

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 1 月 9 日 (09.01.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/006663 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 1/20 (2006.01) *A61P 3/06* (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01) *A61K 35/74* (2015.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/094085
- (22) 国际申请日: 2018 年 7 月 2 日 (02.07.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 葡萄王生技股份有限公司 (GRAPE KING BIO LTD.) [CN/CN]; 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。
- (72) 发明人: 陈劲初 (CHEN, Chin-chu); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。
陈炎炼 (CHEN, Yen-lien); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。 许胜

杰 (HSU, Sheng-chieh); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。 林珊 (LIN, Shan); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。 林诗伟 (LIN, Shin-wei); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。 李丽雅 (LEE, Li-ya); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。 吴思颖 (WU, Szu-yin); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。 陈彦博 (CHEN, Yen-po); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。 王启宪 (WANG, Ci-sian); 中国台湾省平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。 侯毓欣 (HOU, Yu-hsin); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。 石仰慈 (SHIH, Yang-tzu); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。

(54) **Title:** NOVEL LACTOBACILLUS PARACASEI GKS6 FOR MITIGATING METABOLIC SYNDROME, CULTURE MEDIUM THEREOF, CULTURE METHOD, USE, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, AND EDIBLE COMPOSITION

(54) **发明名称:** 用于改善代谢症候群的新颖副干酪乳杆菌 GKS6、其培养基、培养方法、用途、医药组合物及可食用组合物

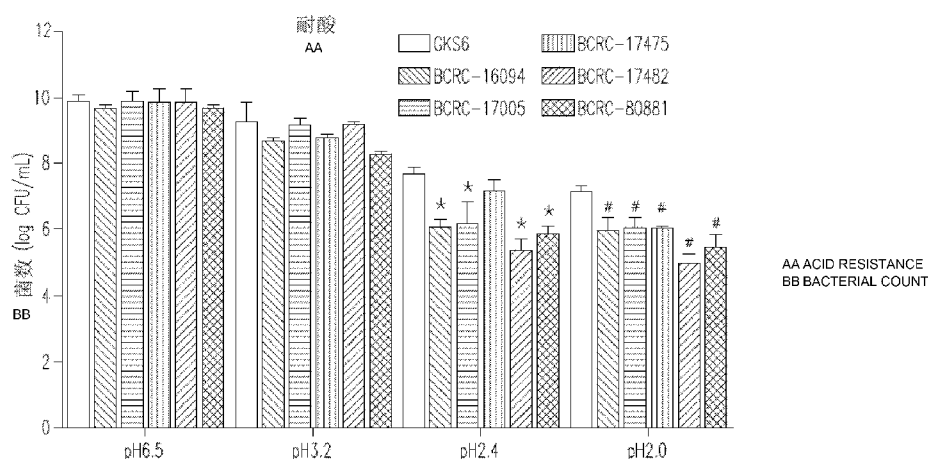


图3

(57) **Abstract:** Provided is novel *Lactobacillus paracasei* GKS6 for mitigating metabolic syndrome, having an access number of CGM-CC No. 14566. Also provided is a culture medium of a GKS6 strain, a culture method, use, a pharmaceutical composition, and an edible composition. A GKS6 strain is acid-resistant and bile salt-resistant, can effectively reduce the weight, reduce organ hypertrophy, lower liver lipid content, lower blood lipid, reduce liver enlargement, reduce liver function index, lower visceral adipose tissue and/or

(CN)。林静雯(LIN, Ching-wen); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。

陈雅君(CHEN, Ya-jyun); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。

江佳琳(JIANG, Jia-lin); 中国台湾省桃园市平镇区金陵路2段402号, Taiwan 324 (CN)。

(74) 代理人: 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙)(TSINGYIHUA INTELLECTUAL PROPERTY LLC); 中国北京市海淀区清华园清华大学照澜院商业楼301室, Beijing 100084 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (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)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二.4(d)(i)和48.2(a)(viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

subcutaneous adipose tissue content, and remove body fat, and can be used for preventing and/or treating metabolic syndrome-related diseases, reducing obesity caused by high fat diet, and increasing the discharge of in-vivo fat to reduce obesity caused by high fat diet.

(57) 摘要: 提供了一种改善代谢症候群的新颖副干酪乳杆菌GKS6, 其寄存编号为CGMCC No.14566。还提供了一种GKS6菌株的培养基、培养方法、用途、医药组合物及可食用组合物。GKS6菌株可耐酸、耐胆盐, 可有效地降低体重、降低脏器肥大、降低肝脏脂质含量、降血脂、降低肝肿大、降低肝功能指数、减少内脏脂肪组织及/或皮下脂肪组织含量、排除体脂肪, 可用于预防及/或治疗代谢症候群相关疾病、减少由高油脂饮食引起的肥胖、增加体内脂肪的排出而减少由高油脂饮食引起的肥胖。

用于改善代谢症候群的新颖副干酪乳杆菌 GKS6、其培养基、培养方法、用途、医药组合物及可食用组合物

5

技术领域

本发明关于一种乳酸菌,尤其关于一种用于改善代谢症候群的新颖副干酪乳杆菌 GKS6、其培养基、培养方法、用途、医药组合物及可食用组合物。

10 背景技术

随着生活型态、饮食习惯的转变,各国人民的肥胖率增加,肥胖在现代化国家已成为严重的健康问题。世界卫生组织(WHO)更将肥胖列为 21 世纪最重要的公共卫生及预防医学课题。WHO 将肥胖定义为身体质量指数(Body mass index, BMI, 体重/身高²(kg/m²))大于 30 为肥胖,介于 25~29.9 为过重。

15 肥胖成因主要是长期热量的摄取大于热量的消耗,导致脂肪堆积于身体,因而形成肥胖。肥胖的形成分为原发性及自发性,其中原发性肥胖为饮食及运动等环境因素所造成;自发性肥胖则为遗传或疾病所引起。细胞生物学所定义的肥胖,是指由于脂肪组织中前脂肪细胞分化成脂肪细胞的数目及大小增加所致。脂肪组织可以分泌多种物质,包括激素、生长因子、酵素、细胞因子、补体及基质蛋白等,其主要作用为调节代谢、生殖、免疫、血压与血管新生等。因此,肥胖会诱发全身多种疾病。

高油高脂的饮食习惯将造成肥胖,连带导致肝脏细胞囤积过量的脂肪颗粒。当脂肪囤积超过肝重量的 5%即为脂肪肝,进而产生肝肿大等症状。造成肝肿大的原因包括病毒性肝炎、肝硬化、中毒性及药物性肝炎、瘀血、代谢异常所导致的脂肪肝、肿瘤或白血病等。

25 肝脏功能检测通常藉由抽血检测丙氨酸转胺酶(alanine aminotransferase (ALT), 又称为丙酮酸转胺酶(GPT))、天门冬胺酸转胺酶(aspartate aminotransferase (AST), 又称为麸胺酸草乙酸转胺酶(GOT)), AST 及 ALT 为肝细胞制造最多的两种酵素。当肝脏发炎时,肝细胞会坏死,AST 及 ALT 就会进入血液中,造成肝指数 GOT 及 GPT 升高,因此医疗上常以此作为肝脏发炎或受损程度的评估。肝指数过高的原因包括病毒引起的肝炎、药物性肝炎、猛爆性肝炎、肝化脓、肝癌、血压降低、急性心肌梗塞、甲状腺机能亢进,肥胖所引起的脂肪肝也是原因之一。

30

血液中的脂肪主要分为两类，即胆固醇及三酸甘油脂，而根据其于蛋白质的比例又再细分为乳糜微粒（CM）、极低密度脂蛋白质（VLDL）、低密度脂蛋白质（LDL）及高密度脂蛋白质（HDL）。若血液中好的胆固醇过少或是坏的胆固醇过高，即称为高血脂。原发性高血脂为家族遗传，次发性高血脂则是内分泌疾病（如糖尿病、甲状腺机能低下或肝肾疾病）、生活习惯、药物等原因所造成。高血脂使胆固醇累积在血管，形成粥样动脉硬化，导致血液流动不佳，引发心肌梗塞、中风、周边动脉堵塞等症状。

酮体包含丙酮、乙酰乙酸及 β -羟丁酸三种化合物。当身体饥饿、禁食或某些病理状态（如糖尿病）下，脂肪代谢增加，大量的脂肪酸被肝细胞吸收及氧化，而此同时为了维持血糖浓度的稳定，体内的糖异生也会被激活，进而生成酮体。

食物中所含的嘌呤经摄食及分解后即生成尿酸。尿酸经由肾脏或肠道排出体外。当体内生成尿酸过多或肾脏功能发生障碍，导致尿酸无法顺利排出体外，血液中的尿酸含量过高，称为高尿酸血症。进而血液中的尿酸积存于关节或组织将引起肿胀变形，即痛风。遗传、不当的高嘌呤饮食习惯、药物、酒精等将可能导致原发性高尿酸血症，而脂肪分解所产生的酮体则会抑制尿酸排出，因此肥胖者可能出现尿酸过高症状，进而导致相关疾病。

由于前述关于肥胖、体脂肪、肝指数、高血脂、酮体、尿酸等代谢症候群已严重影响人们生活，因此开发能够改善代谢症候群的技术、药物、食品等已刻不容缓。

本案申请人鉴于已知技术中的不足，经过悉心试验与研究，并一本锲而不舍的精神，终构思出本案，能够克服先前技术的不足，以下为本案的简要说明。

发明内容

为了解决现代社会的代谢症候群问题，本发明由健康女婴粪便中筛选、分离出新颖的副干酪乳杆菌（*Lactobacillus paracasei*）GKS6，该 GKS6 菌株及其菌粉、医药组合物、可食用组合物的形式可耐酸、耐胆盐，可有效地降低体重、降低脏器（心脏、肝脏、肾脏）肥大、排除体脂肪、降血脂、降低肝肿大、降低肝功能指数（ALT 及/或 AST）、减少内脏脂肪组织及/或皮下脂肪组织含量、降低肝脏脂质（三酸甘油脂及/或胆固醇）含量，可用于预防及/或治疗代谢症候群相关疾病、减少由高油脂饮食引起的肥胖、增加体内脂肪的排出而减少由高油脂饮食引起的肥胖。

因此，本发明揭露一种新颖的副干酪乳杆菌 GKS6，其于 2017 年 8 月 25 日寄存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC），寄存编号为 CGMCC No. 14566，且于 2017 年 8 月 26 日通过存活试验。

该 GKS6 菌株包括核苷酸序列为 SEQ ID NO: 3 的全基因组、位于该全基因组上的核苷酸序列为 SEQ ID NO: 1 的 *pheS* 基因以及核苷酸序列为 SEQ ID NO: 2 的 *recN* 基因、以及核苷酸序列为 SEQ ID NO: 4 的质体。

5 该 GKS6 菌株具有葡萄糖及乳糖以约 3:1 比例组成的多糖类，GKS6 菌株可耐受低至 pH 2.0 的胃的酸性，至少可耐受消化道中占食物比例 0.3% 的胆盐。

本发明还揭露一种可食用组合物，包括前述新颖的 GKS6 菌株。该 GKS6 菌株以菌粉的方式呈现。该可食用组合物还包括保护剂，该保护剂包括但不限于海藻糖、奶粉、聚糊精、味精、焦磷酸盐、维生素、精胺酸及其组合的成分。前述成分及比例可由所属技术领域中具有通常知识者依其熟用技艺加以修改及调整。

10 本发明还揭露一种新颖 GKS6 菌株的培养基，该培养基包括：葡萄糖及乳糖以 3:1 比例组成的碳源、包含酵母萃取物的氮源。在一具体实施例中，氮源还包括牛肉萃取物。

本发明还揭露一种培养新颖 GKS6 菌株的方法，包括：将 GKS6 菌株无菌接种于培养基中并培养于 37℃，其中该培养基包含碳源及氮源，碳源由葡萄糖及乳糖为 3:1 的比例组成，且氮源包含酵母萃取物。

15 本发明还揭露一种将新颖 GKS6 菌株制备用于治疗或预防代谢症候群引起的肥胖的医药组成物的用途。该 GKS 菌株可促进体内脂肪排出，有效减缓高油脂食物引起的肥胖，进而开发为用于治疗或预防肥胖的医药组成物或可食用组合物。

附图说明

20 本发明的上述目的及优点在参阅以下详细说明及附图之后对那些本领域技术人员将变得更立即地显而易见。

图 1 显示本发明副干酪乳杆菌 GKS6 与其它乳酸菌品系的 *pheS* 基因的演化树示意图。

图 2 显示本发明副干酪乳杆菌 GKS6 与其它乳酸菌品系的 *recN* 基因的演化树示意图。

图 3 显示本发明副干酪乳杆菌 GKS6 与其它市售副干酪乳杆菌的耐酸性示意图。

25 图 4 显示本发明副干酪乳杆菌 GKS6 与其它市售副干酪乳杆菌的耐胆盐能力示意图。

图 5 显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的初始体重、最终体重以及体重变化量示意图。

图 6 显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏以及肾脏重量示意图。

30 图 7 显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳

杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的不同部位 (肾周围、副睪、肠系膜、腹膜外以及腹股沟) 脂肪组织的重量相对于大鼠体重的脂肪量示意图。

图 8 显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的不同类型脂肪组织 (总体脂、内脏脂肪组织以及皮下脂肪组织) 相对于大鼠体重的脂肪量示意图。

图 9 显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的肝脏总脂质、三酸甘油酯以及胆固醇的含量示意图。

图 10 显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的血清 AST 以及 ALT 的含量示意图。

图 11 显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的血清三酸甘油酯、胆固醇以及高密度脂蛋白的含量示意图。

图 12 显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的血清酮体的含量示意图。

图 13 显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的血清尿酸的含量示意图。

图 14 显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的干燥粪便中脂质的含量示意图。

图 15 显示 C57BL/6JNarl 小鼠管喂 14 天后口服葡萄糖耐受性试验的血糖值变化示意图。

图 16 显示 C57BL/6JNarl 小鼠管喂 14 天后口服葡萄糖耐受性试验的 120 分钟血糖曲线下面积 (AUC_{120min}) 的变化示意图。

图 17 显示 C57BL/6JNarl 小鼠管喂 14 天后口服葡萄糖耐受性试验的血糖上升值变化示意图。

图 18 显示 C57BL/6JNarl 小鼠管喂 14 天后口服葡萄糖耐受性试验的 120 分钟血糖上升曲线下面积 ($iAUC_{120min}$) 的变化示意图。

具体实施方式

本案所提出的发明将可由以下的实施例说明而得到充分了解, 使得本领域技术人员可以据以完成, 然而本案的实施并非可由下列实施例而被限制其实施型态, 本领域技术人员仍可依据除既揭露的实施例的精神推演出其它实施例, 该等实施例皆当属于本发明的范围。

实施例 1、新颖副干酪乳杆菌的筛选及鉴定

本发明新颖的副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) GKS6 (简称 GKS6) 是由新生儿粪便检体中筛选得到。为了得到能够改善代谢症候群疾病的新颖菌株, 设定以下筛选条件:

1. 母体年纪低于 35 岁, 此为最适怀胎哺育幼儿的年龄。
- 5 2. 母体在怀孕过程无因罹病而用药治疗, 母体具有良好免疫力及健康。
3. 母体具有无过敏症状的良好体质。
4. 母体产检一切正常, 无使用安胎药物, 且其胎儿在孕期中健康长大。
5. 母体自然产出新生儿。
6. 新生儿经筛选后无带有特定过敏源且其病理检查正常。
- 10 7. 新生儿获选条件为出生一周内, 以利筛选原始生长于肠道的菌株。

经过以上筛选条件, 由 15 个出生一周内新生儿的粪便检体, 经由该发明技术领域熟知的微生物实验技术初步分离出约 300 株乳酸菌。进一步以耐酸性试验以及周边血液单核细胞 (PBMC) 筛选平台的干扰素- γ (IFN- γ) 诱导能力作为筛选指标, 由约 300 株乳酸菌中筛选得到本发明新颖的副干酪乳杆菌 GKS6, 其具有最佳的高耐酸特性及 IFN- γ 诱导能力 (91 pg/mL), 该 IFN- γ 诱导能力较已知的鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus* GG, 简称 LGG 菌) 的 36.5 pg/mL IFN- γ 诱导能力高出约 2.5 倍。

GKS6 是由一新生儿女婴的粪便中分离、筛选而得, 可于 37°C 下的 MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) 选择性 (洋菜) 培养基中生长良好。以无菌技术将 GKS6 菌株划线在 MRS 培养基中活化, 再以无菌技术勾取单一的 GKS6 菌落接种至 MRS 培养基中扩增, 隔日收取新鲜 GKS6 菌体。以十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyl trimethyl-ammonium bromide, CTAB) 法抽取菌株基因组 DNA (genomic DNA, gDNA), 再以 0.6% 琼脂胶体电泳确认 gDNA 品质。经适度浓缩后以第三代定序技术平台 PacBio RSII (Pacific Biosciences of California, Inc., CA, USA) 进行 GKS6 菌株的全基因组分析, 其中 GKS6 菌株的全基因组长度为 3,076,381 bp (SEQ ID NO: 3), 并包含 81,241 bp 的质体 (SEQ ID NO: 4)。将 GKS6 全基因组序列的编码送入全基因组资料库进行比对, 获得 GKS6 菌株的 *pheS* 基因序列 (SEQ ID NO: 1) 及 *recN* 基因序列 (SEQ ID NO: 2)。再将 *pheS* 基因序列送入美国国家生物技术资讯中心 (NCBI) 资料库进行比对, 结果显示 GKS6 菌株与副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 最为接近, 从而确认 GKS6 菌株为副干酪乳杆菌, 但其前述基因序列与资料库中其它副干酪乳杆菌有所差异, 因此本发明副干酪乳杆菌 GKS6 为新颖的微生物菌株。

为进一步确认 GKS6 菌株的独特性, 将 GKS6 菌株与随机挑选且购买自财团法人食品工

业发展研究所生物资源保存与研究中心的 5 株副干酪乳杆菌 BCRC 16094、BCRC 17005、BCRC 17475、BCRC 17482 以及 BCRC 80881 进行比对。

首先，抽取 GKS6 菌株以及其它 5 株市售的副干酪乳杆菌的 gDNA，再以引子对 *pheS*-F (5'-TTAACCCTCC TGGCTGAATT G-3', SEQ ID NO: 5) 及 *pheS*-R (5'-ATGGATCTTC AAACCAARC TTGA-3', SEQ ID NO: 6) 与 *recN*-F (5'-TTAACTCATG CGTCCATGTT T-3', SEQ ID NO: 7) 及 *recN*-R (5'-ATGTTACAAG AGTTAGCGAT TCATG-3', SEQ ID NO: 8)，于以 94℃ 3 分钟，再于 94℃ 30 秒、52℃ 30 秒、72℃ 1 分 30 秒 (35 个循环) 及 72℃ 5 分钟的条件进行聚合酶链反应。将反应完成的产物定序出 GKS6 菌株及这 5 株市售的副干酪乳杆菌的 *pheS* 及 *recN* 基因序列。

此外，由 NCBI 资料库下载已知的干酪乳杆菌 12A (*Lactobacillus casei* 12A) 全基因组 (基因库编号: CP006690)、副干酪乳杆菌 JCM 8130 (*L. paracasei* subsp. JCM 8130) 全基因组 (基因库编号: AP012541)、副干酪乳杆菌 KL1 (*L. paracasei* KL1) 全基因组 (基因库编号: CP013921)、副干酪乳杆菌 ATCC 334 (*L. paracasei* ATCC 334) 全基因组 (基因库编号: CP000423) 以及干酪乳杆菌 ATCC 393 (*L. casei* ATCC 393) 全基因组 (基因库编号: AP012544) 中的 *pheS* 与 *recN* 基因序列，以分子演化遗传分析 (MEGA®) 软件 “Bootstrap Test of Phylogeny” 的近邻接合 (Neighbor-Joining) 模式绘制演化树。

请参阅图 1 及图 2，其分别本发明副干酪乳杆菌 GKS6 与其它乳酸菌品系的 *pheS* 基因以及 *pheS* 基因的演化树示意图。无论是在 *pheS* 基因 (图 1) 或是 *recN* 基因 (图 2) 的演化树，GKS6 菌株均独立于其它乳酸菌品系，显现 GKS6 菌株为新颖的副干酪乳杆菌菌株。经鉴定后，本发明的副干酪乳杆菌 GKS6 于 2017 年 8 月 25 日寄存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC, 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号)，其寄存编号为 CGMCC No. 14566，且于 2017 年 8 月 26 日通过存活试验。

实施例 2、GKS6 菌株的发酵培养

本发明新颖的 GKS6 菌株为一种益生菌菌株，具有高活性表现的特殊黏多糖。经多糖结构分析，GKS6 菌株中的多糖类为葡萄糖及半乳糖以约 3:1 的比例组合而成。因此，在 GKS6 菌株的发酵培养中，以 3%葡萄糖搭配 1%乳糖进行发酵测试。另将 4%葡萄糖及 4%乳糖的组合以及葡萄糖与乳糖 (3:1) 添加比例进行测试比较，并无明显差异，因此以葡萄糖及乳糖以 3:1 比例作为发酵的碳源。

培养本发明新颖的 GKS6 菌株的氮源则选用非基改酵母萃取物、大豆分离水解蛋白质、牛肉萃取物或其组合进行试验。经正交试验交叉筛选比较测试，最佳条件为酵母抽出物及牛

肉萃取物的比例为 1%:1%，GKS6 菌数可达 4.3×10^9 cfu/mL。当采用 2%酵母抽出物为氮源时，GKS6 菌数可达 3.7×10^9 cfu/mL；而采用大豆蛋白分离水解蛋白质为氮源时，GKS6 菌数仅为 6.4×10^8 cfu/mL。因此，大豆类的蛋白质并不适合应用于 GKS6 菌株的培养。在考虑 GKS6 菌株产品需符合纯素食者的要求时，则以酵母萃取物作为氮源，进行 GKS6 菌株的高密度发酵。

当将 GKS6 菌株无菌接种于含有复合糖类碳源（3%葡萄糖及 1%乳糖）及 2%酵母萃取物的培养基并于 37℃进行高密度发酵时，GKS6 活菌数达到 1.3×10^{10} cfu/mL，达到 400%的提升。因此，本发明后续实验中，除非特别说明，否则新颖的 GKS6 菌株是以此培养条件进行培养。

进一步而言，在 GKS 菌株在冷冻干燥过程中可加入保护剂，其包括但不限于海藻糖、奶粉、聚糊精、味精、焦磷酸盐、维生素、精胺酸及其组合。因此 GKS6 菌株可以菌粉方式成为可食用组成物。

进一步而言，亦可将 GKS6 菌株与药学可接受的载体或赋形剂组合，而制备为医药组合物。有效 GKS6 菌株数量的该医药组合物较佳地适于以口服方式给予所需的个体，而用于治疗、预防或改善其代谢症候群。

实施例 3、乳酸菌耐酸试验

本发明新颖的 GKS6 菌株与市售副干酪乳杆菌 BCRC 16094、17005、17475、17482 及 80881 比较耐酸能力。此试验是将菌株活化后，以盐酸调整 MRS 培养液（MRS broth）的酸碱值至 pH 3.2、2.4 或 2.0，于 37℃培养 3 小时后，计数菌数。

请参阅图 3，其显示本发明副干酪乳杆菌 GKS6 与其它市售副干酪乳杆菌的耐酸性示意图。在图 3 中，在原始酸碱值（约 pH 6.5）的 MRS 培养液中培养下，GKS6 菌株与 BCRC 16094、17005、17475、17482 及 80881 菌株的单位菌数皆可到 10^{10} 左右，而在调整 MRS 培养液的酸碱值至 pH 2.4 及 2.0 后，发现 BCRC 16094、17005、17475、17482 及 80881 菌株的单位菌数都显著地低于 GKS6 菌株的单位菌数（ $P < 0.05$ ）。因此，本发明的 GKS6 菌株的耐酸能力较其它已知副干酪乳杆菌更好，对于通过胃酸的能力更佳。

实施例 4、乳酸菌耐胆盐试验

本发明新颖的 GKS6 菌株与市售副干酪乳杆菌 BCRC 16094、17005、17475、17482 及 80881 比较耐胆盐能力。此试验是将菌株活化后，于 37℃下将菌株接种至含 0.3%胆盐的 MRS 培养液中，浸泡 0.5 小时后计数菌数。

请参阅图 4，其显示本发明副干酪乳杆菌 GKS6 与其它市售副干酪乳杆菌的耐胆盐能力

示意图。在图 4 中,在原始 MRS 培养液的培养下,GKS6 菌株与 BCRC 16094、17005、17475、17482 及 80881 的单位菌数皆接近 9×10^9 ,而在添加 0.3%胆盐至 MRS 后,可发现 BCRC 16094、BCRC 17005、BCRC 17475、BCRC 17482 及 BCRC 80881 菌数都显著低于 GKS6 菌数 ($P < 0.05$),可得知 GKS6 菌株耐胆盐能力较其它副干酪乳杆菌更好,对于通过体内消化道胆盐的能力更佳。

实施例 5、喂食副干酪乳杆菌 GKS6 的大鼠的生理试验

本实施例的实验动物为 18 只 6 周龄且体重介于 201-225 克的雄性 Wistar 大鼠。大鼠饲养于不锈钢鼠笼,而动物房温度控制在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,湿度控制在 60-80%,光照及黑暗各 12 小时(07:00-19:00 为光照期;19:00-07:00 为黑暗期)。试验期间,大鼠自由的摄取饲料及蒸馏水。

依据上述“实施例 2、GKS6 菌株的发酵培养”段落的高密度发酵技术,将培养基中的培养液离心以获得 GKS6 菌体,并将 GKS6 菌体冷冻干燥成为 GKS6 菌粉。在冷冻干燥过程中,可加入保护剂(包括但不限于海藻糖、奶粉、聚糊精、味精、焦磷酸盐、维生素、精胺酸及其组合)于 GKS6 菌体中。后续试验所使用的 GKS6 菌株即为 GKS6 菌粉。

首先,喂予 Wistar 大鼠正常的成鼠饲料及饮用蒸馏水,适应环境 1 周后,将其随机分为三组。试验样品以口服方式喂食,分组如下:

1. 正常饮食组(normal diet, ND)($n = 6$ 只)
2. 高脂饮食组(high-fat diet, HFD)($n = 6$ 只)
3. 高脂饮食组给予 GKS6(HFD + GKS6)($n = 6$ 只)

高脂饮食组的饲料配方是以 AIN93G 为基础,辅以调整油脂比例,高脂饮食组包含 68% 饲料固形物、7%大豆油及 25%猪油。而在 HFD + GKS6 组中,除了与高脂饮食组相同的饲料配方外,以口服方式喂食 102.8 mg/kg 大鼠/日的 GKS6 菌株达 6 周。

试验开始先记录大鼠的初始体重,之后每 2 天精称体重并观察其变化。给予试验样品的时间为 6 周,处死前 3 天收集大鼠粪便,并于试验结束前 12 小时禁食。以二氧化碳处死大鼠,并记录大鼠最终体重及体重变化量。此外,从大鼠的静脉采集血液,作为后续的血清生化分析。同时,取出脏器组织(心脏、肝脏、脾脏、肺脏及肾脏)以及脂肪组织(肾周围脂肪组织(perirenal adipose tissue)、副睾脂肪组织(epididymal adipose tissue)、肠系膜脂肪组织(mesenteric adipose tissue)、腹膜外脂肪组织(retroperitoneal adipose tissue)及腹股沟脂肪组织(inguinal adipose tissue),以生理食盐水清洗并擦拭,精称并记录各个脏器及脂肪组织的重量。各种脂肪组织重量的总和为总脂肪重量,总脂肪重量除以最终体重则为体脂肪率。

以铝箔纸包覆称量后的脏器及脂肪组织，并以液态氮冷冻，储存于-80℃，以供实验分析使用。

以 SPSS 电脑统计软件分析前述的实验数据。以 PROC ANOVA 以及 Duncan' s multiple range test 进行变异数分析， $p < 0.05$ 为具有显著性差异。

5 (1) 体重变化：

请参阅图 5，其显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的初始体重、最终体重以及体重变化量示意图。体重变化量以下述式(1)计算：

$$\text{体重变化量 (g)} = \text{最终体重 (g)} - \text{初始体重 (g)} \quad \text{式(1)}$$

10 在图 5 中，各组间的初始体重并无显著差异 ($p > 0.05$)。高脂饮食组的最终体重显著地高于正常饮食组 ($p < 0.05$)。而以高脂饮食诱导肥胖的大鼠并给予 GKS6 菌株的组别则可显著地降低最终体重 ($p < 0.05$) 及体重变化量 ($p < 0.05$)，表明本发明新颖的 GKS6 菌株可有效降低由高脂饮食引起的体重增加。

(2) 脏器重量：

15 请参阅图 6，其显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏以及肾脏重量示意图。在图 6 中，大鼠的脾脏及肺脏重量在各组间没有显著变化；高脂饮食组的心脏、肝脏及肾脏的重量高于正常饮食组，而喂食 GKS6 菌株的组别的心脏、肝脏及肾脏重量相较于高脂饮食组则明显下降 ($p > 0.05$)。因此，服用本发明新颖的 GKS6 菌株能有效降低心脏、肝
20 脏及肾脏的重量，减缓因高脂饮食所引起的脏器肥大。

(3) 脂肪重量变化：

请参阅图 7，其显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的不同部位 (肾周围、副睪、肠系膜、腹膜外以及腹股沟) 脂肪组织的重量相对于大鼠体重的脂肪量示意图。在图 7 中，高脂饮食诱导
25 的肥胖大鼠的脂肪组织重量显著地高于正常饮食组 ($p < 0.05$)；而高脂饮食合并给予 GKS6 的组别相较于单纯给予高脂饮食组，各种脂肪重量都显著地下降，表明在高脂饮食下本发明新颖的 GKS6 菌株能有效地降低动物全身各脂肪的堆积 ($p < 0.05$)。

学理上，脂肪组织被区分为内脏脂肪及皮下脂肪，其中肾周围脂肪、副睪脂肪及肠系膜脂肪属于内脏脂肪，腹股沟脂肪及腹膜外脂肪属于皮下脂肪，而各种脂肪组织的重量总和则为总脂肪量。内脏脂肪及皮下脂肪量分别以式(2)及式(3)计算，总脂肪量以式(4)计算。
30

内脏脂肪量(mg/g 大鼠)=[肾周围脂肪量(mg)+副睪脂肪量(mg)+肠系膜脂肪量(mg)] ÷最终体重(g) 式(2)

皮下脂肪量(mg/g 大鼠)= [腹股沟脂肪(mg)+腹膜外脂肪量(mg)] ÷最终体重(g) 式(3)

总脂肪量(mg/g 大鼠)=[肾周围脂肪量(mg)+副睪脂肪量(mg)+肠系膜脂肪量(mg)+腹股沟脂肪(mg)+腹膜外脂肪量(mg)] ÷最终体重(g) 式(4)

请参阅图 8, 其显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的不同类型脂肪组织 (总体脂、内脏脂肪组织以及皮下脂肪组织) 相对于大鼠体重的脂肪量示意图。在图 8 中, 高脂饮食诱导的大鼠的内脏脂肪组织重量显著地高于正常饮食组 ($p < 0.05$); 高脂饮食合并给予 GKS6 的组别相较于单纯给予高脂饮食组, 在内脏脂肪和皮下脂肪组织的重量皆显著地低于高脂饮食组 ($p < 0.05$); 表明不论在内脏脂肪或皮下脂肪, 本发明新颖的 GKS6 菌株能有效地减少因高脂饮食造成的脂肪堆积。

(4) 肝脏脂质含量:

在此试验中, 将称重后的大鼠肝脏组织加入萃取溶剂 (氯仿:甲醇 = 2:1 (v/v)) 并以均质机磨碎, 过滤至有盖试管, 以萃取液定量至 10 mL, 加入 2 mL 的 0.05% (w/v) CaCl_2 , 于 4°C 以 $3,500 \times g$ 离心 3 分钟。去除上层液后再以氯仿:甲醇:水 = 3:48:47 (v/v/v) 定量至 12 mL, 于 4°C 以 $3,500 \times g$ 离心 3 分钟。去除上层液后加入甲醇至 10 mL, 再以萃取溶剂 (氯仿:甲醇 = 2:1 (v/v)) 定量至 25 mL, 收集于样品瓶中并储存于 -20°C。以市售试剂组分析总胆固醇及三酸甘油酯。

请参阅图 9, 其显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的肝脏总脂质、三酸甘油酯以及胆固醇的含量示意图。在图 9 中, 单纯给予高脂饮食的组别在肝脏总脂质、三酸甘油酯和胆固醇的含量均显著地高于正常饮食控制组 ($p < 0.05$), 而高脂饮食合并给予 GKS6 的组别的肝脏总脂质、三酸甘油酯和胆固醇的含量相对于单纯给予高脂饮食组别, 在统计学上都有意义的明显降低 ($p < 0.05$), 此表明本发明新颖的 GKS6 菌株能有效地减少因高脂饮食所导致的肝脏的脂质堆积。

(5) 肝指数测定:

将大鼠处死后的血液收集于血清分离管 (BD Vacutainer®, Plymouth, UK), 以 4,000 rpm 离心 10 分钟, 将血清置于微量离心管中并储存于 -80°C。以市售分析套组 (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Germany) 测定 AST、ALT。

请参阅图 10，其显示正常饮食的控制组（ND）、高脂饮食组（HFD）以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组（HFD + GKS6）大鼠的血清 AST 以及 ALT 的含量示意图。在图 10 中，高脂饮食组大鼠血清的 ALT 及 AST 显著地高于正常饮食组（ $p < 0.05$ ），表明其肝脏发炎程度较高；然而，高脂饮食诱导的大鼠合并给予 GKS6 的组别，相较于高脂饮食组，可显著地降低血清 ALT 及 AST 浓度（ $p < 0.05$ ），表明服用本发明新颖的 GKS6 菌株可有效地降低血清 ALT 和 AST 浓度，以改善肝功能。

（6）血清脂质含量：

此试验是以市售分析套组（DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Germany）测定大鼠血清的三酸甘油酯、总胆固醇及高密度脂蛋白胆固醇的含量，实验结果如图 11 所示。

结果显示，高脂饮食组大鼠血清的三酸甘油酯及胆固醇显著地高于正常饮食组（ $p < 0.05$ ）。相对于高脂饮食组，高脂饮食诱导的大鼠合并给予 GKS6 的组别的三酸甘油酯及胆固醇含量显著地降低。此外，高脂饮食组大鼠血清的高密度脂蛋白胆固醇显著地低于正常饮食组（ $p < 0.05$ ）。相对于高脂饮食组，高脂饮食诱导的大鼠合并给予 GKS6 的组别的高密度脂蛋白胆固醇含量显著地提升，表明服用本发明新颖的 GKS6 菌株能有效提高血清中高密度脂蛋白胆固醇的浓度。

（7）酮体：

本试验是以市售分析套组（Denka Seiken Co. Ltd., Taipei City, Taiwan）测定大鼠血清的酮体，实验结果如图 12 所示。结果显示，高脂饮食组大鼠血清的酮体含量显著地高于正常饮食组（ $p < 0.05$ ）；经高脂饮食诱导的大鼠合并给予 GKS6 的组别则显著地降低因高脂饮食引起的血清酮体浓度上升情形（ $p < 0.05$ ），表明服用本发明新颖的 GKS6 菌株能有效降低血清中酮体浓度。

（8）尿酸：

本试验是以市售分析套组（DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Germany）测定大鼠血清的尿酸，实验结果如图 13 所示。结果显示，高脂饮食组大鼠血清的尿酸含量显著地高于正常饮食组；高脂饮食合并给予 GKS6 的组别与高脂饮食组相比则显著地降低血清中尿酸浓度（ $p < 0.05$ ）至正常饮食组的水准，表明施予本发明新颖的 GKS6 菌株能有效降低血清中尿酸浓度。

（9）脂肪排出效果：

在本试验中，收集大鼠处死前 3 天的粪便，称重后磨碎。将萃取溶剂（氯仿：甲醇 = 2:1 (v/v)）加至磨碎的粪便，振荡混合后以滤纸过滤。加入 0.05% CaCl_2 至滤液并混匀，于 4℃

以 $3,500 \times g$ 离心 5 分钟。去除上清液，再以萃取溶剂定量至 25 mL，储存于 -20°C 。当欲测定粪便脂质浓度时，以减压浓缩方式干燥 10 μL 的粪便脂质萃取液，加入市售试剂组的 1,000 μL 反应剂并混匀，置于 37°C 水浴 5 分钟，再以分光光度计、于 500 nm 波长下测量吸光值，与标准液吸光值对照换算而获得粪便脂质浓度。

5 请参阅图 14，其显示正常饮食的控制组 (ND)、高脂饮食组 (HFD) 以及高脂饮食组给予副干酪乳杆菌 GKS6 组 (HFD + GKS6) 大鼠的干燥粪便中脂质的含量示意图。在图 14 中，高脂饮食组大鼠粪便的总脂质显著地高于正常饮食组 ($p < 0.05$)；但高脂饮食合并给予 GKS6 的组别相较于高脂饮食组，粪便脂质的排出量显著地提高 ($p < 0.05$)，表明高脂饮食所导致的大鼠给予 GKS6 能有效地透过排便方式排出脂质。

10 实施例 6、副干酪乳杆菌 GKS6 改善葡萄糖敏感性的能力

本实施例的目的在于试验 GKS6 菌株改善葡萄糖敏感性的能力。实验动物为 20 只雄性 C57BL/6JNarl 小鼠。经过一周的观察期，小鼠被随机分组，每笼饲养 5 只。饲养小鼠的垫料为经灭菌的木屑垫料 (ASPEN shavings, Northeastern Products Corp., Warrensburg, NY 12885, U.S.A.)，每周更换 2 次。小鼠按一般的实验动物饲养管理方法饲养，动物房的温度控制在 15 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度控制在 $50 \pm 10\%$ ，光照及黑暗各 12 小时。试验期间，小鼠自由的摄取饲料及蒸馏水。

将小鼠随机分为 2 组，分别为对照组 ($n = 10$) 及 GKS6 实验组 ($n = 10$)。实验组灌食剂量为 500 mg/kg 小鼠重量的 GKS6 菌株，灌食体积为 0.1 mL/10 g 体重/日，共灌食 14 日。对照组则给予正常饲料及蒸馏水，不给予 GKS6 菌株。

20 (1) 口服葡萄糖耐受性试验 (oral glucose tolerance test, OGTT)

首先，让 C57BL/6JNarl 小鼠禁食 16 小时，从尾端采集血液样本，以 Glucosure II 血糖机 (ApexBio Inc., Taiwan) 搭配血糖测试片 (葡萄糖氧化酵素法) 检测小鼠的空腹 (0 分钟) 血糖值。再管喂葡萄糖溶液 (2 g/kg 小鼠体重)，之后在 30、60 及 120 分钟各自检测血糖值。

(2) 摄食量、饮水量以及脏器重量：

25 喂食期间，每周量测体重一次、饲料摄取量及饮水量各二次。于 OGTT 之后处死小鼠，取出肝脏、肾藏及脾脏，并称重。

(3) 统计分析：

实验结果以 “Mean $\pm$ SD” 表示，以 Student's t-test 进行 GKS6 实验组与对照组之间的比较。

30 (4) 结果：

请参阅表 1，于管喂 14 天后，GKS6 实验组的体重及总体增重（克数及百分比）均显著低于对照组（ $p < 0.01$ ）。在此管喂期间，GKS6 实验组的饮水量及饲料摄取量则与对照组之间并无统计上显著的差异性（表 2）。与前述体重及总体增重的变化趋势相同的是，GKS6 实验组的肾脏重量也是显著地较对照组低，但可能因小鼠体重也较轻，其相对重量比则与对照组没有统计上显著差异（表 3）。

表 1、试验期间各组 C57BL/6JNarl 小鼠的体重及总体增重变化

组别	体重(克)		总体增重	
	喂食前	喂食后	克	%
对照组	22.8±1.0	24.2±1.2	1.4±0.5	6.1±1.99
GKS6 实验组	22.3±1.0	23.0±1.2	0.7±0.4**	3.12±1.73**

**表示与对照组之间 $p < 0.01$

表 2、试验期间各组 C57BL/6JNarl 小鼠之平均每日摄食量及饮水量

组别	摄食量(克/日/小鼠)	饮水量(mL/日/小鼠)
对照组	2.9±0.1	4.4±0.2
GKS6 实验组	2.7±0.1	3.8±0.1

表 3、试验期间各组 C57BL/6JNarl 小鼠脏器重量及相对重量

组别	重量(克)			相对重(%)		
	肝脏	肾脏	脾脏	肝脏	肾脏	脾脏
对照组	1.18±0.12	0.32±0.02	0.06±0.01	4.89±0.50	1.31±0.06	0.23±0.03
GKS6 实验组	1.17±0.10	0.29±0.02	0.05±0.01	5.09±0.26	1.27±0.06	0.22±0.03

在口服葡萄糖耐受性试验方面，GKS6 实验组的 30 分钟血糖值显著地低于对照组（表 4、图 15）。GKS6 实验组的 120 分钟血糖曲线下面积（area under curve, AUC_{120min} ）亦略低于对照组（ $p < 0.05$ ）（表 4、图 16）。而 GKS6 实验组的 30 分钟血糖上升值（i30 分钟）以及 120 分钟血糖上升曲线下面积（iAUC_{120min}）都明显地低于对照组（表 5、图 17、图 18），且 GKS6 实验组的 120 分钟血糖上升值（i120 分钟）也显著地较对照组为低（表 5、图 17）。

表 4、管喂 14 天后，各组 C57BL/6JNarl 小鼠于口服葡萄糖耐受性试验的血糖值及血糖曲线下面积

组别	血糖值(mg/dL)				iAUC _{120min} (min.mg/dL)
	0 分钟	30 分钟	60 分钟	120 分钟	
对照组	78.5±3.1	337.1±12.0	235.6±11.1	161.4±9.5	26736±957
GKS6 实验组	82.7±2.5	295.6±13.6*	216.4±9.5	143.6±5.5	24153±798*

*表示与水对照组之间 $p < 0.05$ 。

5 表 5、管喂 14 天后，各组 C57BL/6JNarl 小鼠于口服葡萄糖耐受性试验的血糖上升值及血糖上升曲线下面积

组别	血糖上升值(mg/dL)				AUC _{120min} (min.mg/dL)
	i0 分钟	i30 分钟	i60 分钟	i120 分钟	
对照组	258.7±10.0	157.2±9.5	83.0±8.8	258.7±10.0	17322±717
GKS6 实验组	212.9±13.3*	133.7±9.6	60.9±5.0*	212.9±13.3*	14229±774**

*及**分别表示与对照组之间 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$

综上所述，显示在 500 mg/kg 小鼠重量的 GKS6 菌株的剂量下，GKS6 菌株具有改善葡萄糖敏感性的潜力。

因此，本案从健康女婴粪便中分离出一株副干酪乳杆菌亚种 GKS6，该菌株 GKS6 具备耐酸、耐胆盐能力，能在食用后通过消化道到达肠道，借此协助食物的消化分解，使脂质排出量增加，并有效降低体脂与血脂。

然而，由于如前所提及的由肥胖导致的症状及疾病可以得知，肥胖全面性地改变生理环境，引起的是身体在多种不同面向上的病变。因此，具有单一功效的菌株无法满足由肥胖引起的多种症状的缓解需求，在预防及/或治疗的医药领域中仍有发展具复合性功效的菌株的必要，以更有效地同时针对肥胖相关的病症达到改善的效果。

因此，上述亦说明了肠道菌相与消化吸收的关系，且并非所有益生菌都能在服用后顺利抵达肠道，它必须要具备耐胃酸，耐胆盐，且具优良的肠道吸附能力能活着抵达肠道，否则进入肠道后变成死菌，那么原本标榜的功效就无法完全发挥了。

本发明实属难能的创新发明，深具产业价值，援依法提出申请。此外，本发明可以由本
5 领域技术人员做任何修改，但不脱离如所附权利要求书所要保护的范围。

PCT

打印件(原件为电子形式)

0-1	PCT/RO/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	CEPCT 版本 10.18.26 MT/FOP 20140331/0.20.5.21
0-2	国际申请号	PCT/CN2018/094085
0-3	申请人或代理人的档案号	PIDC6180001

1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	2页
1-2	行号:	29行
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
1-3-2	保藏单位地址	中国微生物菌种保藏委员会, 中国北京市2714信箱, 邮政编码:100080, Beijing (CN)。
1-3-3	保藏日期	2017年 8月 25日 (25.08.2017)
1-3-4	保藏号	CGMCC 14566
1-4	补充说明	
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
1-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	授权官员	

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	授权官员	

权 利 要 求 书

1、一种可食用组合物，包括寄存编号为 CGMCC No. 14566 的副干酪乳杆菌 GKS6 (*Lactobacillus paracasei* GKS6)。

5 2、如权利要求 1 所述的可食用组合物，其特征在于，所述副干酪乳杆菌 GKS6 以菌粉的方式呈现，所述可食用组合物还包括保护剂，所述保护剂选自海藻糖、奶粉、聚糊精、味精、焦磷酸盐、维生素、精胺酸及其组合所组成的群组其中之一。

3、一种副干酪乳杆菌 GKS6 (*Lactobacillus paracasei* GKS6) 的培养基，其中所述副干酪乳杆菌 GKS6 的寄存编号为 CGMCC No. 14566，所述培养基包括：

10 碳源，由葡萄糖及乳糖以 3:1 的比例组成；以及
氮源，包含酵母萃取物。

4、如权利要求 3 所述的培养基，其特征在于，所述氮源还包括牛肉萃取物。

5、一种培养副干酪乳杆菌 GKS6 (*Lactobacillus paracasei* GKS6) 的方法，其中所述副干酪乳杆菌 GKS6 的寄存编号为 CGMCC No. 14566，所述方法包括：

15 将所述副干酪乳杆菌 GKS6 无菌接种于培养基中并培养于 37°C，其中所述培养基包含碳源及氮源，所述碳源由葡萄糖及乳糖以 3:1 的比例组成，且所述氮源包含酵母萃取物。

6、一种医药组合物，包括寄存编号为 CGMCC No. 14566 的副干酪乳杆菌 GKS6 (*Lactobacillus paracasei* GKS6)。

20 7、一种将副干酪乳杆菌 GKS6 (*Lactobacillus paracasei* GKS6) 制备用于治疗或预防代谢症候群引起的肥胖的医药组成物的用途，其中所述副干酪乳杆菌 GKS6 的寄存编号为 CGMCC No. 14566。

8、一种经分离的菌株，其中所述菌株为副干酪乳杆菌 GKS6 (*Lactobacillus paracasei* GKS6)，且其寄存编号为 CGMCC No. 14566。

25 9、如权利要求 8 所述的菌株，其特征在于，所述菌株包括核苷酸序列为 SEQ ID NO: 1 的 *pheS* 基因、核苷酸序列为 SEQ ID NO: 2 的 *recN* 基因、核苷酸序列为 SEQ ID NO: 3 的全基因组以及核苷酸序列为 SEQ ID NO: 4 的质体，且所述 *pheS* 基因及所述 *recN* 基因位于所述全基因组上。

10、如权利要求 8 所述的菌株，其特征在于，所述菌株具有葡萄糖及乳糖的比例为 3:1 的多糖类，所述菌株耐受胃的酸性低至 pH 2.0，且所述菌株耐受消化道至少 0.3% 的胆盐。

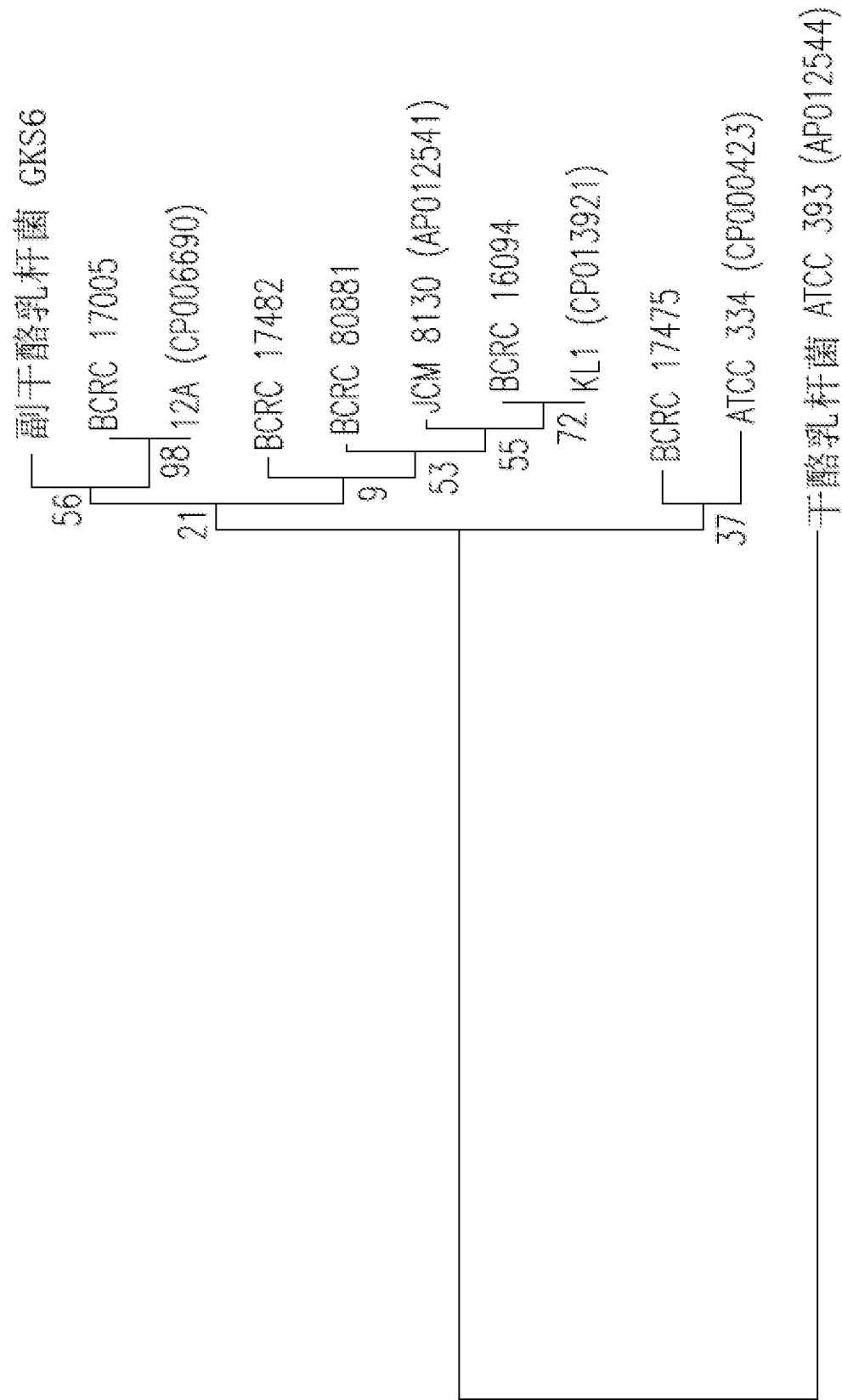


图1

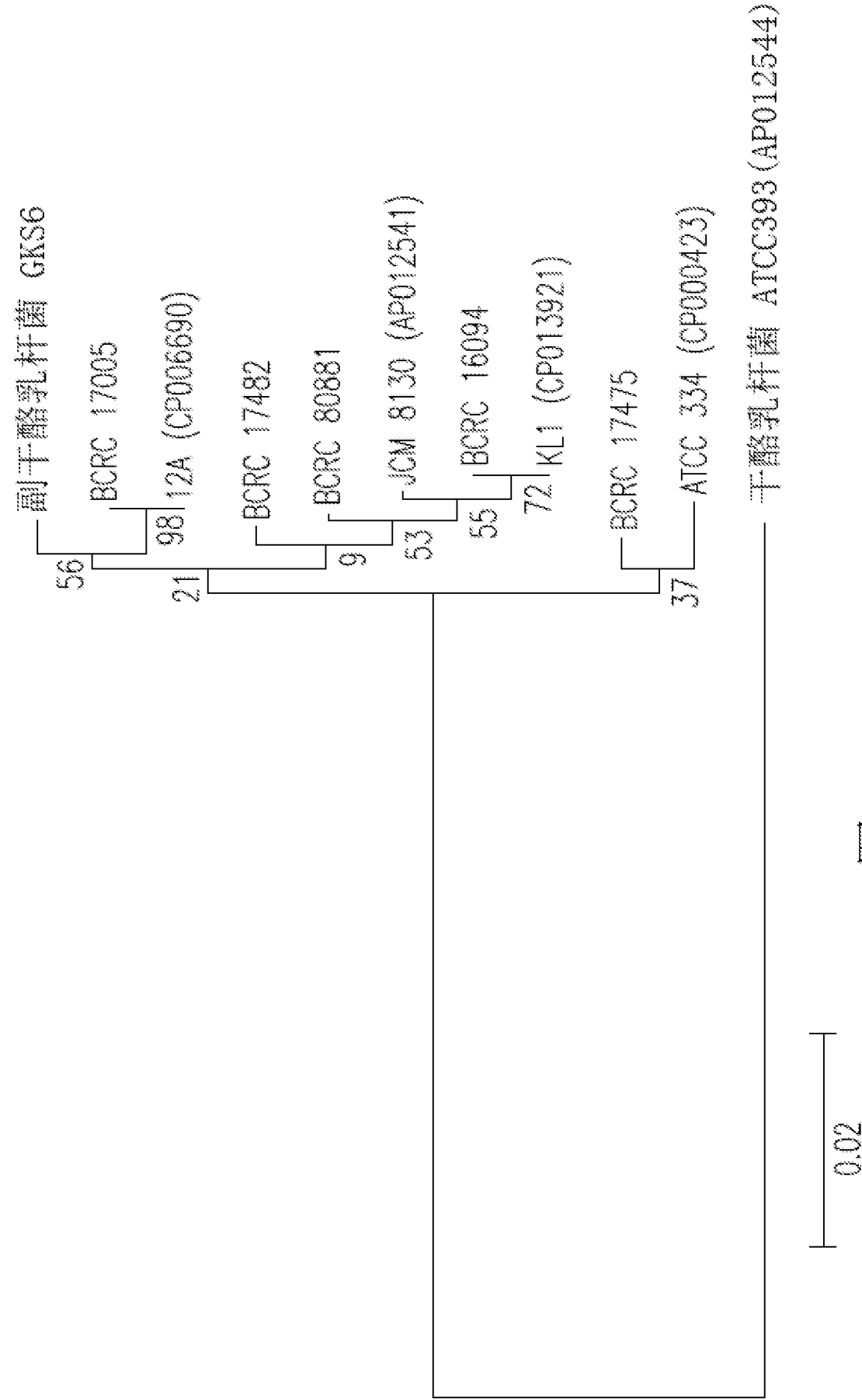


图2

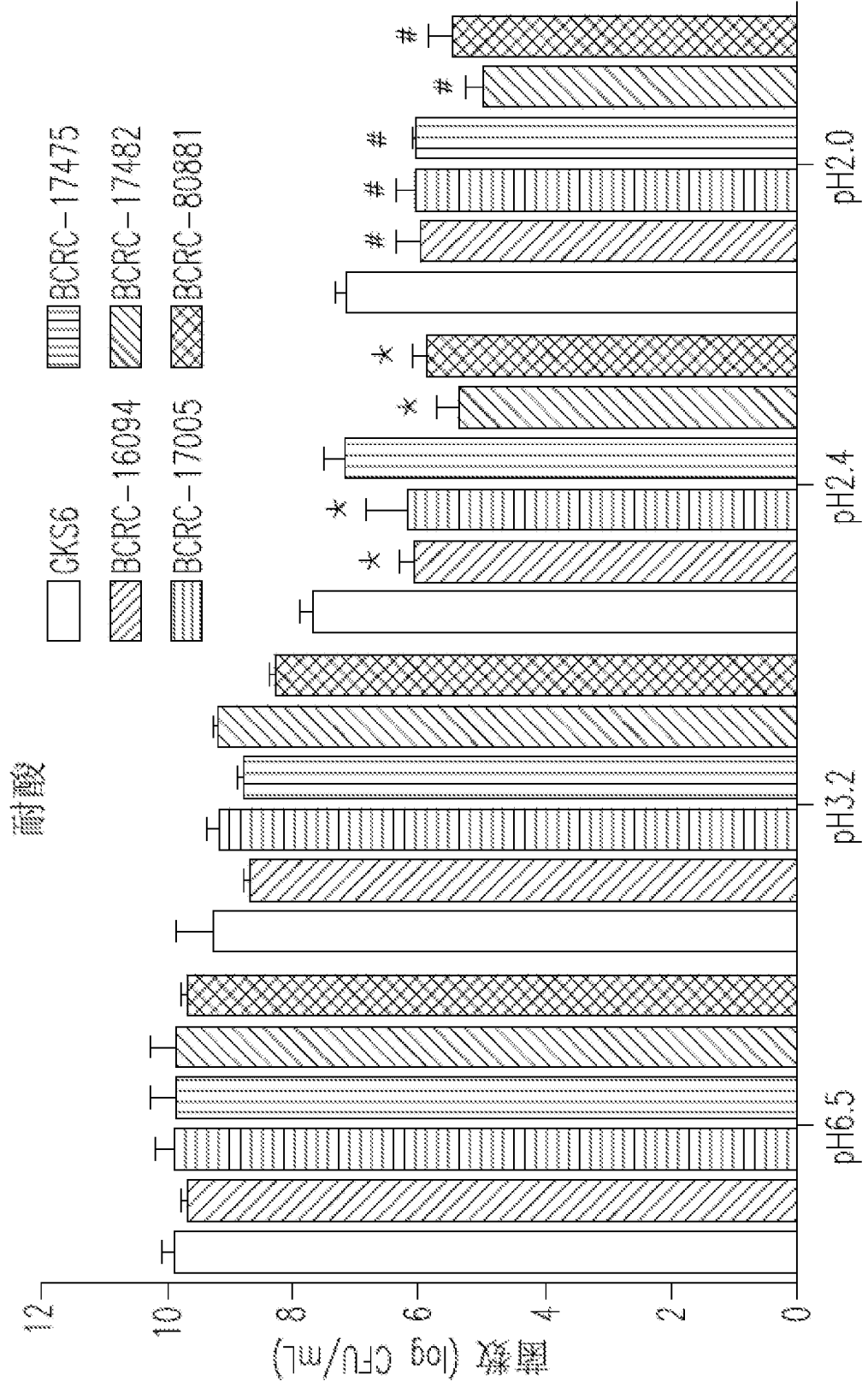


图3

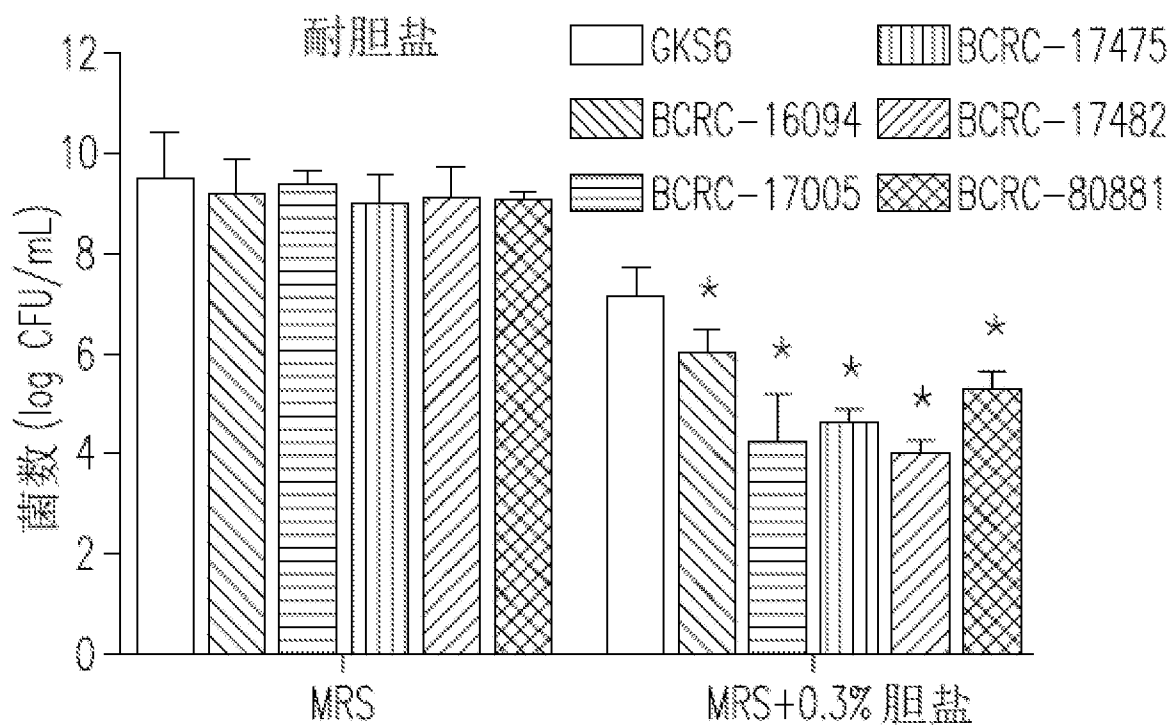


图 4

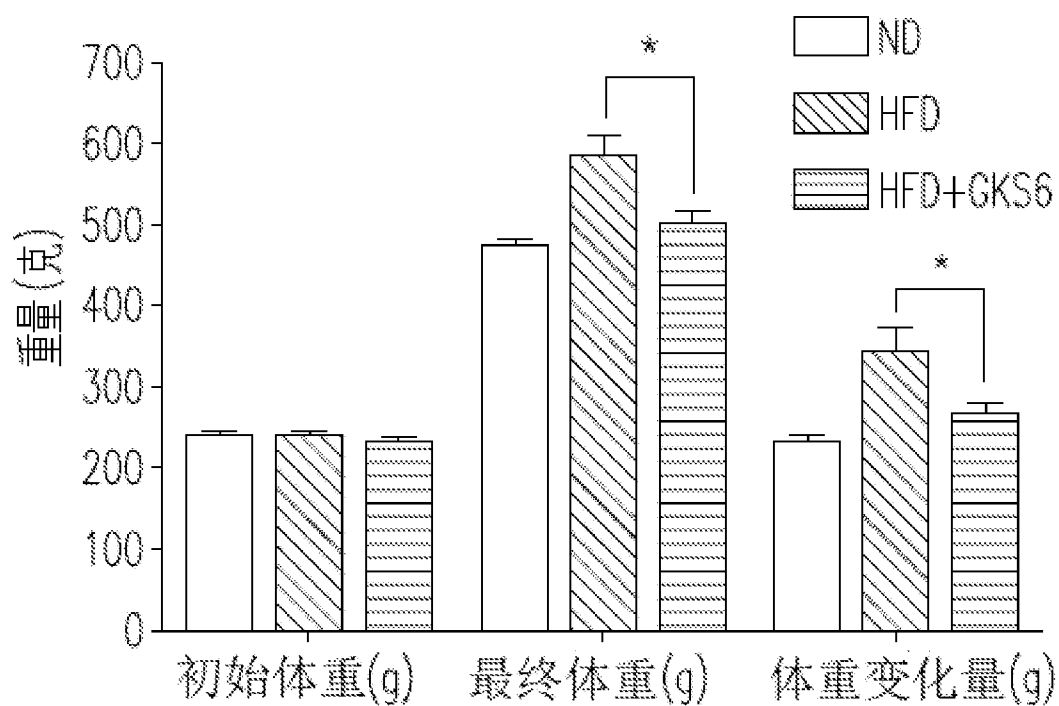


图 5

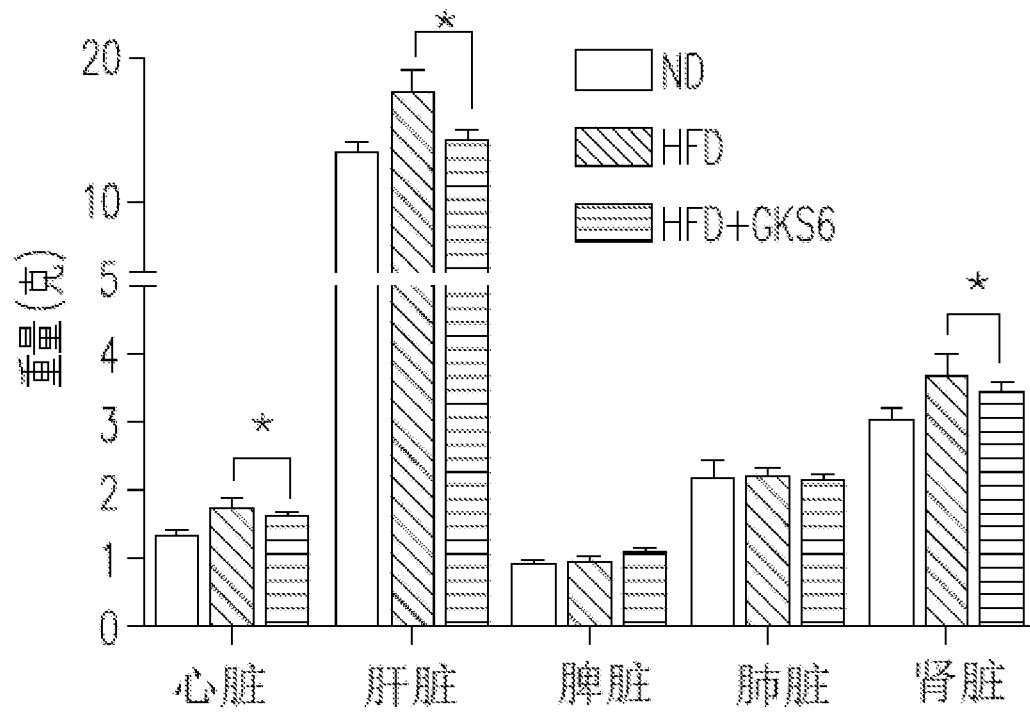


图 6

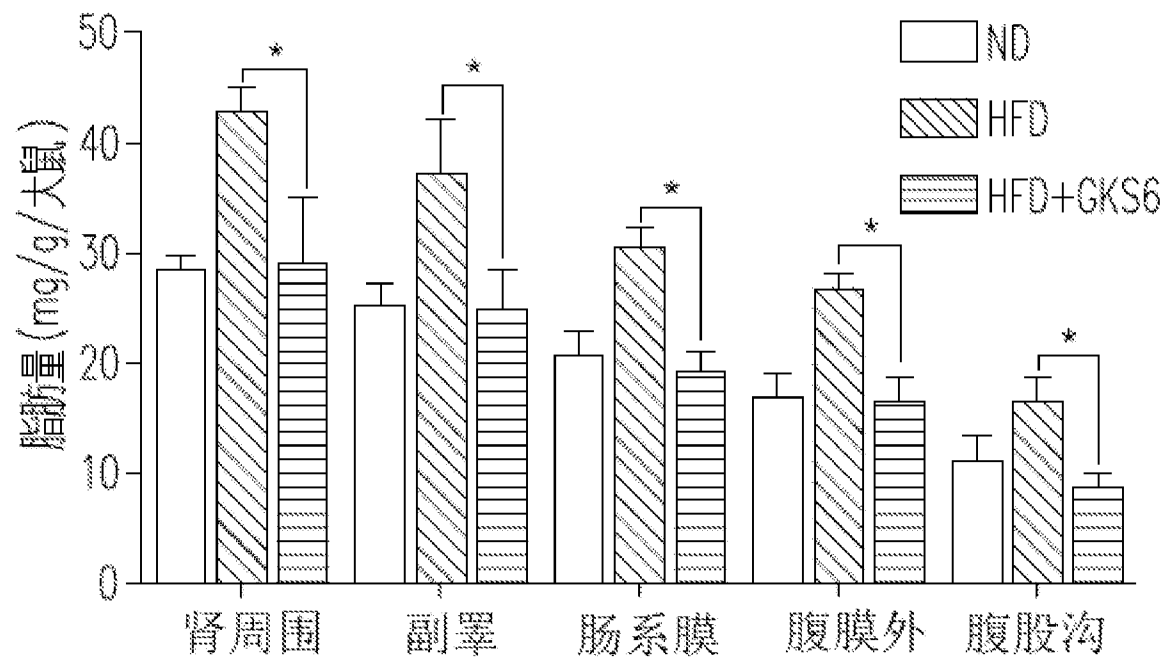


图 7

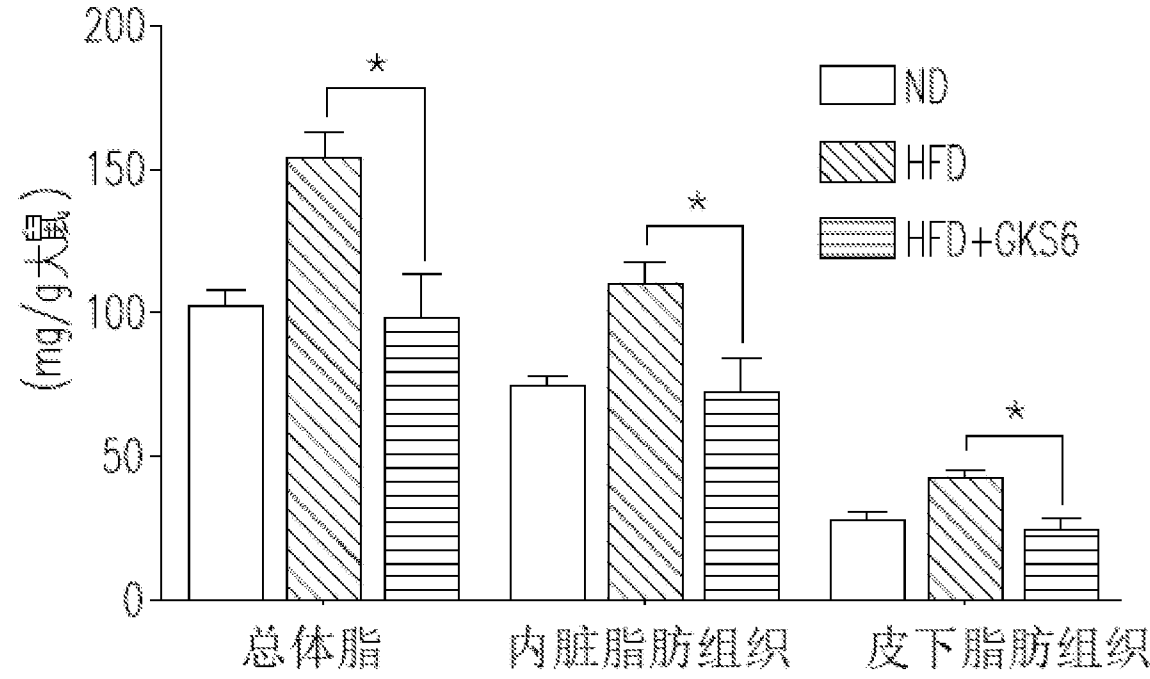


图 8

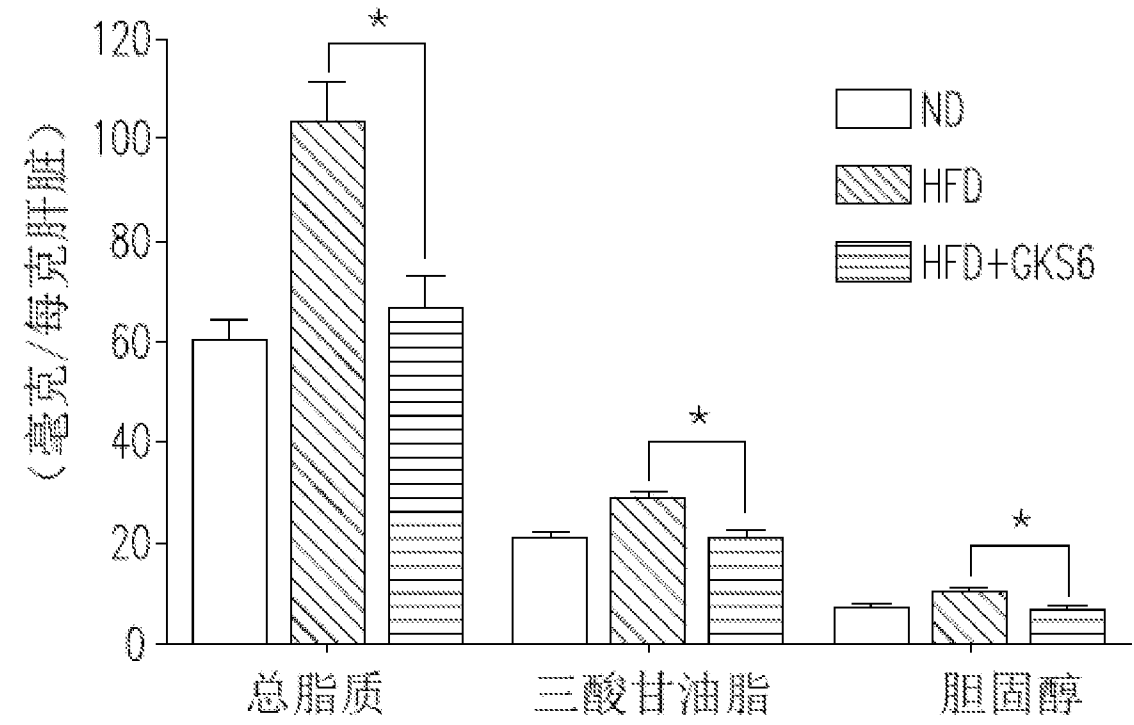


图 9

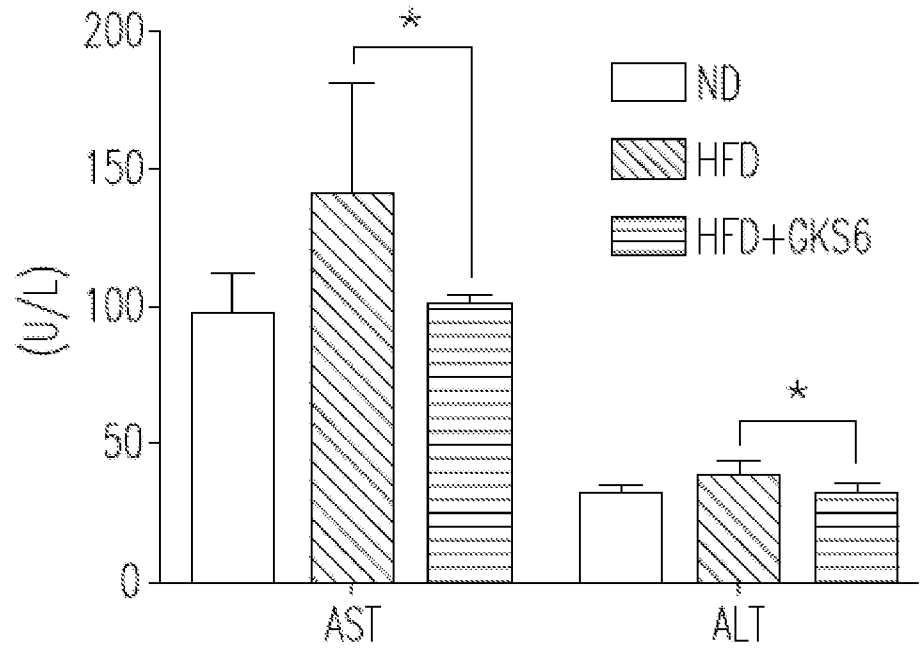


图 10

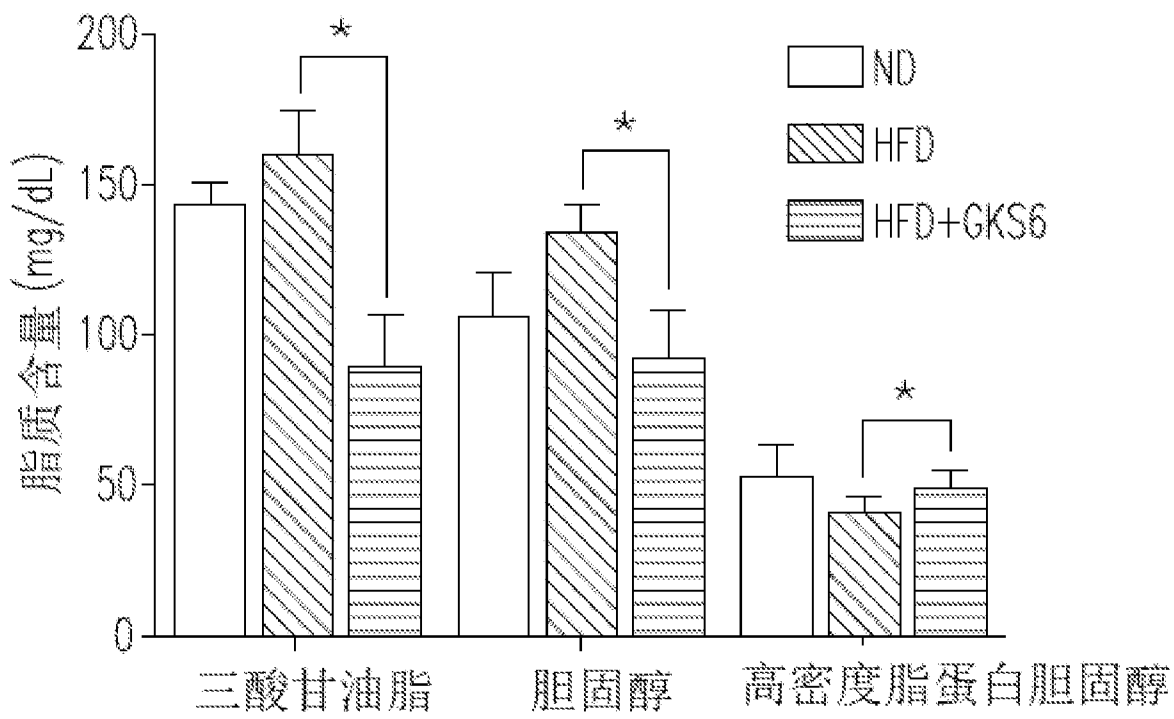


图 11

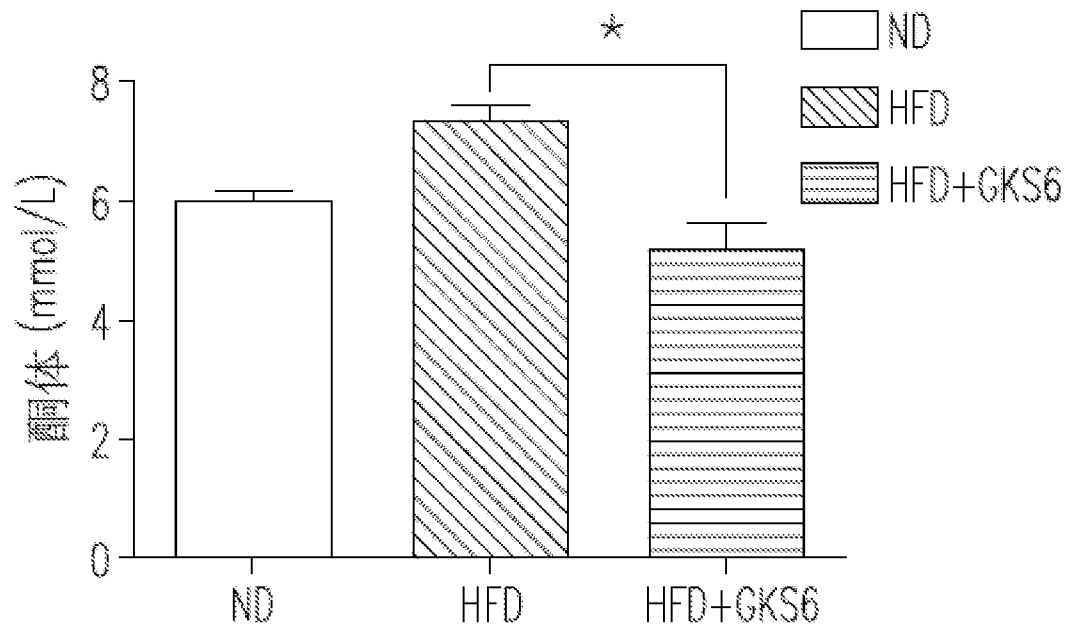


图 12

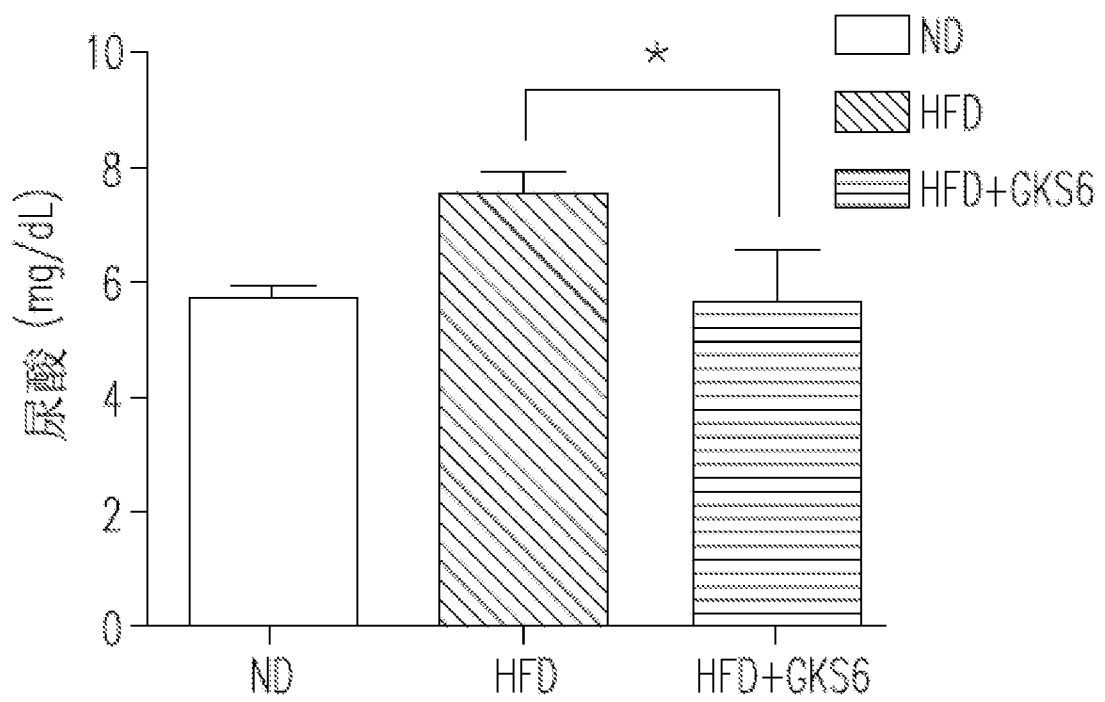


图 13

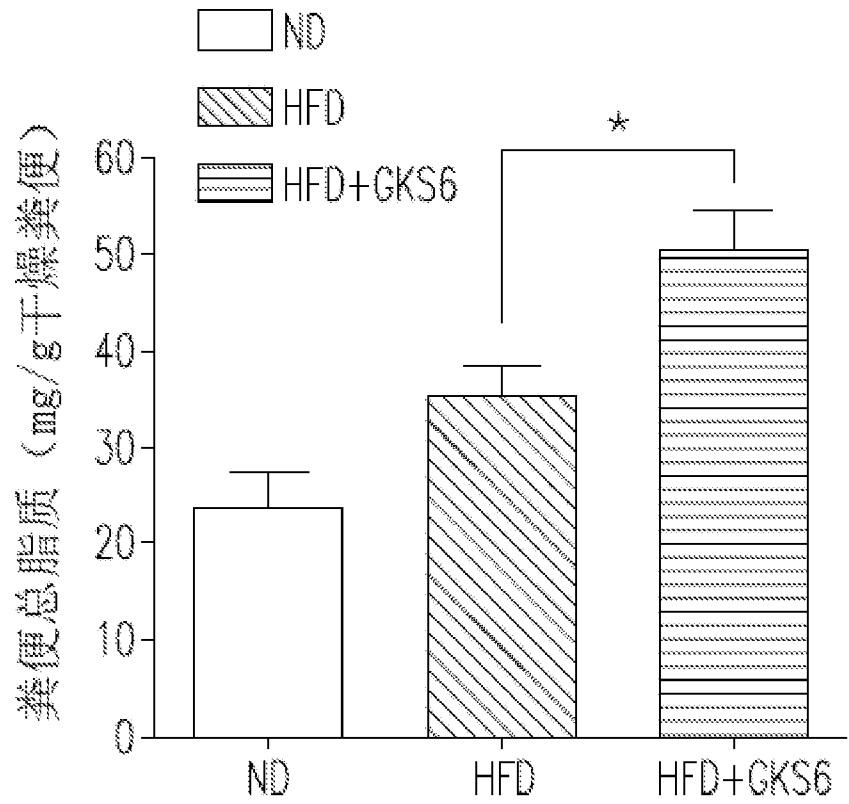


图 14

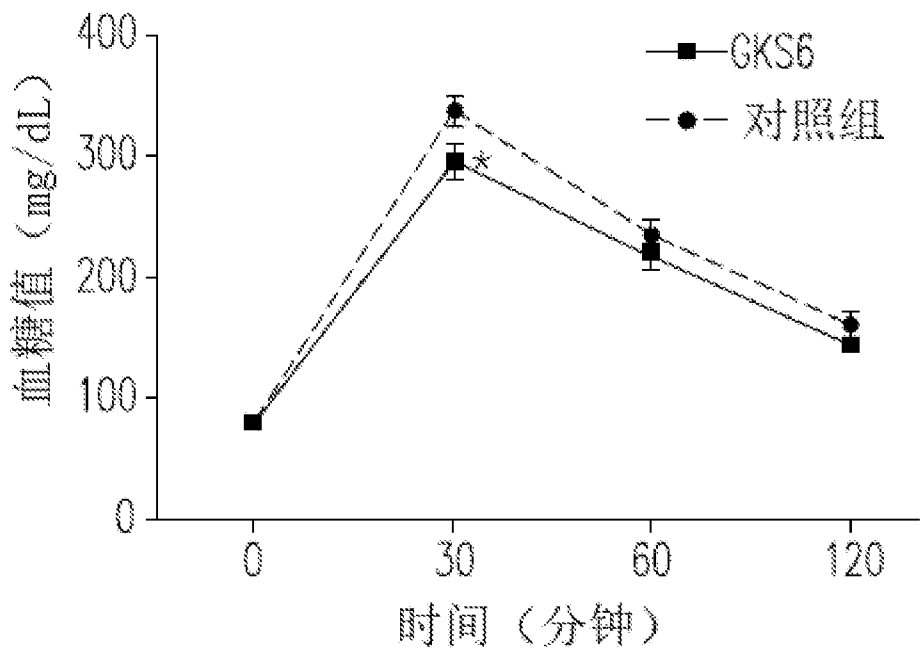


图 15

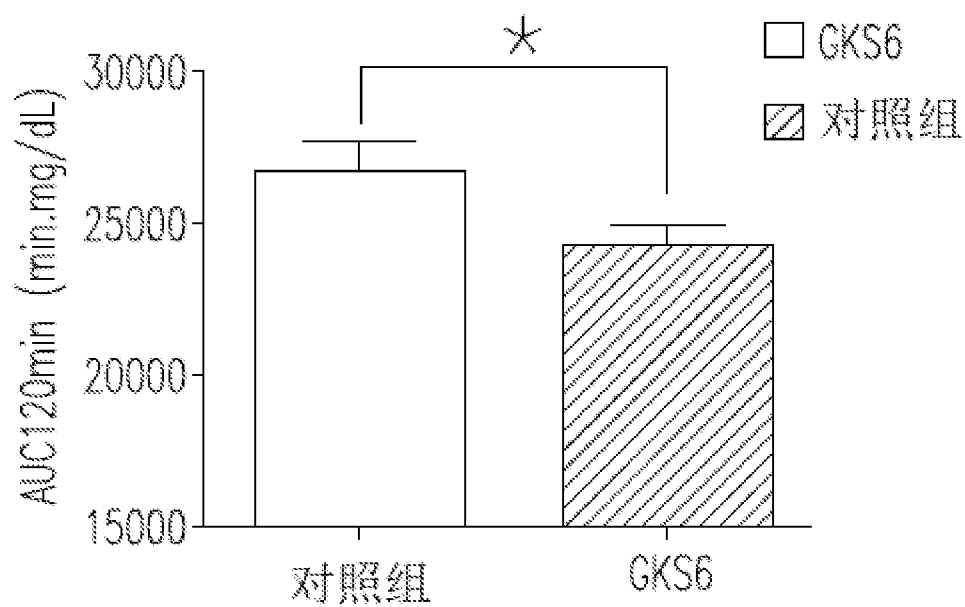


图 16

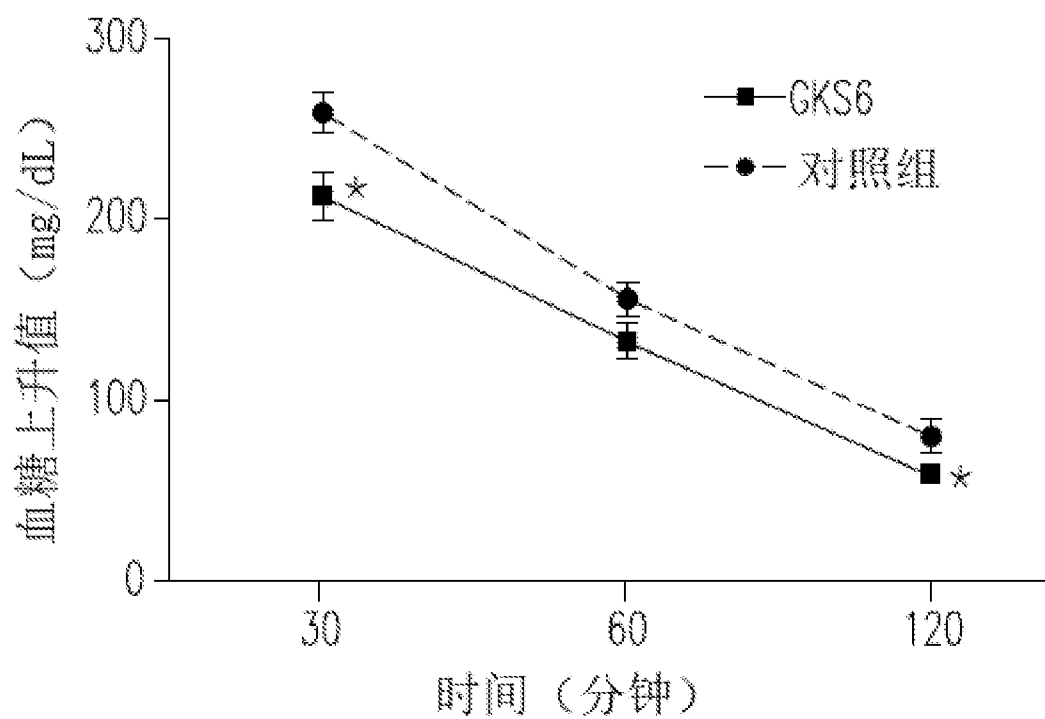


图 17

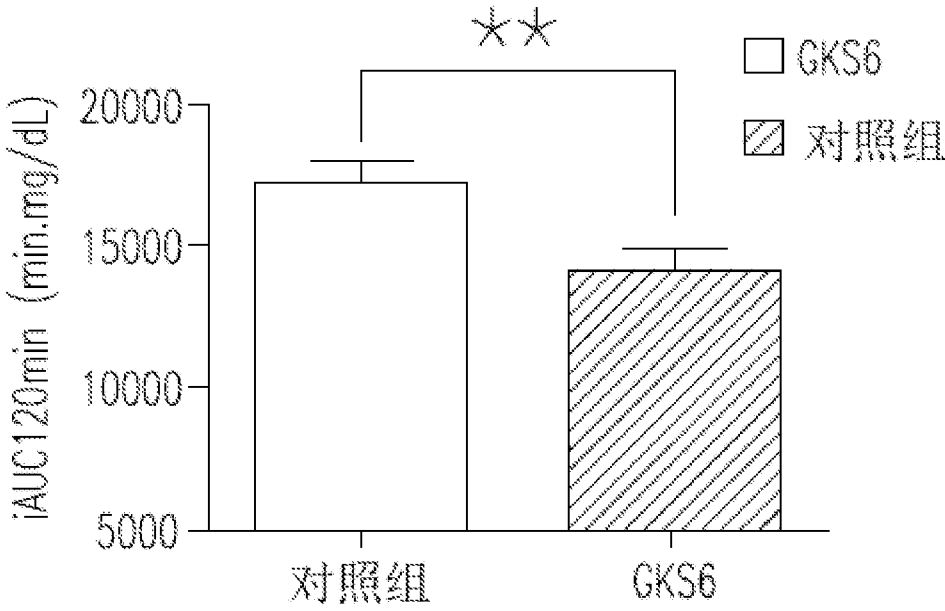


图 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/094085

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61K 35/74(2015.01)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; A61P; A61K

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

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

DWPI, VEN, SIPOABS, CNABS, GenBank, CNKI, 万方, WANGFANG, Web of Science: 副干酪乳杆菌, 肥胖, 代谢症候群, 培养基, 葡萄糖, 乳糖, 酵母萃取物, 胆盐, 申请人/发明人, applicants/inventors, Lactobacillus paracasei, obesity, dysmetabolic syndrome, media, glucose, lactose, bile salts, SEQ ID NO. 1-4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102026554 A (NESTEC LTD.) 20 April 2011 (2011-04-20) claims 1-2, 4 and 15, and description, paragraphs [0010]-[0011], [0030], [0037]-[0039], [0041]-[0042] and [0064]-[0069]	1-2, 6-8, 10
Y	CN 102026554 A (NESTEC LTD.) 20 April 2011 (2011-04-20) claims 1-2, 4 and 15, and description, paragraphs [0010]-[0011], [0030], [0037]-[0039], [0041]-[0042] and [0064]-[0069]	5, 9
X	CN 104232544 A (HERO ESPANA, S.A.) 24 December 2014 (2014-12-24) claims 1-5, 7, 10 and 20, and description, paragraphs [0060], [0065]-[0072] and [0161]-[0164]	1-2, 6-8, 10
Y	CN 104232544 A (HERO ESPANA, S.A.) 24 December 2014 (2014-12-24) claims 1-5, 7, 10 and 20, and description, paragraphs [0060], [0065]-[0072] and [0161]-[0164]	5, 9
X	EP 3040070 A1 (FARMAGENS HEALTH CARE SRL) 06 July 2016 (2016-07-06) description, paragraph [0021]	1-2, 6, 8, 10
Y	EP 3040070 A1 (FARMAGENS HEALTH CARE SRL) 06 July 2016 (2016-07-06) description, paragraph [0021]	5, 9

☒ 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

18 March 2019

Date of mailing of the international search report

29 March 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/094085

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102876606 A (HANGZHOU SHIBO BIOLOGICAL TECHNOLOGY DEVELOPMENT INSTITUTE CO., LTD.) 16 January 2013 (2013-01-16) description, paragraph [0037], and embodiments 1 and 3	3-4
Y	CN 102876606 A (HANGZHOU SHIBO BIOLOGICAL TECHNOLOGY DEVELOPMENT INSTITUTE CO., LTD.) 16 January 2013 (2013-01-16) description, paragraph [0037], and embodiments 1 and 3	5
X	CN 105420166 A (SHAANXI UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY) 23 March 2016 (2016-03-23) description, embodiment 4	3-4
Y	CN 105420166 A (SHAANXI UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY) 23 March 2016 (2016-03-23) description, embodiment 4	5
Y	AI, L. et al. "Lactobacillus Casei BD-II, Complete Genome" <i>GenBank: CP002618.1</i> , 31 January 2014 (2014-01-31), Gene="pheS"; Gene="recN"	9
A	CN 102016004 A (MEIJI DAIRIES CORPORATION) 13 April 2011 (2011-04-13) entire document	1-10
A	CN 106754524 A (SHIJIAZHUANG JUNLEBAO DAIRY CO., LTD.) 31 May 2017 (2017-05-31) entire document	1-10
A	COSTA, D.J. et al. "Efficacy and Safety of the Probiotic Lactobacillus Paracasei LP-33 in Allergic Rhinitis: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial (GA2LEN Study)" <i>European Journal of Clinical Nutrition</i> , Vol. vol. 68, 26 February 2014 (2014-02-26), pp. 602-607	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/094085

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102026554	A	20 April 2011	EP	2123168	B1	21 December 2011
				DK	2123168	T3	10 April 2012
				JP	2011523407	A	11 August 2011
				PT	2123168	E	28 March 2012
				CN	102026554	B	06 November 2013
				US	2011268702	A1	03 November 2011
				EP	2123168	A1	25 November 2009
				AT	537707	T	15 January 2012
				WO	2009138448	A1	19 November 2009
				ES	2378839	T3	18 April 2012
				EP	2296489	A1	23 March 2011
CN	104232544	A	24 December 2014	US	2013280789	A1	24 October 2013
				CN	102421889	B	29 October 2014
				EP	2848681	B1	12 April 2017
				CN	104232545	B	21 November 2017
				WO	2010103132	A1	16 September 2010
				ES	2532095	T3	24 March 2015
				EP	2848682	B1	31 May 2017
				CN	104232545	A	24 December 2014
				RU	2011138363	A	20 April 2013
				ES	2632436	T3	13 September 2017
				EP	2407532	B1	10 December 2014
				EP	2848681	A1	18 March 2015
				PL	2848682	T3	29 December 2017
				ES	2636944	T3	10 October 2017
				EP	2848682	A1	18 March 2015
				WO	2010103140	A2	16 September 2010
				CN	104232544	B	12 April 2017
				RU	2551315	C2	20 May 2015
				US	8637297	B2	28 January 2014
				WO	2010103140	A3	04 November 2010
				EP	2407532	A4	10 April 2013
				DK	2848682	T3	11 September 2017
				US	2013280790	A1	24 October 2013
				CN	102421889	A	18 April 2012
				DK	2848681	T3	24 July 2017
				US	2012076829	A1	29 March 2012
				EP	2407532	A2	18 January 2012
				DK	2407532	T3	09 March 2015
EP	3040070	A1	06 July 2016	None			
CN	102876606	A	16 January 2013	CN	102876606	B	10 July 2013
CN	105420166	A	23 March 2016	None			
CN	102016004	A	13 April 2011	US	2010316618	A1	16 December 2010
				HK	1155481	A1	12 April 2013
				JP	WO2009069704	A1	14 April 2011
				EP	2221360	A1	25 August 2010
				JP	5149305	B2	20 February 2013
				EP	2221360	A4	02 November 2011
				CN	102016004	B	28 November 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/094085

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CA 2707187 C	31 May 2016
		KR 101584380 B1	21 January 2016
		US 8389266 B2	05 March 2013
		WO 2009069704 A1	04 June 2009
		KR 20100109911 A	11 October 2010
		CA 2707187 A1	04 June 2009
		EP 2221360 B1	05 March 2014
CN 106754524 A	31 May 2017	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/094085

A. 主题的分类 C12N 1/20(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61K 35/74(2015.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																							
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N; A61P; A61K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) DWPI, VEN, SIPOABS, CNABS, GenBank, CNKI, 万方, Web of Science:副干酪乳杆菌, 肥胖, 代谢症候群, 培养基, 葡萄糖, 乳糖, 酵母萃取物, 胆盐, 申请人/发明人, Lactobacillus paracasei, obesity, dysmetabolic syndrome, media, glucose, lactose, bile salts, SEQ ID NO. 1-4																							
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 102026554 A (雀巢产品技术援助有限公司) 2011年 4月 20日 (2011 - 04 - 20) 权利要求1-2, 4, 15, 说明书第[0010]-[0011], [0030], [0037]-[0039], [0041]-[0042], [0064]-[0069]段</td> <td>1-2, 6-8, 10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102026554 A (雀巢产品技术援助有限公司) 2011年 4月 20日 (2011 - 04 - 20) 权利要求1-2, 4, 15, 说明书第[0010]-[0011], [0030], [0037]-[0039], [0041]-[0042], [0064]-[0069]段</td> <td>5, 9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 104232544 A (海罗公司) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 权利要求1-5, 7, 10, 20, 说明书第[0060], [0065]-[0072], [0161]-[0164]段</td> <td>1-2, 6-8, 10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104232544 A (海罗公司) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 权利要求1-5, 7, 10, 20, 说明书第[0060], [0065]-[0072], [0161]-[0164]段</td> <td>5, 9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>EP 3040070 A1 (FARMAGENS HEALTH CARE SRL) 2016年 7月 6日 (2016 - 07 - 06) 说明书第[0021]段</td> <td>1-2, 6, 8, 10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>EP 3040070 A1 (FARMAGENS HEALTH CARE SRL) 2016年 7月 6日 (2016 - 07 - 06) 说明书第[0021]段</td> <td>5, 9</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 102026554 A (雀巢产品技术援助有限公司) 2011年 4月 20日 (2011 - 04 - 20) 权利要求1-2, 4, 15, 说明书第[0010]-[0011], [0030], [0037]-[0039], [0041]-[0042], [0064]-[0069]段	1-2, 6-8, 10	Y	CN 102026554 A (雀巢产品技术援助有限公司) 2011年 4月 20日 (2011 - 04 - 20) 权利要求1-2, 4, 15, 说明书第[0010]-[0011], [0030], [0037]-[0039], [0041]-[0042], [0064]-[0069]段	5, 9	X	CN 104232544 A (海罗公司) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 权利要求1-5, 7, 10, 20, 说明书第[0060], [0065]-[0072], [0161]-[0164]段	1-2, 6-8, 10	Y	CN 104232544 A (海罗公司) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 权利要求1-5, 7, 10, 20, 说明书第[0060], [0065]-[0072], [0161]-[0164]段	5, 9	X	EP 3040070 A1 (FARMAGENS HEALTH CARE SRL) 2016年 7月 6日 (2016 - 07 - 06) 说明书第[0021]段	1-2, 6, 8, 10	Y	EP 3040070 A1 (FARMAGENS HEALTH CARE SRL) 2016年 7月 6日 (2016 - 07 - 06) 说明书第[0021]段	5, 9
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	CN 102026554 A (雀巢产品技术援助有限公司) 2011年 4月 20日 (2011 - 04 - 20) 权利要求1-2, 4, 15, 说明书第[0010]-[0011], [0030], [0037]-[0039], [0041]-[0042], [0064]-[0069]段	1-2, 6-8, 10																					
Y	CN 102026554 A (雀巢产品技术援助有限公司) 2011年 4月 20日 (2011 - 04 - 20) 权利要求1-2, 4, 15, 说明书第[0010]-[0011], [0030], [0037]-[0039], [0041]-[0042], [0064]-[0069]段	5, 9																					
X	CN 104232544 A (海罗公司) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 权利要求1-5, 7, 10, 20, 说明书第[0060], [0065]-[0072], [0161]-[0164]段	1-2, 6-8, 10																					
Y	CN 104232544 A (海罗公司) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 权利要求1-5, 7, 10, 20, 说明书第[0060], [0065]-[0072], [0161]-[0164]段	5, 9																					
X	EP 3040070 A1 (FARMAGENS HEALTH CARE SRL) 2016年 7月 6日 (2016 - 07 - 06) 说明书第[0021]段	1-2, 6, 8, 10																					
Y	EP 3040070 A1 (FARMAGENS HEALTH CARE SRL) 2016年 7月 6日 (2016 - 07 - 06) 说明书第[0021]段	5, 9																					
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																							
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																							
国际检索实际完成的日期 2019年 3月 18日		国际检索报告邮寄日期 2019年 3月 29日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 毛颖 电话号码 86-(10)-53961979																					

C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 102876606 A (杭州世博生物技术开发研究所有限公司) 2013年 1月 16日 (2013 - 01 - 16) 说明书第[0037]段, 实施例1, 3	3-4
Y	CN 102876606 A (杭州世博生物技术开发研究所有限公司) 2013年 1月 16日 (2013 - 01 - 16) 说明书第[0037]段, 实施例1, 3	5
X	CN 105420166 A (陕西科技大学) 2016年 3月 23日 (2016 - 03 - 23) 说明书实施例4	3-4
Y	CN 105420166 A (陕西科技大学) 2016年 3月 23日 (2016 - 03 - 23) 说明书实施例4	5
Y	AI, L. 等. "Lactobacillus casei BD-II, complete genome" GenBank:CP002618.1, 2014年 1月 31日 (2014 - 01 - 31), gene="pheS"; gene="recN"	9
A	CN 102016004 A (明治乳业株式会社) 2011年 4月 13日 (2011 - 04 - 13) 全文	1-10
A	CN 106754524 A (石家庄君乐宝乳业有限公司) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 全文	1-10
A	COSTA, D.J. 等. "Efficacy and safety of the probiotic Lactobacillus paracasei LP-33 in allergic rhinitis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial (GA2LEN Study)" European Journal of Clinical Nutrition, 第68卷, 2014年 2月 26日 (2014 - 02 - 26), 第602-607页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/094085

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102026554	A	2011年 4月 20日	EP	2123168	B1	2011年 12月 21日
				DK	2123168	T3	2012年 4月 10日
				JP	2011523407	A	2011年 8月 11日
				PT	2123168	E	2012年 3月 28日
				CN	102026554	B	2013年 11月 6日
				US	2011268702	A1	2011年 11月 3日
				EP	2123168	A1	2009年 11月 25日
				AT	537707	T	2012年 1月 15日
				WO	2009138448	A1	2009年 11月 19日
				ES	2378839	T3	2012年 4月 18日
				EP	2296489	A1	2011年 3月 23日
CN	104232544	A	2014年 12月 24日	US	2013280789	A1	2013年 10月 24日
				CN	102421889	B	2014年 10月 29日
				EP	2848681	B1	2017年 4月 12日
				CN	104232545	B	2017年 11月 21日
				WO	2010103132	A1	2010年 9月 16日
				ES	2532095	T3	2015年 3月 24日
				EP	2848682	B1	2017年 5月 31日
				CN	104232545	A	2014年 12月 24日
				RU	2011138363	A	2013年 4月 20日
				ES	2632436	T3	2017年 9月 13日
				EP	2407532	B1	2014年 12月 10日
				EP	2848681	A1	2015年 3月 18日
				PL	2848682	T3	2017年 12月 29日
				ES	2636944	T3	2017年 10月 10日
				EP	2848682	A1	2015年 3月 18日
				WO	2010103140	A2	2010年 9月 16日
				CN	104232544	B	2017年 4月 12日
				RU	2551315	C2	2015年 5月 20日
				US	8637297	B2	2014年 1月 28日
				WO	2010103140	A3	2010年 11月 4日
				EP	2407532	A4	2013年 4月 10日
				DK	2848682	T3	2017年 9月 11日
				US	2013280790	A1	2013年 10月 24日
				CN	102421889	A	2012年 4月 18日
				DK	2848681	T3	2017年 7月 24日
				US	2012076829	A1	2012年 3月 29日
				EP	2407532	A2	2012年 1月 18日
				DK	2407532	T3	2015年 3月 9日
EP	3040070	A1	2016年 7月 6日	无			
CN	102876606	A	2013年 1月 16日	CN	102876606	B	2013年 7月 10日
CN	105420166	A	2016年 3月 23日	无			
CN	102016004	A	2011年 4月 13日	US	2010316618	A1	2010年 12月 16日
				HK	1155481	A1	2013年 4月 12日
				JP	WO2009069704	A1	2011年 4月 14日
				EP	2221360	A1	2010年 8月 25日
				JP	5149305	B2	2013年 2月 20日
				EP	2221360	A4	2011年 11月 2日
				CN	102016004	B	2012年 11月 28日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/094085

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		CA 2707187 C	2016年 5月 31日
		KR 101584380 B1	2016年 1月 21日
		US 8389266 B2	2013年 3月 5日
		WO 2009069704 A1	2009年 6月 4日
		KR 20100109911 A	2010年 10月 11日
		CA 2707187 A1	2009年 6月 4日
		EP 2221360 B1	2014年 3月 5日
CN 106754524 A	2017年 5月 31日	无	