	-	+	D
葡萄糖酸盐	+	-	+

[0039] + :阳性反应 ; - :阴性反应 ; D :可变反应。

[0040] 所述 3 种乳酸菌中任一种都未发酵 2- 酮基葡萄糖酸盐, 5- 酮基葡萄糖酸盐, 赤藓糖醇, D- 阿拉伯糖, L- 木糖, β - 甲基 -D- 木糖苷, L- 山梨糖, 肌醇, 糖原, 木糖醇, D- 米苏糖, D- 塔格糖, D- 岩藻糖, L- 岩藻糖, L- 阿拉伯糖醇。

[0041] a :Van Reenen, C. A. , Dicks, L. M. (1996)Evaluation of numerical analysis

of random amplified polymorphic DNA(rapd)-pcr as a method to differentiate lactobacillus plantamm and lactobacillus pentosus.Curr Microbiol 32,183-187 中获得。

[0042] b :Zanoni, P., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Collins, M. D. (1987) Lactobacillus pentosus(fred, peterson, and anderson) sp. Nov., nom, rev. Int J Syst Bacteriol 37,339-341 中获得。

[0043] [表 3]

[0044] 菌株 C29、植物乳杆菌 ATCC14917 和戊糖乳杆菌 DSM20314 的细胞脂肪酸组成。

脂肪酸	菌株 C29	植物乳杆菌 ^a ATCC 14917 TM	戊糖乳杆菌 ^a DSM20314 TM
饱和脂肪酸			
C _{12:0}	1.1	T	T
C _{14:0}	3.9	4.1	3.9
C _{16:0}	45.5	34.1	20.8
C _{18:0}	5.0	3.3	4.3
不饱和脂肪酸			
C _{16:1} ω 7c	8.7	3.9	5.6
C _{18:1} ω 7c	25.5	27.2	45.1
支链脂肪酸			
C _{19:0} cyclo ω 8c	10.1	8.7	5.7

[0045] T :小于 1% 的微量的酸。

[0046] a : 植 物 乳 杆 菌 :Van Reenen, C. A., Dicks, L. M. (1996) Evaluation of numerical analysis of random amplified polymorphic DNA(rapd)-pcr as a method to differentiate lactobacillus plantarum and lactobacillus pentosus.Curr Microbiol 32,183-187 中获得。

[0047] 戊糖乳杆菌 :Zanoni, P., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Collins, M. D. (1987) Lactobacillus pentosus(fred, peterson, and anderson) sp. Nov., nom, rev. Int J Syst Bacteriol 37,339-341 中获得。

[0048] 并且,本发明的弯曲乳杆菌 C3 的形态特征和生理学特征、及蔗糖发酵分析结果,分别在以下表 4 和表 5 中,与已知的弯曲乳杆菌 ATCC 25601 的特性一同表示。

[0049] [表 4]

[0050] 菌株 C3、弯曲乳杆菌 ATCC 25601 的形态特征和生理学特征。

特征	菌株 C3	弯曲乳杆菌 ATCC 25601
形态特征		
细胞形态	杆状 (Rod)	杆状
革兰氏染色	阳性	阳性
细胞大小 (μm)	1-1.2×2.2-2.6	0.4-0.6×0.8-2
生理学特征		
吲哚生成	-	-
葡萄糖的气体生成	-	-
氧化氢酶	-	-
氧化酶	-	-
MRS 培养基中的生长		
10°C	+	+
15°C	+	+
45°C	-	-
各种 PH 值下的生长		
PH3	-	-
PH5	+	+
PH7	+	+
G+C (mol%)	41.9	

[0051] + :阳性反应 ; - :阴性反应。

[0052] [表 5]

[0053] 利用 API 20E 和 API 50CHL 的乳酸菌的蔗糖发酵分析。

	菌株 C3	弯曲乳杆菌 ATCC 25601
--	-------	------------------

API 20E		
H ₂ S	-	-
VP	+	+
API 50CHL		
L-阿拉伯糖	-	-
D-核糖	+	+
D-木糖	-	-
D-半乳糖	+	+
D-葡萄糖	+	+
D-果糖	+	+
D-甘露糖	+	+
L-鼠李糖	+	+
山梨糖醇	-	-
苦杏仁甙	-	-
秦皮甲素	+	+
水杨苷	+	+
纤维二糖	+	+
麦芽糖	+	+
乳糖	+	+
蜜二糖	-	-
蔗糖	-	-
海藻糖	-	-
松三糖	-	-
棉子糖	-	-

[0054] + :阳性反应 ; - :阴性反应。

[0055] 所述乳酸菌中任一种都未发酵 2- 酮基葡萄糖酸盐, 5- 酮基葡萄糖酸盐, 赤藓糖醇, D- 阿拉伯糖, L- 木糖, β - 甲基 -D- 木糖苷, L- 山梨糖, 肌醇, 糖原, 木糖醇, D- 米苏糖, D- 塔格糖, D- 岩藻糖, L- 岩藻糖, L- 阿拉伯糖醇。

[0056] 本发明的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 菌株和弯曲乳杆菌 C3 菌株可用于衰老和痴呆症的预防和治疗。因此,本发明提供含有戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 或弯曲乳杆菌 C3 作为有效成分的抗氧化及抗衰老的药用组合物,以及痴呆的预防或治疗用药用组合物。

[0057] 本发明的药用组合物可以经口腔(例如,服用或吸入)或非经口腔(例如,注射、经皮吸收、直肠给药)给予。注射可以是例如静脉注射、皮下注射、肌肉内注射或腹腔内注射。根据本发明的药用组合物可以由给药途径的不同而剂型化为片剂、胶囊剂、颗粒剂、细粒剂(fine subtilae)、粉剂、舌下含片、栓剂、软膏、注射剂、乳化液剂、悬浮液剂、糖浆剂、喷雾剂等。上述多种形态的根据本发明的药用组合物可利用在各剂型中通常使用的药用载体(carrier),并通过已知的技术来制造。药学上可接受的载体例子包括,赋形剂、粘合剂、崩解剂(disintegrating agent)、润滑剂、防腐剂、抗氧化剂、等渗剂(isotonic agent)、缓冲剂、被膜剂、甜味剂、溶解剂、主剂(base)、分散剂、润湿剂、悬浮剂、稳定剂、着色剂等。

[0058] 根据本发明的药用组合物含有约 0.01 ~ 100 重量%的本发明的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 菌株和弯曲乳杆菌 C3 菌株,其根据药物的形态会有所不同。

[0059] 本发明的药用组合物的具体给药量可能会根据包括人在内的被治疗的哺乳动物的种类、体重、性别、疾病的程度、医生的判断等而有所不同,但本领域的普通技术人员可以决定用于特定的用途的合适的给药量。优选,经口腔摄入时,每天对每公斤(1kg)的体重需要给予活性成份 0.001 至 500mg,非经口腔摄入时,每天对每公斤(1kg)的体重需要给予活性成份 0.01 至 200mg。更优选,每天对每公斤(1kg)的体重需要给予活性成份 100mg。所述一日总剂量可以根据疾病的程度、医生的判断等,被分为一次或者多次的方式进行给药。

[0060] 并且,本发明还提供含有 C29 菌株或 C3 菌株作为有效成分的,且具有抗氧化及抗衰老效果的保健功能食品和痴呆的预防或改善用的保健功能食品。

[0061] 对于本发明的保健功能食品的种类没有特别的限定,可以为散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、悬浮液剂、乳液剂、糖浆剂等经口腔型制剂的形态,或者可以添加于糖、饼干、口香糖、冰淇淋、面类、面包、饮料等普通食品中。

[0062] 本发明的保健功能食品根据形态的不同可以采用通常的方法适当利用填充剂、增量剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、甜味剂、芳香剂、保存剂、表面活性剂、润滑剂、赋形剂等而制备。

[0063] 对于制备所述保健功能食品而言,C29 菌株或 C3 菌株的含量约为 0.01 至 100 重量%,其根据保健功能食品的形态会有所不同。

[0064] 并且,本发明还提供含有 C29 菌株或 C3 菌株发酵的发酵组合物作为有效成分的,具有抗氧化及抗衰老效果的组合物和痴呆的预防或改善用的组合物。

[0065] 对于本发明而言,所述发酵组合物包括大豆或脱脂大豆发酵组合物,海桐皮发酵组合物,人参发酵组合物和党参发酵组合物。

[0066] 对于本发明而言,大豆或脱脂大豆粉末的水悬浮物是指在干燥的大豆或脱脂大豆粉末中按重量比添加 5 ~ 15 倍的水而悬浮使用的物质,但并不仅限于此,只要符合本发明的目的,也可以将用水浸泡的大豆磨成豆乳而完成制备后使用。

[0067] 对于本发明而言,所述海桐皮、人参和党参可以是提取物或萃取物(엑기스)的形式,优选为通过热水提取法、酒精提取法或混合提取法制备的提取物形式,但并不仅限于

此。为了提高所述提取物的提取效率,可以进行粉碎或粉末花,并通过本领域已知的常用的提取法进行提取。例如,可以使用水提取法、酒精提取法、有机溶剂提取法和超临界提取法等,优选使用水提取法,但并不仅限于此。

[0068] 所述酒精提取法而言,可以使用的提取溶剂包括甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇等碳原子数 1~6 个的低级醇等,所述有机溶剂提取法的提取溶剂可以使用丙酮、乙醚、苯、氯仿、乙酸乙酯、二氯甲烷、己烷、盐酸、乙酸、甲酸、柠檬酸、环己烷和石油醚等有机溶剂或其混合物。

[0069] 此时,对于提取时所添加的提取溶剂的比例没有特别的限定,但相比于海桐皮、人参或党参的干燥重量,可以使用 2 至 20 倍(重量基准)的提取溶剂。为了提高提取效率,相比于海桐皮、人参或党参,优选使用 5~15 倍(重量基准)的提取溶剂,并重复 2 次以上。

[0070] 此时,提取温度优选为 50 至 110℃,更加优选为 70 至 100℃。提取时间为 1 至 48 小时,优选为 2~8 小时,但提取时间根据不同的提取温度而有所不同。并且,提取时用搅拌机(shaker)搅拌可以进一步提高提取效率。

[0071] 所述萃取物可以利用减压蒸馏法或膜蒸馏法进行制备。

[0072] 对于本发明而言,在利用阿尔茨海默氏病的动物模型小鼠的被动回避反应试验中,将通过接种 C29 菌株或 C3 菌株而发酵的大豆或脱脂大豆的发酵组合物、海桐皮发酵组合物、人参发酵组合物和党参发酵组合物给予至上述动物模型小鼠后,确认了能够改善小鼠记忆的效果,从而论证了其对于痴呆的预防和治疗的效果(参照实施例 5)。

[0073] 对于本发明而言,在所述提取物中接种 C29 菌株或 C3 菌株时,为了抑制杂菌的生长,在温度 100℃条件下,加热杀菌 15 分钟至 1 小时后再使用。

[0074] 虽然所述 C29 菌株或 C3 菌株的接种量根据发酵提取物的种类的不同而有所不同,但使接种量为 1×10^8 CFU/ml 以上;而发酵温度优选为 20 至 40℃。只要符合本发明的目的,对于发酵时间并没有特别的限定,可接种 C29 菌株或 C3 菌株发酵 10~30 小时。其中,当发酵 10 小时以下时,发酵组合物未被充分制成;当发酵 30 小时以上时,由于制成过多的有机酸而具有较强的酸味,会导致口感降低,因此优选在所述的发酵时间范围内进行发酵。

[0075] 并且,对于本发明而言,根据发酵所使用的材料可以制备出多种发酵食品。作为一例,在奶粉或牛奶中接种 C29 菌株或 C3 菌株,并通过如上所述的方法进行发酵,从而可制备酸奶等乳酸菌发酵饮料。

有益效果

[0076] 本发明中确认了戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 或弯曲乳杆菌 C3 菌株对衰老和痴呆具有很好的预防和改善的效果,因此可以有效地使用于衰老和痴呆的预防或治疗。因此,含有本发明的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 菌株或弯曲乳杆菌 C3 菌株的药用组合物和保健功能食品可以有效地使用于衰老和痴呆的预防或治疗,并且由于有效成分是日常食用的泡菜所具有的菌株,使用时无需担心副作用或毒性等。此外,还可接种本发明的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 或弯曲乳杆菌 C3 菌株而制备发酵组合物,将其有效地使用为预防或治疗衰老和痴呆的组合物。

附图说明

[0077] 图 1 是显示 C29 乳酸菌的 16S rDNA 序列(SEQ ID NO. 1)。

- [0078] 图 2 是显示戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29 位置的系统进化树。
- [0079] 图 3 是显示被动回避反应试验结果的图表。
- [0080] 图 4 是显示 C29 菌株的记忆改善效果呈浓度依赖性地增加的图表。
- [0081] 图 5 是显示 C29 菌株的记忆改善效果的凝胶图片。
- [0082] 图 6 是显示实施例 2 的 Y 型迷宫试验结果的图表。
- [0083] 图 7 是显示实施例 2 的水迷宫试验结果的图表,黑色四角形是东莨菪碱 + (1×10^9 菌落形成单位 (CFU)/ 小鼠 C29),白色四角形是东莨菪碱 + (1×10^{10} CFU/ 小鼠 C29),黑色三角形是东莨菪碱 + (10mg/kg 塔克林阳性对照药物),白色圆圈是单独的东莨菪碱,黑色圆圈是正常对照小鼠。值为平均 $\pm$ SEM (n = 6)。
- [0084] $^{*}P < 0.05_{vs.}$ 是正常对照组, $^{*}P < 0.05_{vs.}$ 是东莨菪碱单独处理的对照组。
- [0085] 图 8 是显示随着给予 C29 菌株的衰老相关基因磷酸体的表达量变化的凝胶照片。
- [0086] 图 9 是显示实施例 3 的 Y 型迷宫试验结果的图表,Y 是幼鼠,0 是衰老小鼠,0/C29 是给予了 C29 乳酸菌 (1×10^9 菌落形成单位 (CFU)/ 小鼠) 的衰老小鼠,0/C3 是给予了 C3 乳酸菌 (1×10^9 菌落形成单位 (CFU)/ 小鼠) 的衰老小鼠,0/C24 是给予了 C24 乳酸菌 (1×10^9 菌落形成单位 (CFU)/ 小鼠) 的衰老小鼠。
- [0087] 图 10 是显示实施例 3 的水迷宫试验结果的图表,Y 是幼鼠,0 是衰老小鼠,0/C29 是给予了 C29 乳酸菌 (1×10^9 菌落形成单位 (CFU)/ 小鼠) 的衰老小鼠,0/C3 是给予了 C3 乳酸菌 (1×10^9 菌落形成单位 (CFU)/ 小鼠) 的衰老小鼠,0/C24 是给予了 C24 乳酸菌 (1×10^9 菌落形成单位 (CFU)/ 小鼠) 的衰老小鼠。值为平均 $\pm$ SEM (n = 6)。
- [0088] 图 11 是显示 C3 乳酸菌的 16S rDNA 序列 (SEQ ID NO. 2)。
- [0089] 图 12 是显示利用 C29 或 C3 菌株发酵的发酵组合物的认知功能改善效果的图表。

具体实施方式

[0090] 以下,通过实施例可以更加详细地说明本发明。这些实施例仅是为了说明本发明,本发明的范围并不局限于这些实施例,这对于本领域的技术人员来说是显而易见的。

[0091] 实施例 1. 乳酸菌分离

[0092] 将泡菜悬浮在 MRS 液体培养基 (broth) 中,后将上清液移至 MRS 琼脂 (agar) 培养基,在 37℃ 温度条件下厌氧培养 24 小时,之后筛选生长出的菌落,进行革兰氏染色和 16S rDNA 分析,从而分离出了乳酸菌菌株。

[0093] 并且,将人的粪便悬浮在 GAM 液体培养基 (Nissui Pharmaceutical Company, Ltd., 日本) 中,后将上清液植入 BL 琼脂培养基 (Nissui 制药),在 37℃ 温度条件下厌氧培养 48 小时,之后筛选生长出的菌落,进行革兰氏染色和 16S rDNA 分析,从而分

离出了乳酸菌和双歧杆菌菌株。

[0094] 分离出的菌株如下所示。

[0095] 1) 从泡菜中分离使用的乳酸菌。

[0096] 肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) C1

[0097] 泡菜明串珠菌 (*Leuconostoc kimchii*) C2

[0098] 弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*) C3

[0099] 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) C4

- [0100] 短乳杆菌 C5
- [0101] 植物乳球菌 (*Lactococcus plantarum*)C6
- [0102] 柠檬明串珠菌 (*Leuconostoc citreum*)C7
- [0103] 戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*)C8
- [0104] 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)C9
- [0105] 乳酸乳杆菌 (*Lactobacillus lactis*)C10
- [0106] 瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)C11
- [0107] 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)C12
- [0108] 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)C13
- [0109] 清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*)C14
- [0110] 戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*)C15
- [0111] 清酒乳杆菌 C21
- [0112] 清酒乳杆菌 C22
- [0113] 清酒乳杆菌 C23
- [0114] 植物乳杆菌 C24
- [0115] 植物乳杆菌 C25
- [0116] 植物乳杆菌 C26
- [0117] 戊糖乳杆菌 C27
- [0118] 戊糖乳杆菌 C28
- [0119] 戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29
- [0120] 清酒乳杆菌 C30
- [0121] 2) 从人体消化道中分离使用的乳酸菌。
- [0122] 短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*)C16
- [0123] 长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)C17
- [0124] 青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)C18
- [0125] 两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)C19
- [0126] 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)C20
- [0127] 实施例 2. 抗痴呆效果的确认

[0128] 为了从泡菜和粪便中分离出的 30 种乳酸菌中确认具有抗痴呆效果的乳酸菌,利用上述的 C1 ~ C30 的菌株和实验动物实施了实验。

[0129] 实验所使用的动物为 28 ~ 30g 的 ICR 系雄性小鼠,并对所有动物根据实验动物的使用和管理指南 (NIH publication No. 85-23) 进行了实验。每个笼子 (cage) 中保持 5 ~ 6 只的实验动物,且使得自由摄取食物。饲养场内温度为 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 $60 \pm 10\%$,且维持 12 小时 (07:30 ~ 19:30) 的光照。

[0130] 2-1. 被动回避反应试验 (Passive avoidance task test)

[0131] 利用隔板将作为实验工具的实验箱子 ($50 \times 15 \times 40\text{cm}$, electrofiable frid floor) 分成两个区域,且当小鼠通过小的入口从一侧进入对面的区域时,使得入口会自动关闭。在用隔板划分的区域的一侧打开照明并放入动物后,当小鼠观察周边后进入无照明的暗的区域时自动关闭入口,并立刻利用地板中的不锈钢栅极施加 1 秒的 0.25mA 的电流,

从而给予电冲击 (foot shock)。第二天,测定从在照明的区域放入实验动物开始,至该动物进入暗的区域导致入口关闭的潜伏时间 (latency)。测定和比较对照组和实验组进入如上所示的暗的区域为止的潜伏时间。最大限制时间定为 300 秒,当超过 300 秒还没有进入暗的区域时,被动回避反应时间定为 300 秒。从开始至动物进入暗的区域导致入口关闭的时间越长时,被认为通过学习的被动回避记忆保持地更好。

[0132] 将实验所使用的 30 种乳酸菌,即 C1 至 C30 乳酸菌分别以 1×10^9 CFU (个) 给药至痴呆动物模型小鼠,每天一次,共给药两天。最后给予乳酸菌 1 小时之后,给予东莨菪碱 (Scopolamine) (0.9mg/kg)。如图 3 所示,其结果为实验所使用的乳酸菌中, C29 能够最好的维持对被动回避的记忆,且较作为痴呆治疗剂的塔克林 (Tacrin, TAC, 10mg/kg) 表现出了更加优异的效果,其次为 C3、C24。

[0133] 将确认了具有最优异效果的 C29 乳酸菌,以 1×10^9 和 1×10^{10} CFU (个) 给药至小鼠,每天一次,共给药两天。最后给予乳酸菌 1 小时之后,给予了东莨菪碱 (0.9mg/kg)。如图 4 所示,其结果为 C29 表现出了呈浓度依赖性的效果。

[0134] 并且,在这动物中为了确认改善痴呆的效果,分离脑的海马体,通过添加含有蛋白酶抑制剂混合物 (protease inhibitor cocktail) 的 100 μ l 的 RIPA 缓冲液 (Gibco 公司) 使其均质化。在 4℃、13000rpm 条件下进行 15 分钟离心分离之后,将上清液在 -80℃ 温度条件下进行保管,利用免疫印迹 (immunoblotting) 方法对 p-CREB、CREB、BDNF 和 β -肌动蛋白 (β -actin) 进行测定。

[0135] 首先取上清液,在 10% SDS (w/v) 聚丙烯酰胺凝胶中进行了 1 小时 30 分钟的电泳 (样品, 50 μ g)。将完成电泳的物质在 100V、400mA 的条件下转膜到硝酸纤维素膜,转膜的时间为 1 小时 10 分钟。用 5% 脱脂乳对完成转膜的硝酸纤维素膜进行 30 分钟的封闭后,用 PBS-吐温清洗 3 次,每次清洗 5 分钟,之后利用一抗 (Santa Cruz Biotechnology, 美国) 按照 1 : 100 的比例反应过夜。接着,清洗 3 次,每次清洗 10 分钟,之后利用二抗 (Santa Cruz Biotechnology, 美国) 按照 1 : 1000 的比例进行反应,反应时间长度为 1 小时 20 分钟。之后,清洗 3 次,每次清洗 15 分钟,后通过荧光染色使其显影。如图 5 所示,其结果为:相比于仅给予东莨菪碱的痴呆模型动物组,可以在将 C29 与东莨菪碱一同给予的组中观察到由于给予东莨菪碱而减少的 p-CREB 和 BDNF 恢复。这表示 C29 乳酸菌具有能够改善记忆的效果。

[0136] 如上所述的实验结果很好的表示 C29 和 C3 乳酸菌通过改善记忆力具有改善痴呆的效果。

[0137] 2-2. Y 型迷宫试验 (Y-maze task)

[0138] Y 型迷宫测定装置伸展成三个通道 (arm) 而具有字母 Y 字形状,各通道的长度为 25cm,高度为 14cm,宽度为 5cm,并以相同的角度设置。将实验动物放置为头部朝着 Y 型迷宫的一个通道的末端,使其在通道内自由活动,使其活动的时间为 8 分钟。记录动物的移动,设定当动物的后爪进入到通道时才算是通过 (arm entry)。用交叉次数 (alternation) 表示动物的移动,交叉次数中当动物连续通过 3 个通道时被定义为是一次交叉。自发的交叉动作量是用实际的交叉次数和最大可能的交叉次数 (即总交叉次数减去 2 的值) 的百分比来表示。

[0139] 将实验所使用的乳酸菌中最优异的乳酸菌 C29,以 1×10^9 和 1×10^{10} CFU (个) 给药

至小鼠,每天一次,共给药两天。最后给予乳酸菌 1 小时之后,给予了东莨菪碱 (0.9mg/kg)。

[0140] 如图 6 所示,其结果为:与给予了东莨菪碱的试验组相比,给予了 C29 的试验组表现出呈浓度依赖性的改善记忆的效果。

[0141] 2-3. 水迷宫试验 (Water maze task)

[0142] 在圆形的水槽 (直径为 100cm,高度为 35cm) 中,填充了温度为 23℃ 的、15cm 深度的由添加奶粉而成浑浊的水,以使无法看见安装在水中的平台。利用小鼠时,将平台 (platform,直径 4.5cm,高度 14.5cm) 放置在四等分整个水槽后的某一个扇形部位的中心,并使平台上端位于水面下方 0.5cm。将这装置安装在带有能够确认位置标示的实验室。训练试验 (Training trial) 共连续进行 5 天,每天 3 次。首先,当小鼠找到平台时,使其停留在平台约 10 秒后,将其重新放回至原来的笼子里,并在 5 分钟后实施了下次试验。如果小鼠 120 秒内未找到平台,将它放在平台 10 秒后结束试验。以训练结束的动物为对象,在最后训练试验的 24 小时之后,实施了探测测试 (probe test)。此时,从池中除去平台,并在 90 秒期间内测定停留在原来放置平台的四分之一圆的时间,并用百分比来表示。

[0143] 将实验所使用的乳酸菌中最优异的乳酸菌 C29,以 1×10^9 和 1×10^{10} CFU (个) 给药至小鼠,每天一次,共给药四天的同时,测定每天的游泳时间。第一次给予乳酸菌 1 小时之后,给予了东莨菪碱 (0.9mg/kg)。

[0144] 如图 7 所示,其结果为:C29 乳酸菌表现出呈浓度依赖性的改善记忆的效果。

[0145] 实施例 3. 抗氧化、抗衰老和抗痴呆效果的确认

[0146] 为了确认抗氧化、抗衰老和抗痴呆效果,给 16 个月大的小鼠给予 3 种乳酸菌 C29、C3、C24 (分别 1×10^9 CFU),每周给予 5 天,共给药 12 周。在氧化反应进行的最快的大肠中测定了乳酸菌的抗氧化效果和衰老相关的基因 AKT、FOXO3、NF- κ B (p65)、mTor 磷酸化体 (인산화체)。用比较基因测定了 β -肌动蛋白。并且,测定了记忆力改善效果。

[0147] 1) 脂质过氧化物分析

[0148] 实验动物的大肠组织 100mg 中添加含有蛋白酶抑制剂混合物的 250 μ l 的 RIPA buffer,使其均质化。然后,在 4℃、13000rpm 的条件下,进行 15 分钟离心分离之后,将上清液在 -80℃ 条件下进行保管,并将其用于脂质过氧化物的分析。

[0149] 使用 TBARS 分析试剂盒对大肠组织内脂质过氧化物程度 (Cayman chem., USA) 进行分析。将 100 μ l 大肠组织的匀浆液放入 5ml 的聚丙烯螺旋盖离心管中,然后添加 100 μ l 的 SDS 溶液,并轻轻地摇晃。将 4ml 的显色试剂添加于试管中,接着放入沸腾的水中 1 小时后停止反应。之后,在 4℃、13000rpm 的条件下,进行 10 分钟离心分离之后,在常温下放置 30 分钟,并利用 ELISA 酶标仪在 540nm 条件下测定了吸光度。使用作为标准物质的丙二醛 (MDA) 制备标准曲线,并由此测定了产生的 MDA 的量。

[0150] 2) 超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase) (SOD) 活性

[0151] 使用黄嘌呤氧化酶-细胞色素 (xanthine oxidase-cytochrome) C 系统测定了 Cu、Zn-SOD 活性。将 2.4ml 的 50mM 磷酸钾缓冲液 (pH7.8,含有 0.1mM EDTA)、0.3ml 的 0.1mM 高铁细胞色素 C、0.2ml 的 1% 脱氧胆酸盐、0.1ml 的 1.5mM 氰化钾、0.3ml 的 0.5mM 黄嘌呤和 20ml 的稀释黄嘌呤氧化酶充分混合均匀,在 25℃、550nm 条件下测定了高铁细胞色素 C 的减少率。SOD 的 1 单位 (unit) 被定义为用于抑制 50% 的细胞色素 C 减少的 SOD 量。

[0152] 3) 过氧化氢酶 (Catalase) 活性

[0153] 在 2ml 的 50mM 磷酸盐缓冲液 (PH7.0) 中添加 100 μ l 的酶原, 再添加 1ml 的 10mM H_2O_2 溶液, 在 240nm 条件下测定了吸光度减小情况, 共测定 2 分钟。1unit 定义为 1 分钟内分解 1mol 的 H_2O_2 的酶量。

[0154] 4) 谷胱甘肽 (GSH)

[0155] GSH 浓度是用磷酸盐缓冲液稀释样品, 接着添加邻苯二甲醛后振荡 15 分钟, 之后, 在激发波长 345nm、发射波长 425nm 条件下测定荧光。

[0156] 如上所述的 4 种实验结果、如以下表 6 所示, 实验所使用的 3 种菌株均表现出了优异的抗氧化和抗衰老结果。效果最优异的菌株为 C29, 其次按顺序为 C24、C3。

[0157] [表 6]

组	酶活性 (mol/min/mg)			
	超氧化物歧化酶 (mol/min/mg)	过氧化氢酶 (mol/min/mg)	丙二醛 (μ mol/mg 蛋白质)	谷胱甘肽 μ g/mg 蛋白质
给 2 个月大的小鼠 给予生理盐水 (3 个月)	2.8 ± 0.5	6.0 ± 0.6	2.5 ± 0.9	3.9 ± 0.2
给 16 个月大的小鼠 给予生理盐水 (3 个月)	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.5	9.4 ± 0.2	1.9 ± 1.3
给 16 个月大的小鼠 摄入 C29 (3 个月)	1.6 ± 0.4	4.5 ± 1.0	5.2 ± 1.9	3.9 ± 0.5
给 16 个月大的小鼠 给予 C3 (3 个月)	1.8 ± 0.3	4.2 ± 1.2	5.3 ± 1.2	2.8 ± 0.9
给 16 个月大的小鼠 给予 C24 (3 个月)	1.9 ± 0.6	4.1 ± 1.6	4.2 ± 2.1	4.0 ± 1.4

[0158] 并且, 在 100mg 的实验动物的大肠组织中添加含有蛋白酶抑制剂混合物的 250 μ l 的 RIPA buffer (Gibco 公司), 使其均质化。在 4℃、13000rpm 的条件下, 进行 15 分钟离心分离之后, 将上清液在 -80℃ 条件下保管, 利用免疫印迹法测定了磷光体 -FOXO3 (포스포르-FOXO3)、磷光体 -p65、P65、磷光体 -mTor、磷光体 -AKT 和 β -肌动蛋白。

[0159] 取上清液, 在 10% SDS (w/v) 聚丙烯酰胺凝胶中进行了 1 小时 30 分钟的电泳 (样品, 50 μ g)。将完成电泳的物质在 100V、400mA 的条件下转膜到硝酸纤维素膜, 转膜的时间为 1 小时 10 分钟。用 5% 脱脂乳对完成转膜的硝酸纤维素膜进行 30 分钟的封闭后, 用 PBS-吐温清洗 3 次, 每次清洗 5 分钟, 之后利用一抗 (Santa Cruz Biotechnology, 美国) 按照 1 : 100 的比例反应过夜。接着, 清洗 3 次, 每次清洗 10 分钟, 之后利用二抗 (Santa Cruz Biotechnology, 美国) 按照 1 : 1000 的比例进行反应, 反应时间长度为 1 小时 20 分

钟。之后,清洗 3 次,每次清洗 15 分钟,后通过荧光染色使其显影。

[0160] 除了未用有效成分和 LPS 处理之外,其余都经过相同处理的细胞作为对照组。如图 8 所示,其结果为:相比于非处理组,用 C29 或 C3 处理的试验组中可以观察到 p-p65、p-FOXO3、p-mTor、p-AKT 等明显减少。这很好地表示了通过 C29 或者 C3 的抗氧化和抗衰老的效果。

[0161] 5) Y 型迷宫试验 (Y-maze task)

[0162] Y 型迷宫测定装置伸展成三个通道 (arm) 而具有字母 Y 字形状,各通道的长度为 25cm,高度为 14cm,宽度为 5cm,并以相同的角度设置。将实验动物放置为头部朝着 Y 型迷宫的一个通道的末端,使其在通道内自由活动,使其活动的时间为 8 分钟。记录动物的移动,设定当动物的后爪进入到通道时才算是通过 (arm entry)。用交叉次数 (alternation) 表示动物的移动,交叉次数中当动物连续通过 3 个通道时被定义为是一次交叉。自发的交叉动作量是用实际的交叉次数和最大可能的交叉次数 (即总交叉次数减去 2 的值) 的百分比来表示。

[0163] 实验中将 C29 乳酸菌、C3 乳酸菌和 C24 乳酸菌,以 1×10^9 CFU (个) 给药至 16 个月大的小鼠,每天一次,共给药两天。本试验中相比于幼鼠,由于衰老小鼠的记忆力会降低,因此没有给予东莨菪碱。

[0164] 如图 9 所示,其结果为:C29 乳酸菌对衰老小鼠的记忆力改善效果最为优异,其次按顺序为 C3 乳酸菌、C24 乳酸菌。

[0165] 6) 水迷宫试验 (Morris water maze test)

[0166] 在圆形的水槽 (直径为 100cm,高度为 35cm) 中,填充了温度为 23℃ 的、15cm 深度的由添加奶粉而成浑浊的水,以使无法看见安装在水中的平台。利用小鼠时,将平台 (platform,直径 4.5cm,高度 14.5cm) 放置在四等分整个水槽后的某一个扇形部位的中心,并使平台上端位于水面下方 0.5cm。将这装置安装在带有能够确认位置标示的实验室。训练试验 (Training trial) 共连续进行 5 天,每天 3 次。首先,当小鼠找到平台时,使其停留在平台约 10 秒后,将其重新放回至原来的笼子里,并在 5 分钟后实施了下次试验。如果小鼠 120 秒内未找到平台,将它放在平台 10 秒后结束试验。以训练结束的动物为对象,在最后训练试验的 24 小时之后,实施了探测测试 (probe test)。此时,从池中除去平台,并在 90 秒期间内测定停留在原来放置平台的四分之一圆的时间,并用百分比来表示。

[0167] 将实验所使用的乳酸菌中最优异的乳酸菌 C29,以 1×10^9 和 1×10^{10} CFU (个) 给药至小鼠,每天一次,共给药四天的同时,测定每天的游泳时间。本试验中相比于幼鼠,由于衰老小鼠的记忆力会降低,因此没有给予东莨菪碱。

[0168] 如图 10 所示,其结果为:C29 乳酸菌对衰老小鼠的记忆力改善效果最为优异,其次按顺序为 C3 乳酸菌、C24 乳酸菌。

[0169] 实施例 4. C29 和 C3 乳酸菌的鉴定

[0170] 为了鉴定在上述实验中被确认为具有优异的抗氧化及抗衰老效果和痴呆改善效果的 C29 菌株和 C3 菌株,进行了通过 16S rDNA 基因序列比较的系统遗传学分析。

[0171] 利用布拉斯特 (Blast) 相似性查询程序,比较 rDNA 的碱基序列,与多种乳杆菌菌株的 16S rDNA 基因序列进行多重序列排列后,判别在系统进化树中位置的结果为:C29 乳酸菌表现出与植物乳杆菌菌株 BIM B-536、戊糖乳杆菌菌株 LS3 具有 99.9% 以上的同源

性,因此将其命名为戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 C29。于 2012 年 7 月 9 日,将其委托给作为保藏机构的韩国微生物保藏中心 (KCCM) 进行了保藏,其保藏号为 KCCM11291P。并且,C3 乳酸菌表现出与弯曲乳杆菌具有 99.9% 以上的同源性,因此命名为弯曲乳杆菌 C3。于 2012 年 7 月 9 日,将其委托给作为保藏机构的韩国微生物保藏中心 (KCCM) 进行了保藏,其保藏号为 KCCM43009。

[0172] 实施例 5. C29 或 C3 发酵组合物的抗痴呆效果的确认

[0173] 为了确认用 C29 或 C3 菌株进行发酵的大豆或脱脂大豆的发酵组合物、海桐皮发酵组合物、人参发酵组合物和党参发酵组合物的抗痴呆效果,通过与所述实施例 2 相同的方法对实验动物进行了被动回避反应试验 (Passive avoidance task test)。

[0174] 5-1. 发酵组合物制成

[0175] 将 10g 大豆或脱脂大豆粉末悬浮在 90ml 的水中,并进行杀菌,然后加入 10ml 的 1×10^8 CFU (个)/0.1ml 的 C29 或 C3 菌株,进行 24 小时培养。

[0176] 分别将 10g 的海桐皮水提取物、人参水提取物和党参水提取物悬浮在 90ml 的水中,并进行杀菌,然后加入 10ml 的 1×10^8 /0.1ml 的 C29 或 C3 菌株,进行 24 小时培养。

[0177] 5-2. 被动回避反应试验 (Passive avoidance task test)

[0178] 分别将 0.1ml 的按上述方法制备的大豆或脱脂大豆发酵的组合物、海桐皮发酵组合物、人参发酵组合物和党参发酵组合物,给药至痴呆动物模型小鼠,每天一次、共给药两天。最后给予乳酸菌 1 小时之后,给予了东莨菪碱 (Scopolamine) (0.9mg/kg)。如图 12 所示,其结果为:用 C29 进行发酵的大豆发酵组合物能够最好的维持对被动回避的记忆,其相比于作为痴呆治疗剂的塔克林 (tacrin, TAC, 10mg/kg) 显示出更加优异的效果,其次按顺序为用 C29 发酵的人参发酵组合物、用 C3 发酵的大豆发酵组合物、用 C29 发酵的党参发酵组合物。这表示用 C29 或 C3 进行发酵的发酵组合物具有能够改善记忆的效果。

[0179] 如上所述的实验结果很好的表示用 C29 和 C3 菌株发酵的发酵组合物通过改善记忆力具有改善痴呆的效果。

[0001]

<110>	庆熙大学校产学协力团 UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY	
<120>	具有对衰老及痴呆的预防和/或治疗活性的乳酸菌 Lactic acid bacteria capable of preventing and/or treating senescence and dementia	
<130>	SOP50486PCT	
<150>	10-2012-0089714	
<151>	2012-08-16	
<160>	2	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	1428	
<212>	DNA	
<213>	戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌	
<400>	1	
	acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact	60
	ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct	120
	aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagtttga aagatggctt cggtatcac	180
	ttttggatgg tcccgcggcg tattagctag atggtggggg aacggctcac catggcaatg	240
	atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gccc aaactc	300
	ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc	360
	gcgtgagtga agaagggttt cggtctgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga	420
	gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag	480
	cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtcccgat ttattgggcg taaagcgagc	540
	gcaggcgggt ttttaagtct gatgtgaaag ccttcggctc aaccgaagaa gtgcatcgga	600
	aactgggaaa cttgagtgcga gaagaggaca gtggaactcc atgtgtagcg gtgaaatgcg	660
	tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag gcggctgtct ggtctgtaac tgacgctgag	720
	gctcgaaagt atgggtagca aacaggatta gataccctgg tagtccatac cgtaaacgat	780
	gaatgctaag tgttggaggg tttccgccct tcagtgtgc agtaacgca ttaagcattc	840
	cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag	900
	cggtaggagca tgtggtttta ttcgaagcta cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatac	960
	tatgcaaatc taagagatta gacgttccct tcggggacat ggatacaggt ggtgcatggt	1020
	tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aaccttatt	1080

[0002]

atcagttgcc agcattaagt tgggcactct ggtgagactg ccggtgacaa accggaggaa	1140
ggtggggatg acgtcaaadc atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat	1200
ggatggtaca acgagttgcg aactcgcgag agtaagctaa tctcttaaag ccattctcag	1260
ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcggatca	1320
gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccatgagagt	1380
ttgtaacacc caaagtcggt ggggtaacct tttaggaacc agccgcct	1428

<210> 2
 <211> 893
 <212> DNA
 <213> 弯曲乳杆菌

<400> 2	
agtcgtaaca aggtaacctg agaagtcttg attcgataac atttgagtga gtggcggacg	60
ggtgagtaac acgtgggtaa cctgccctaa agtgggggat aacatttga aacagatgct	120
ataccgcata aaacctagca ccgcatggtg caaggttgaa agatggttgc ggctatcact	180
ttaggatgga cccgcggtgc attagttagt tggtaggta aaggctcacc aagaccgtga	240
tgcatagccg acctgagagg gtaatcgccc aacttgggac tgagacacgg cccagactcc	300
tacgggaggc agcagtaggg aatcttccac aatggacgaa agtctgatgg agcaacgccg	360
cgtgagtga gaaggtttgc ggatcgtaaa actctgttgt tggagaagaa cgtatttgat	420
agtaactgat caggtagtga cggatccaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc	480
agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt attgggcgta aagcgagcgc	540
aggcggtttc ttaagtctga tgtgaaagcc ttcggctcaa ccgaagaagt gcatcggaag	600
ctgggaaact tgagtcgaga agaggacagt ggaactccat gtgtagcggg gaaatgcgta	660
gatatatgga agaaccacag tggcgaaggc ggctgtctgg tctgtaactg acgtgaggc	720
tcgaaagcat gggtagcaaa caggattaga taccctggta gtccatgccg taaacgatga	780
gtgctagggt ttggagggtt tccgcccttc agtgccgcag ctaacgcatt aagcactccg	840
cctggggagt acgaccgcaa ggttgaaact caaaggaatt gacgggggcc cgc	893

[C-29 16S rDNA 序列表 (1428bp)]

与戊糖乳杆菌菌株LS3 16S rRNA基因1427/1428的同源性

(99.9%)

与植物乳杆菌菌株BIM B-536 16S rRNA基因1427/1428的同源性

(99.9%)

ACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACA
CGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGG
ACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC GCGGCGTATTAGCTAGA
TGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGC CACATTGGGAC
TGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG
GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA
GAGTAACTGTTCAAGTATTGACGGTATTAAACAGAAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC CCGGATTTATTGGCGGTAAAGCGAGCGCAGGC GGTTT TTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACC GAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACA
GTGGAAC TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACAC CAGTGGCGAAGGC GGCTGTCT
GGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATAC
CGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATT AAGCATTCC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC AAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGC GAAGAACC TTACCAGGTC TTGACATACTATGCAAACTCTAAGAGATT A
GACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTATCAGTTGCCAGCATT AAGTTGGGC ACTCTGGTGAGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
GCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCATTCTCAGTTC
GGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGG
GTAACCTTTAGGAAC CAGCCGCCT

图 1

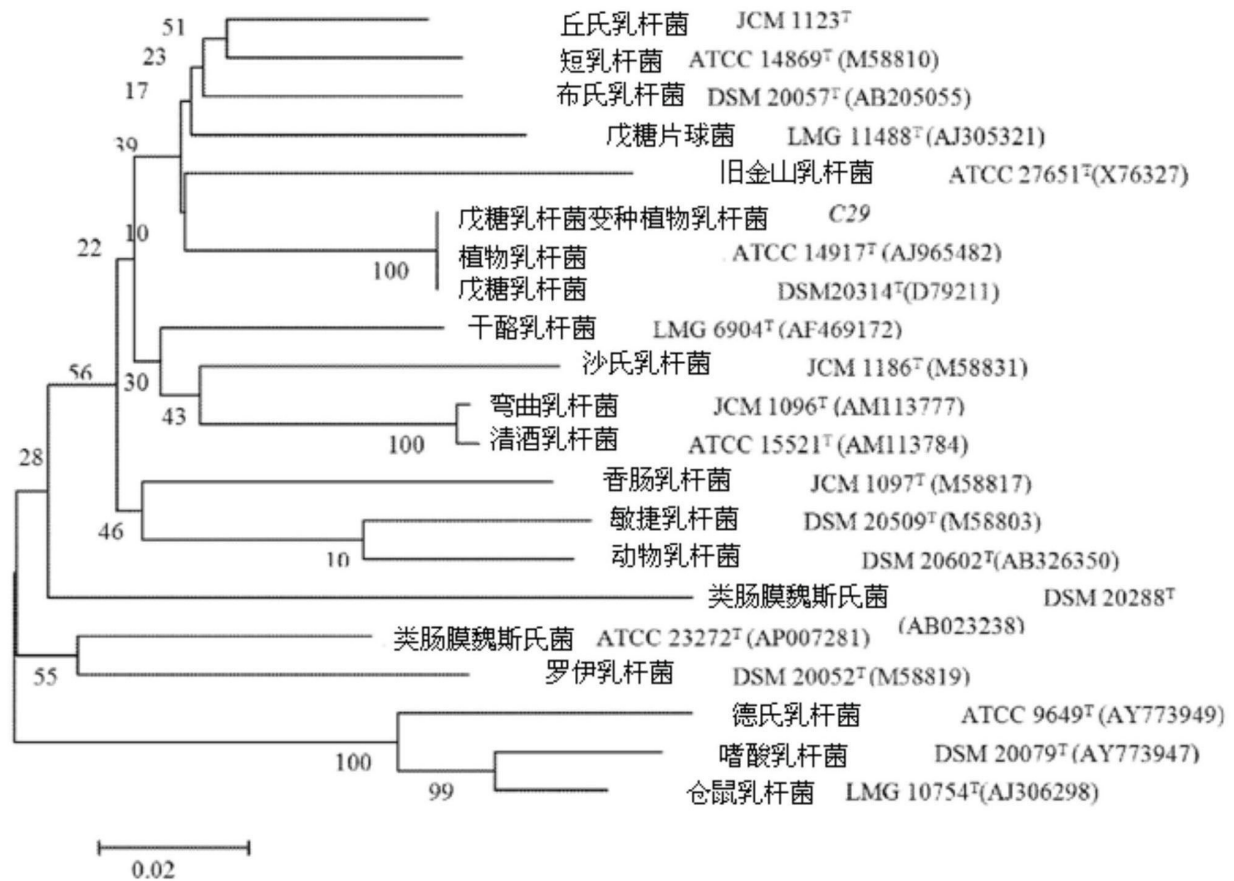


图 2

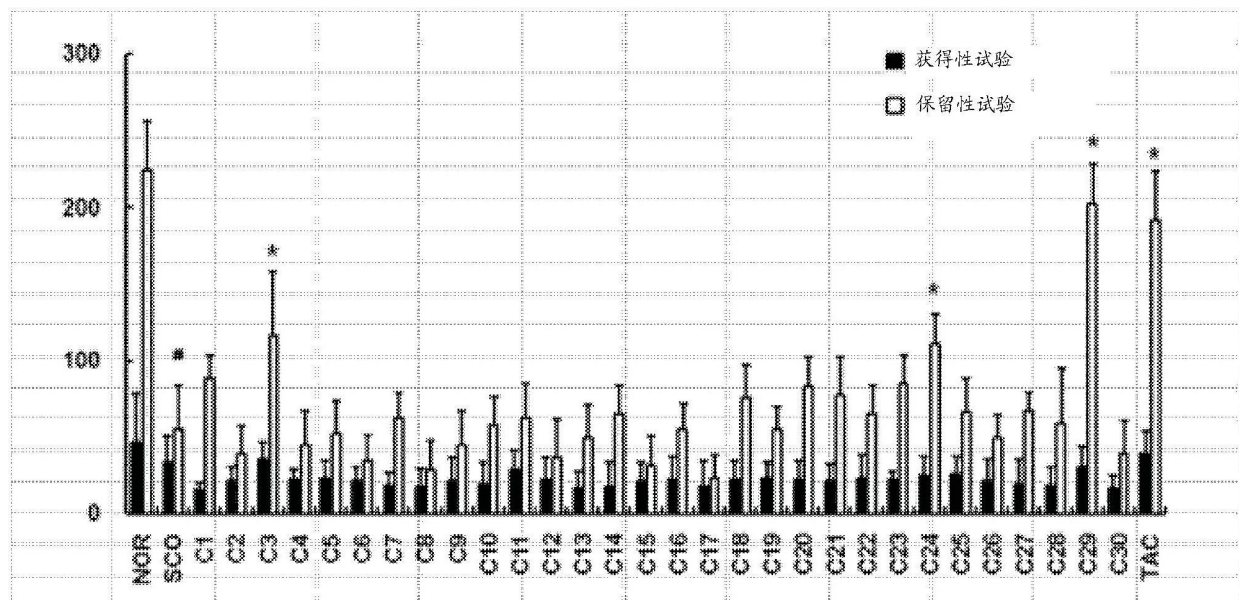


图 3

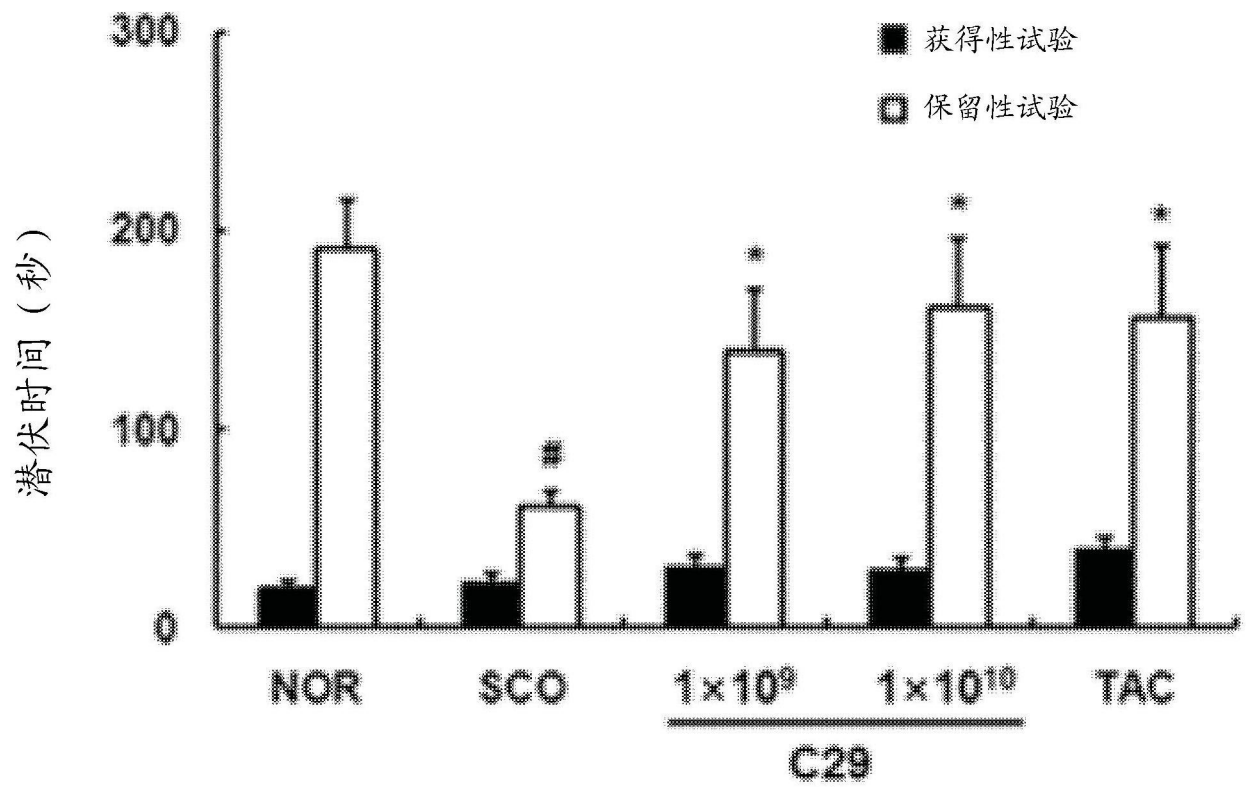


图 4

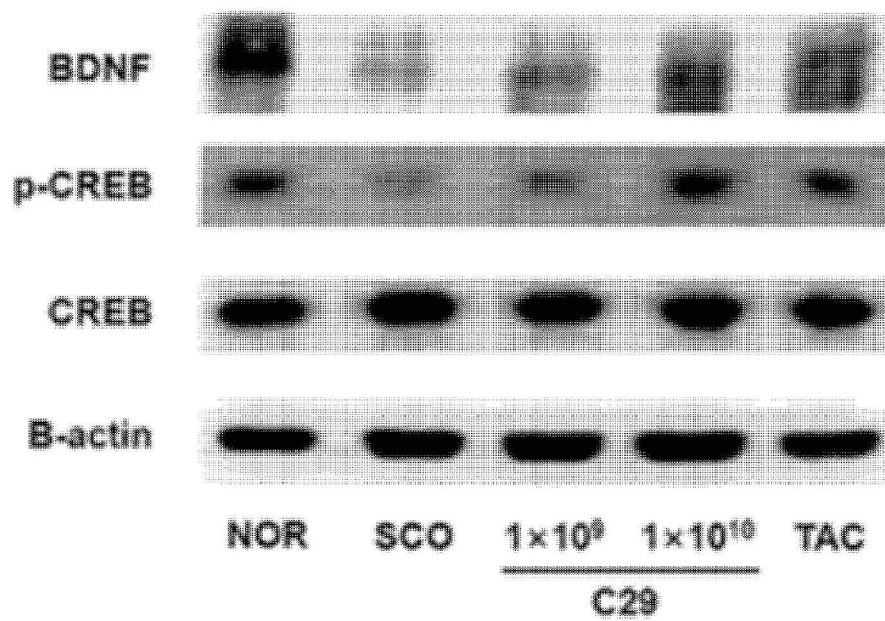


图 5

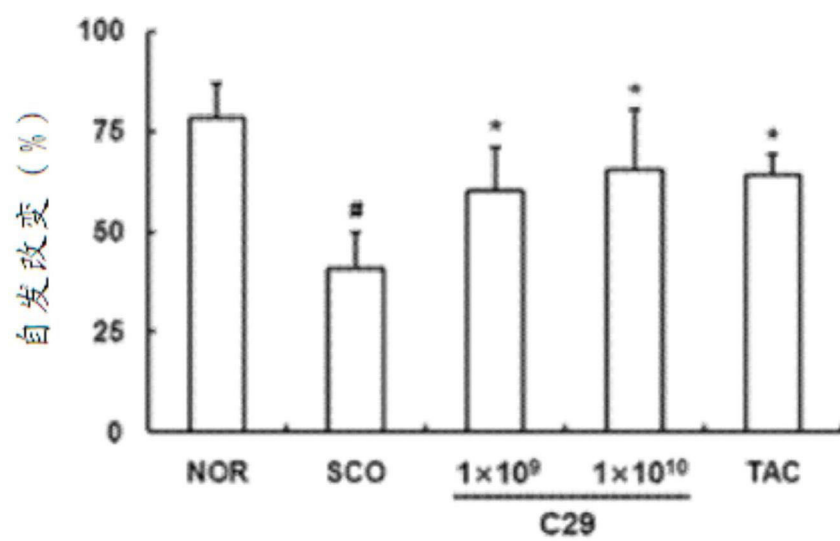


图 6

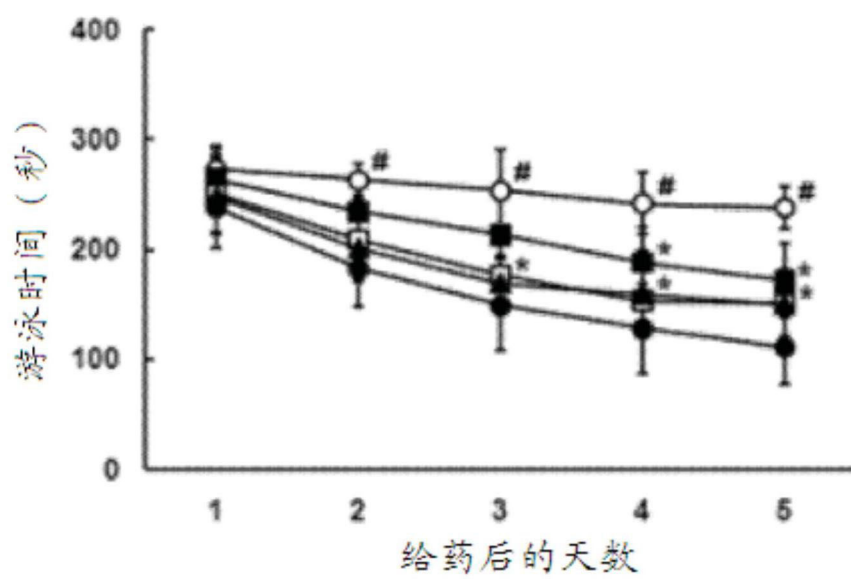


图 7

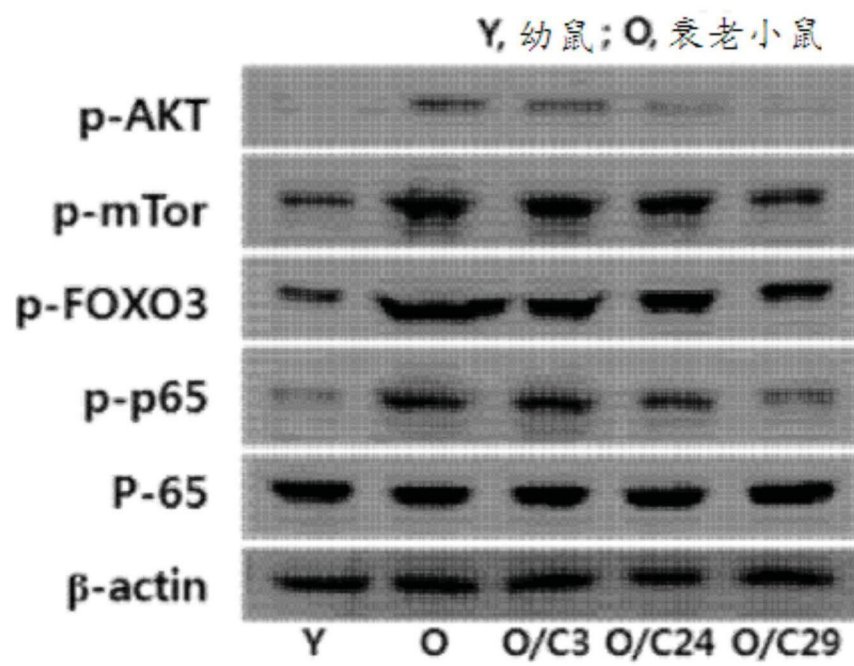


图 8

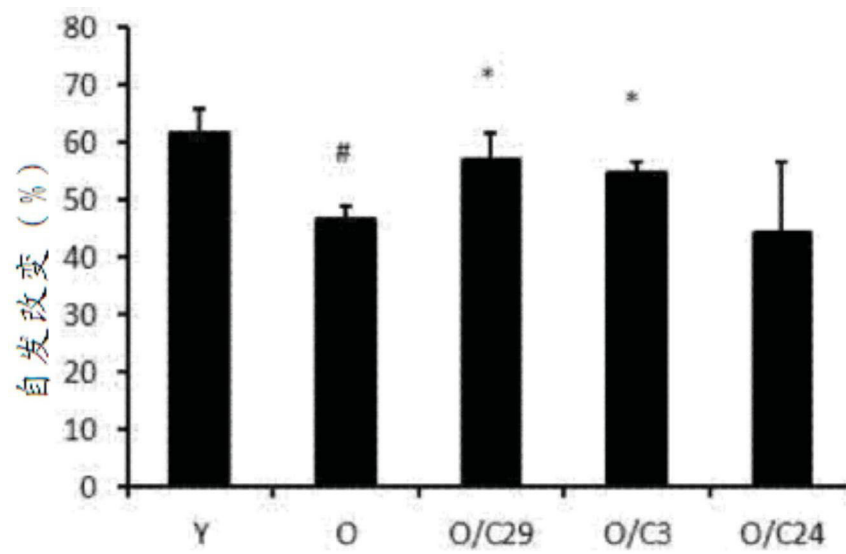


图 9

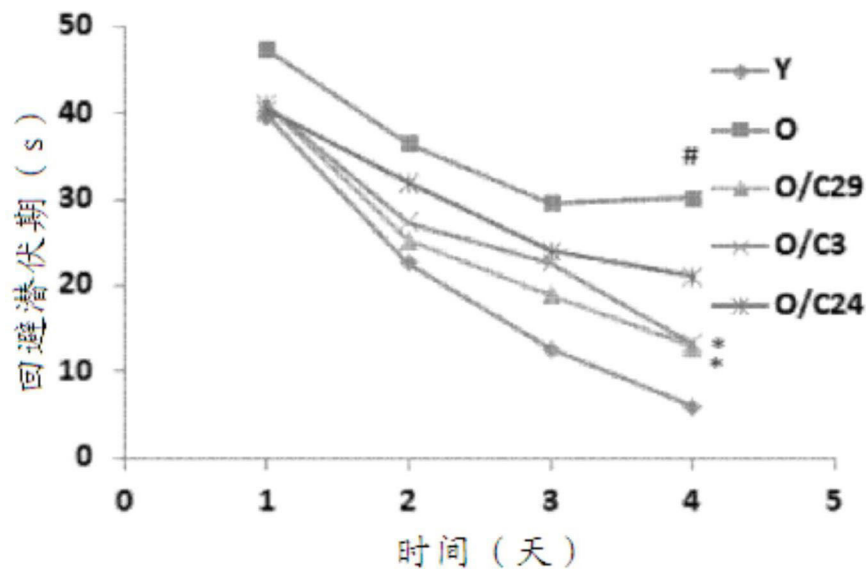


图 10

[C3 sequence (893bp)]

与弯曲乳杆菌基因 16S rRNA 864/866 的同源性 (99%)

```

AGTCGTAAC AAGGTAACCGTAGAAGTCTTGATTGGATAACATTTGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACG
TGGGTAACC TGCCCTAAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTATACCGCATAAACCTAGCACCGCA
TGGTGCAAGGTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGG
TAAAGGCTC ACCAAGACCGTGATGCATAGCCGACC TGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTATTGATAGTAACGTATCAG
GTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGATTAT TGGGCGTAAAGC GAGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTC
AACC GAAGAAGTGATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAAGAGAGGACAGTGGAAC TCATGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGC TGTC TGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTC
GAAAGCATGGGTAGC AAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTGGA
GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC TGGGGAGTACGAC CGCAAGGTTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGC

```

图 11

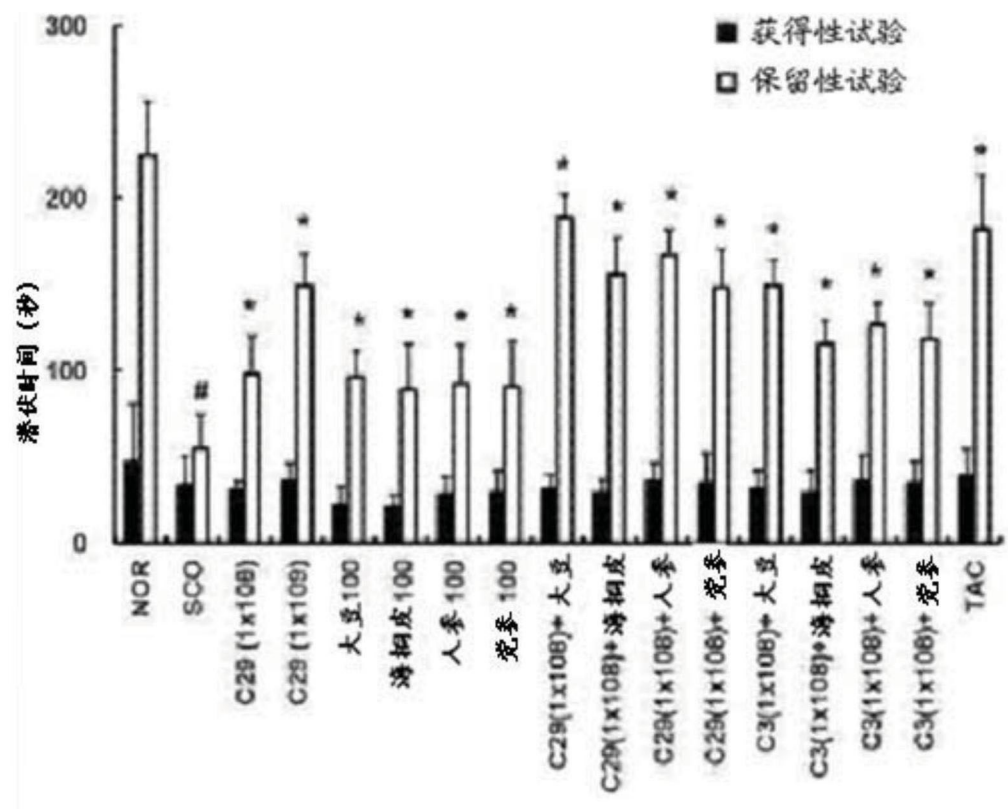


图 12

Abstract

The present invention provides a novel lactic acid bacterium having antioxidant and antiaging functions and a dementia alleviation effect, and more specifically, provides *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 KCCM11291P and *Lactobacillus curvatus* C3 KCCM430009. In addition, the present invention provides an antioxidant and antiaging pharmaceutical composition and a dietary supplement containing the *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 KCCM11291P or *Lactobacillus curvatus* C3 KCCM430009 of the present invention as an active ingredient, and a composition for preventing or treating dementia and a dietary supplement for preventing or alleviating dementia, containing *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 KCCM11291P or *Lactobacillus curvatus* C3 KCCM430009 as an active ingredient. Additionally, the present invention provides a composition for preventing or treating dementia, containing a fermentation composition, as an active ingredient, fermented by *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 KCCM11291P or *Lactobacillus curvatus* C3 KCCM430009.