



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104781390 B

(45)授权公告日 2017.07.28

(21)申请号 201380044004.3

(22)申请日 2013.08.16

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104781390 A

(43)申请公布日 2015.07.15

(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

KCCM11291P 2012.07.09

KCCM43009 2012.07.09

(73)专利权人 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)

A61P 25/16(2006.01)

A23L 33/00(2016.01)

C12R 1/25(2006.01)

(56)对比文件

KR 101087972 B,2011.12.01,

KR 20070055372 A,2007.05.30,

陈君等.“乳酸菌对小鼠延缓衰老的实验研究”.《中国酿造》.2012,第31卷(第7期),摘要.

审查员 蔺娜

权利要求书1页 说明书18页

序列表2页 附图7页

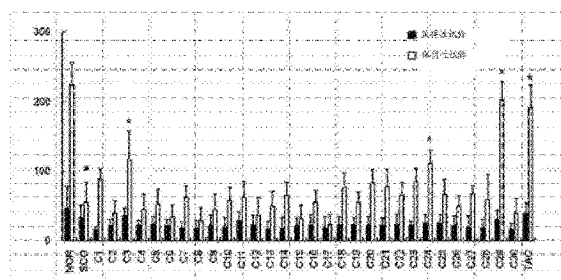
(54)发明名称

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. 一种保藏编号为KCCM11291P的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29。

2. 一种抗氧化及抗衰老的药用组合物,其包含保藏编号为KCCM11291P的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29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,其包含保藏编号为KCCM11291P的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29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,其包含保藏编号为KCCM11291P的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29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,其包含保藏编号为KCCM11291P的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29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. 一种痴呆的预防或治疗用组合物,其包含用保藏编号为KCCM11291P的戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus* var. *plantarum*) C29菌株进行发酵的发酵组合物作为有效成分。

9. 根据权利要求8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、人參发酵组合物及党参发酵组合物构成的组。

10. 根据权利要求8或9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。

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-kappaB 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

[0007] 本发明要解决的技术问题

[0008] 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。

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 技术方案

[0012] 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。

[0013] 此外,本发明提供含有戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌C29作为有效成分的抗氧化及抗衰老的药用组合物。

[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治疗用的药用组合物。

[0015] 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。

[0016] 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。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 此外,本发明提供从泡菜分离出的弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*) C3KCCM43009。

[0020] 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。

[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治疗用的药用组合物。

[0022] 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。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 以下,将对本发明进行更详细地说明。

[0027] 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。

[0028] 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。

[0029] 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。

[0030] 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)。

[0031] 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。

[0032] 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)。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] [表1]

[0036] 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。

[0037]

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

[0038]

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℃	+	+	+
15℃	+	+	+
45℃	+	-	-
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

[0039] +: 阳性反应;-: 阴性反应。

[0040] a: Zannoni, 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。

[0041] [表2]

[0042] 利用API 20E和API 50CHL的乳酸菌的蔗糖发酵分析。

[0043]

	菌株 C29	植物乳杆菌 ^a ATCC 14917 TM	戊糖乳杆菌 ^b 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

[0044]

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	+	-	+

[0045] +: 阳性反应; -: 阴性反应; D: 可变反应。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] b: Zanon, 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。

[0049] [表3]

[0050] 菌株C29、植物乳杆菌ATCC14917和戊糖乳杆菌DSM20314的细胞脂肪酸组成。

[0051]

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} ω7c	8.7	3.9	5.6
C _{18:1} ω7c	25.5	27.2	45.1
支链脂肪酸			
C _{19:0} cyclo ω8c	10.1	8.7	5.7

[0052] T: 小于1%的微量的酸。

[0053] 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。

[0054] 戊糖乳杆菌: Zanon, 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。

[0055] 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。

[0056] [表4]

[0057] 菌株C3、弯曲乳杆菌ATCC 25601的形态特征和生理学特征。

[0058]

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	

[0059] +: 阳性反应; -: 阴性反应。

[0060] [表5]

[0061] 利用API 20E和API 50CHL的乳酸菌的蔗糖发酵分析。

[0062]

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

[0063]

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	-	-

[0064] +: 阳性反应;-: 阴性反应。

[0065] 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。

[0066] 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药用组合物。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 并且,本发明还提供含有用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。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] 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化,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。

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 所述萃取物可以利用减压蒸馏法或膜蒸馏法进行制备。

[0082] 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)。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 有益效果

[0087] 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

[0088] 图1是显示C29乳酸菌的16S rDNA序列(SEQ ID NO.1)。

- [0089] 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。
- [0090] 图3是显示被动回避反应试验结果的图表。
- [0091] 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。
- [0092] 图5是显示C29菌株的记忆改善效果的凝胶图片。
- [0093] 图6是显示实施例2的Y型迷宫试验结果的图表。
- [0094] 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)。
- [0095] * $P < 0.05$ vs. 是正常对照组, * $P < 0.05$ vs. 是东莨菪碱单独处理的对照组。
- [0096] 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。
- [0097] 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。
- [0098] 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)。
- [0099] 图11是显示C3乳酸菌的16S rDNA序列 (SEQ ID NO.2)。
- [0100] 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

[0101] 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。

[0102] 实施例1.乳酸菌分离

[0103] 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。

[0104] 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

[0105] 离出了乳酸菌和双歧杆菌菌株。

[0106] 分离出的菌株如下所示。

[0107] 1) 从泡菜中分离使用的乳酸菌。

[0108] 肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) C1

[0109] 泡菜明串珠菌 (*Leuconostoc kimchii*) C2

[0110] 弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*) C3

[0111] 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) C4

- [0112] 短乳杆菌C5
- [0113] 植物乳球菌 (*Lactococcus plantarum*) C6
- [0114] 柠檬明串珠菌 (*Leuconostoc citreum*) C7
- [0115] 戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) C8
- [0116] 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) C9
- [0117] 乳酸乳杆菌 (*Lactobacillus lactis*) C10
- [0118] 瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) C11
- [0119] 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) C12
- [0120] 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) C13
- [0121] 清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*) C14
- [0122] 戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*) C15
- [0123] 清酒乳杆菌C21
- [0124] 清酒乳杆菌C22
- [0125] 清酒乳杆菌C23
- [0126] 植物乳杆菌C24
- [0127] 植物乳杆菌C25
- [0128] 植物乳杆菌C26
- [0129] 戊糖乳杆菌C27
- [0130] 戊糖乳杆菌C28
- [0131] 戊糖乳杆菌变种植物乳杆菌C29
- [0132] 清酒乳杆菌C30
- [0133] 2) 从人体消化道中分离使用的乳酸菌。
- [0134] 短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) C16
- [0135] 长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) C17
- [0136] 青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) C18
- [0137] 两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) C19
- [0138] 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) C20
- [0139] 实施例2. 抗痴呆效果的确认
- [0140] 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。
- [0141] 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。
- [0142] 2-1. 被动回避反应试验 (Passive avoidance task test)
- [0143] 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。

[0144] 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。

[0145] 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。

[0146] 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 $^{\circ}$ C、13000rpm条件下进行15分钟离心分离之后,将上清液在-80 $^{\circ}$ C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。

[0147] 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。

[0148] 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。

[0149] 2-2.Y型迷宫试验 (Y-maze task)

[0150] Y型迷宫测定装置伸展成三个通道 (arm) 而具有字母Y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。

[0151] 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)。

[0152] 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。

[0153] 2-3.水迷宫试验(Water maze task)

[0154] 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。

[0155] 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,给予了东茛菪碱(0.9mg/kg)。

[0156] 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。

[0157] 实施例3.抗氧化、抗衰老和抗痴呆效果的确认

[0158] 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。

[0159] 1) 脂质过氧化物分析

[0160] 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。

[0161] 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。

[0162] 2) 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase) (SOD) 活性

[0163] 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。

[0164] 3) 过氧化氢酶(Catalase) 活性

[0165] 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 H₂O₂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

H₂O₂的酶量。

[0166] 4) 谷胱甘肽 (GSH)

[0167] 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。

[0168] 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。

[0169] [表6]

[0170]

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 (μmol/mg 蛋白质)	谷胱甘肽 μg/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

[0171]

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

[0172] 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250μl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 (포스포-FOXO3)、磷光体-p65、P65、磷光体-mTor、磷光体-AKT和β-肌动蛋白。

[0173] 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, 50μg)。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。

[0174] 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。

[0175] 5) Y型迷宫试验(Y-maze task)

[0176] 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。

[0177] 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。

[0178] 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。

[0179] 6) 水迷宫试验(Morris water maze test)

[0180] 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。

[0181] 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。

[0182] 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。

[0183] 实施例4.C29和C3乳酸菌的鉴定

[0184] 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。

[0185] 利用布拉斯特(Blast)相似性查询程序,比较rDNA的碱基序列,与多种乳杆菌种菌株的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。

[0186] 实施例5.C29或C3发酵组合物的抗痴呆效果的确认

[0187] 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)。

[0188] 5-1.发酵组合物制成

[0189] 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。

[0190] 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。

[0191] 5-2.被动回避反应试验(Passive avoidance task test)

[0192] 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。

[0193] 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。

<110>	庆熙大学产学协力团 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 catgatitac atttgagtga gtggcgaact	60
	ggtagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct	120
	aatacegcac aacaactigg accgcattgg ccgagtttga aagatggctt cggtatcac	180
[0001]	ttttgatgg tcccgcgcg tattagctag atggtgggg aacggctcac catggcaatg	240
	atacgtagcc gacctgagag ggtaatcgcc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc	300
	ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc	360
	gcgtgagtga agaagggtt cggtctgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatattctga	420
	gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaaac cacggctaac tacgtgccag	480
	cagcccggt aatacgtagg tggcaagcgt tgccccgat ttattggcg taaagcgagc	540
	gcaggcggtt ttttaagtct gatgtgaaag ccttcggctc aaccgaagaa gtgcatcgga	600
	aactgggaaa cttgagtga gaagaggaca gtggaactcc atgtgtagcg gtgaaatgcg	660
	tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag gggctgtct ggtctgtaac tgacgtgag	720
	gctcgaaagt atgggtagca aacaggatta gataccctgg tagtccatac cgtaaacgat	780
	gaatgetaag tgttgaggg ttccgccct tcagtgtgc agctaacgca ttaagcattc	840
	cgccfgggga gtacggccgc aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag	900
	cggtggagca tgtggtttaa ttogaageta cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatac	960
	tatgcaaacc taagagatta gacgttccct tggggacat ggatacaggt ggtgcatggt	1020
	tgctgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt	1080

	atcagttgcc agcattaagt tgggcactct ggtgagactg ccggtgacaa accggaggaa	1140
	ggtggggatg acgtcaaate atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgetacaat	1200
	ggatggtaca acgagttgcg aactcgcgag agtaagctaa tctcttaaag ccattctcag	1260
	ttcggattgt aggetgcaac tcgcctacat gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcggatea	1320
	gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccattgagagt	1380
	ttgtaacacc caaagtcggt ggggtaacct tttaggaacc agccgcct	1428
	<210> 2	
	<211> 893	
	<212> DNA	
	<213> 弯曲乳杆菌	
	<400> 2	
	agtcgtaaca aggtaaccgt agaagtcttg attcgataac atttgagtga gtggcggacg	60
	ggtgagtaac acgtgggtaa cctgccctaa agtgggggat aacattigga aacagatgct	120
[0002]	ataccgcata aaacctagca ccgcattggt caaggttgaa agatggtttc ggcatacact	180
	ttaggatgga cccgcggtgc attagttagt tggtaggta aaggctcacc aagaccgtga	240
	tgcatagccg acctgagagg gtaateggcc aactggggac tgagacacgg ccagactcc	300
	tacgggagge agcagtaggg aatcttccac aatggacgaa agtctgatgg agcaacgccg	360
	cgtgagtga gaaggttttc ggatcgtaaa actctgttgt tggagaagaa cgtatttgat	420
	agtaactgat caggtagtga cggatccaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc	480
	agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccgattt attgggcgta aagcgagcgc	540
	aggcggtttc ttaagtctga tgtgaaagcc ttcggctcaa ccgaagaagt gcatcgga	600
	ctgggaaact tgagtgcaga agaggacagt ggaactccat gtgtagcggg gaaatgcgta	660
	gatataigga agaaccacag tggcgaaggc ggctgtctgg tctgtaactg acgtgaggc	720
	tcgaaagcat gggtagcaaa caggattaga taccctggta gtccatgccg taaacgatga	780
	gtgctagggt ttggagggtt tccgcccttc agtgccgcag ctaacgcatt aagcactccg	840
	cctggggagt acgaccgcaa ggttgaaact caaaggaatt gacgggggccc 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

(99.5%)

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

(99.5%)

ACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACA
 CGTGGGAAACCTGCCAGAAAGC GGGGGAT AACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGG
 ACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC GCGGC GTATTAGCTAGA
 TGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGC CACATTGGGAC
 TSAGACACGGCCCCAACTCTACGGGAGGSCAGCAGTASSGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG
 GAGCAACGC CGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA
 GAGTAACTGTTAGGTATTGACGGTATTTAAACAGAAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCC GCGGT
 AATACGTAGGTGCCAAGC GTTGTCCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC GGTTTTAAAGTCTG
 ATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACC GAAGAAGTSCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGAGSACA
 GTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGGAAGAACACAGTGCGCGAAGGC GGCTGTCT
 GGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCATAC
 CGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCGCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGCATTCC
 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCGCAC AAGCGGTGGAGC
 ATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGC GAAGAACC TTACCAGGTC TTGACATACTATGCAAAATCTAAGAGATTA
 GACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTC GTGTC GTGAGAT GTTGGGT
 TAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCC TTATTATCAGTTGCCAGCATT AAGTTGGGC ACTCTGGTGAGACTGCC
 GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
 CCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGC GAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCATTCTCAGTT C
 GGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCC GCGGTG
 AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGG
 GTAACCTTTTAGGAAC CAGCCGCT

图1

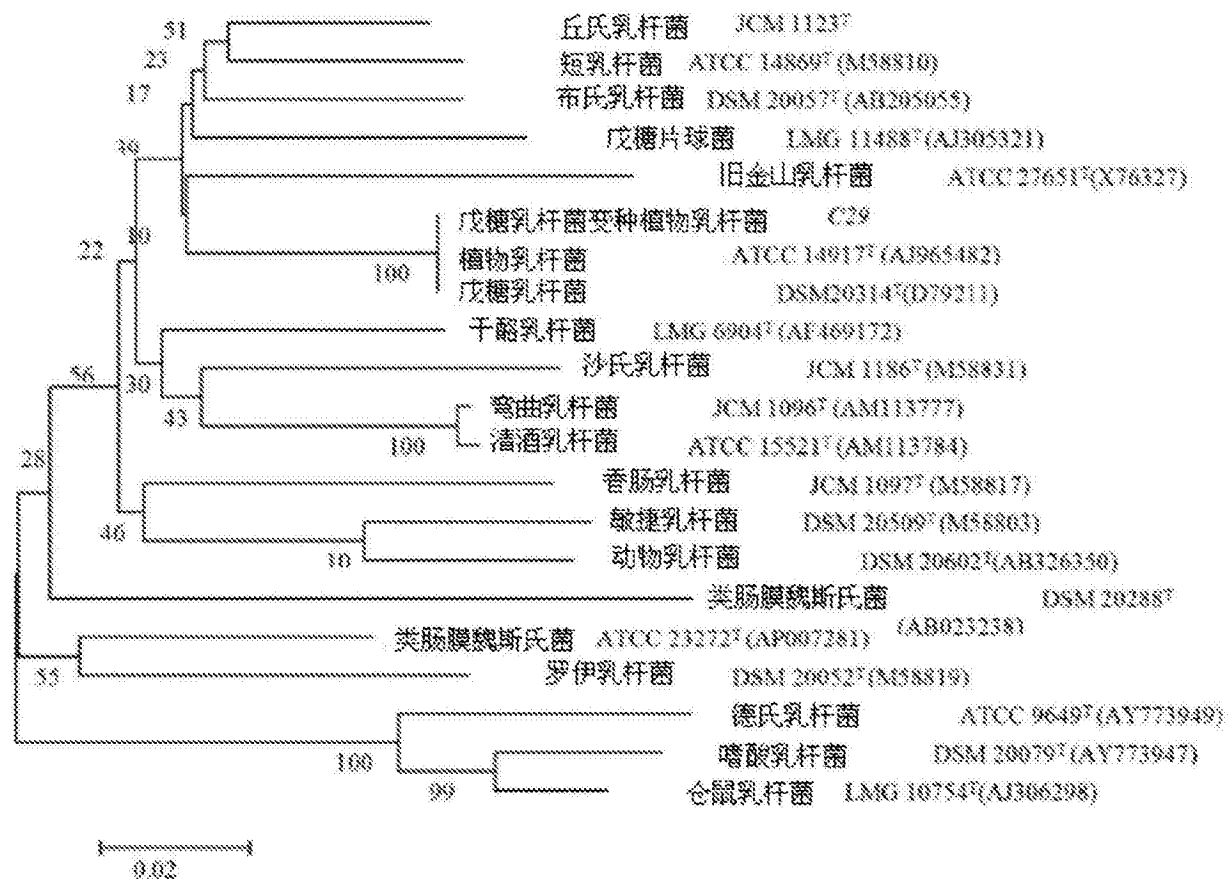


图 2

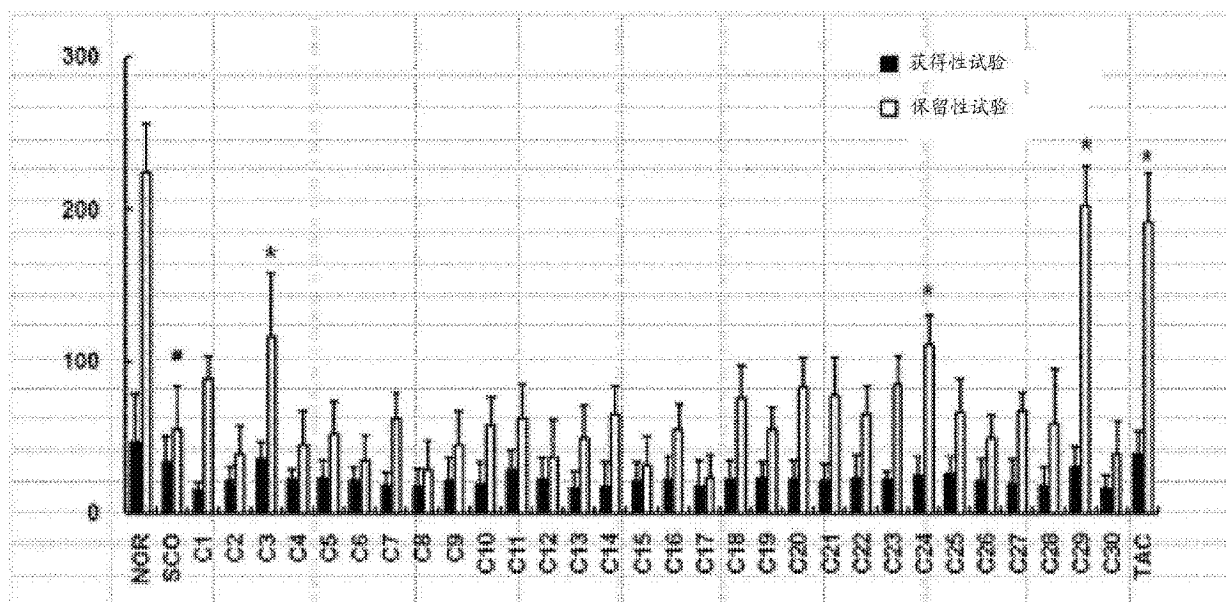


图3

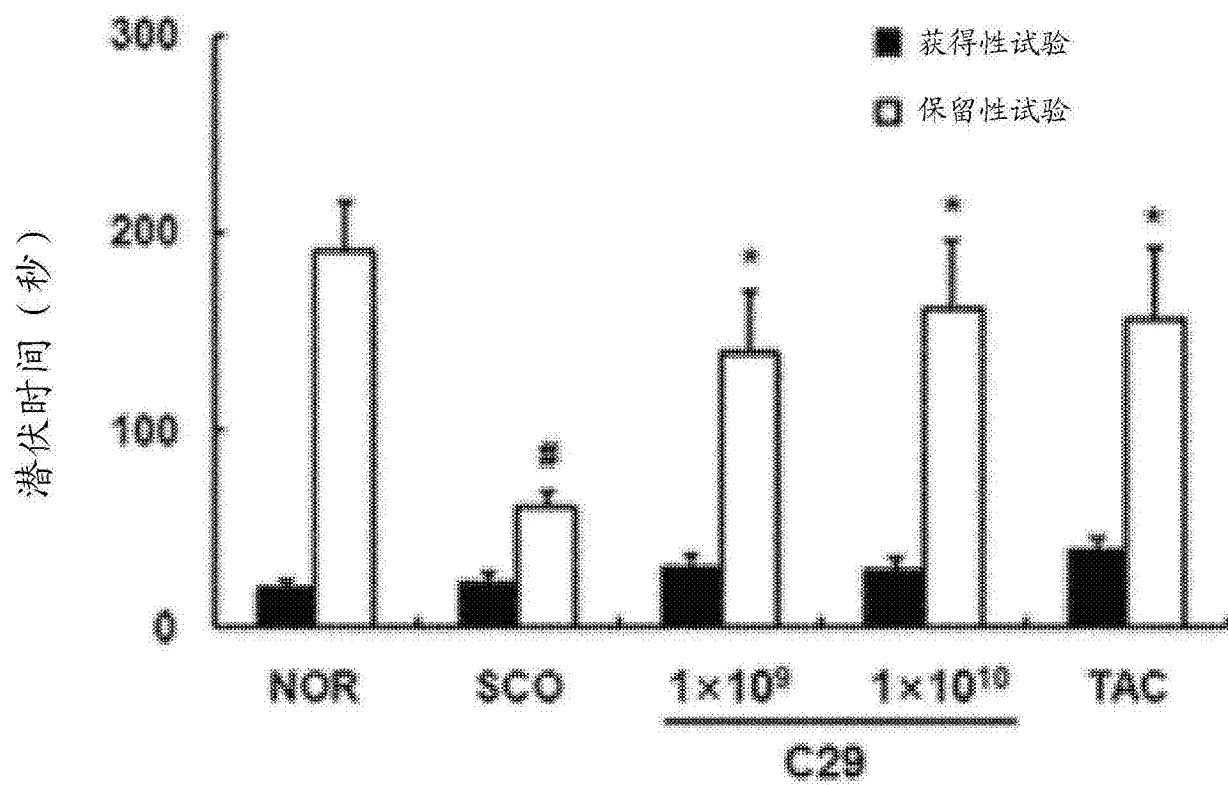


图4

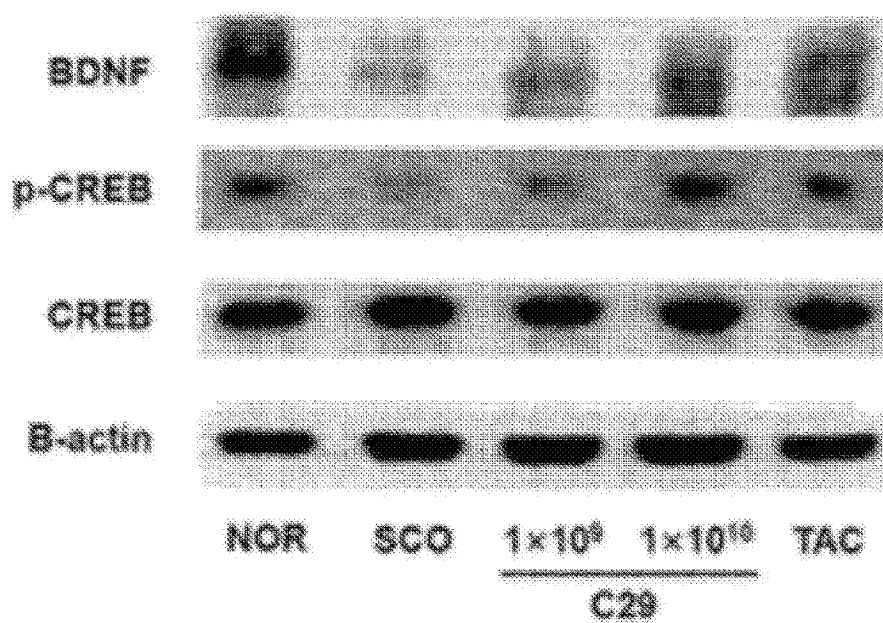


图5

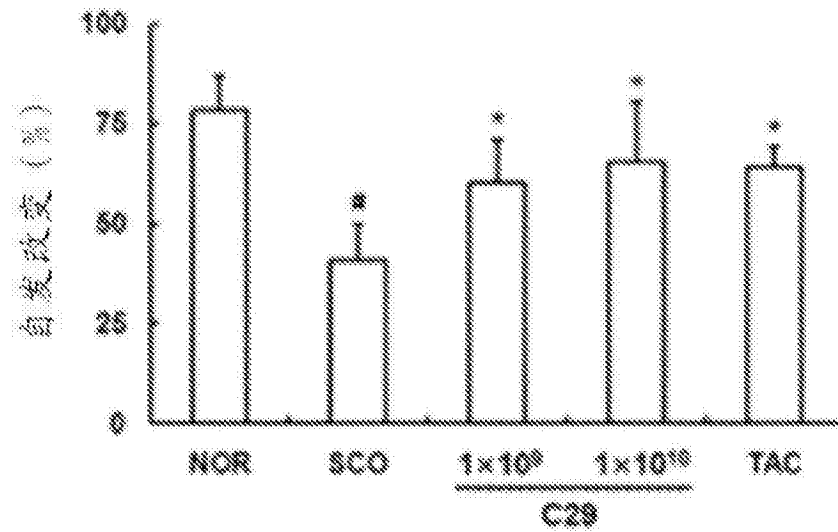


图6

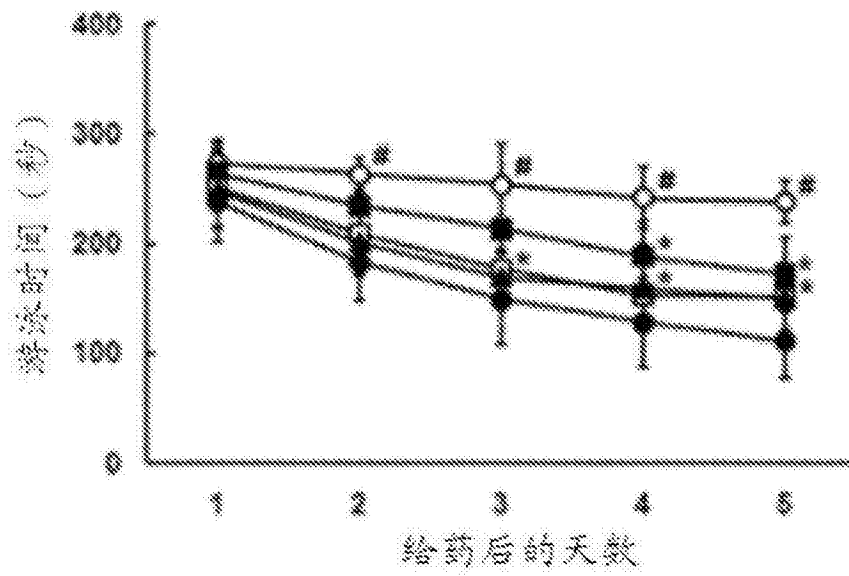


图7

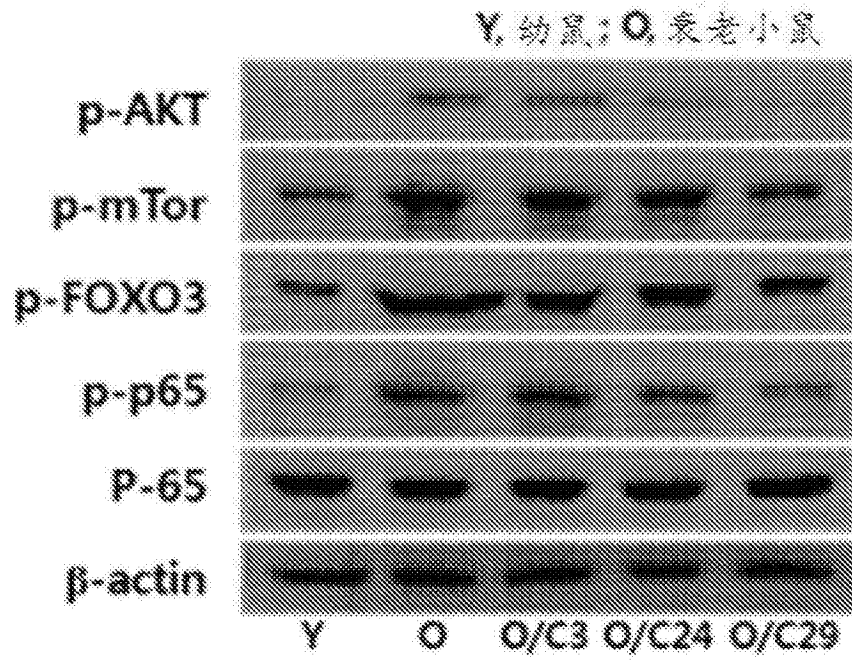


图8

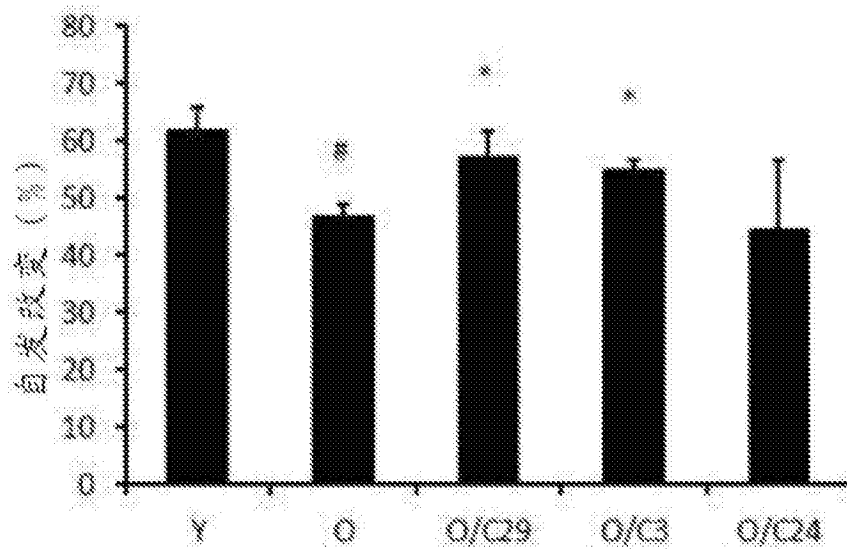


图9

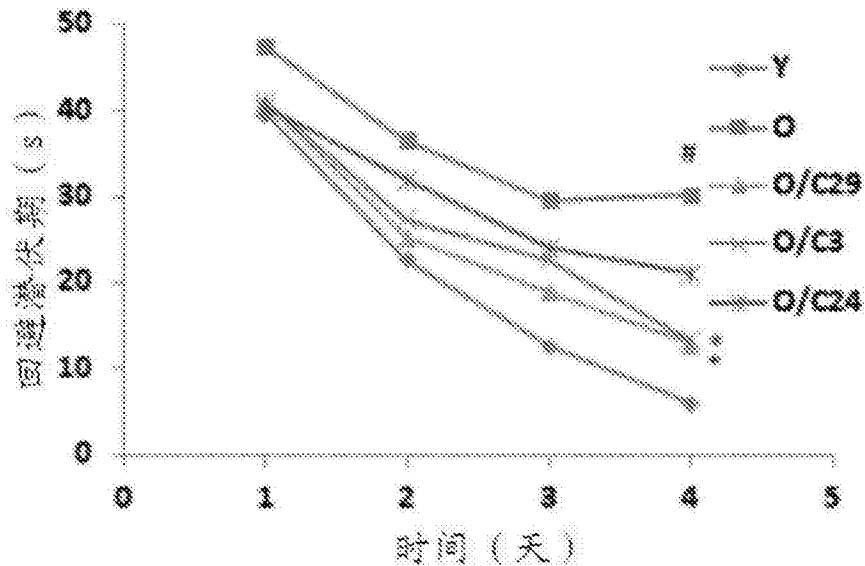


图10

[[C]] sequence (393bp)

与弯曲乳杆菌基因16S rRNA 864/866的同源性 (99%)

```

AGTCGTAACAAAGCTAACCGTAAAGTCTTGATTTGATAACATTTGAGTGAAGTGGCGGACGGGTTAGTAACACG
TGGGTAAACC TGCCCTAAAGTGGGGAGAACATTTGGAAACAGATGCTATACCGCATAAAACCTAGCACCCCA
TGGTTC AAGGTTGAAAAGATGTTTCGGCTATCAC TTTAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAAG
TAAAGGCTCACCAAGACCGTGAATGATAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GGCCAGACTCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGATCTTCACAAATGACGAAAGTCTGATGAGC AAGCCCG
CGTGAGTGAAGAAAGTTTTCGGATCGTAAACATCTGTTGTTGGAGAGAAACGATTTTATAGTAACTGATCAG
GTAGTGAACGGTATCCACCAAGAAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTATACGTAGGTGCAAA
GGCTTTGTCCGGATTGATTTGGGCTGTAAAGC GAGCGCAGGGCGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGGCTTCGGCTC
AAGCGAAGGAGGTGATCGGAAACTGGGAACTTTGAGTGCAGAAAGAGGACAGTGGAACTCATGTGTAGCTGG
TGAAATGCTGTAGATATATGAGAGAACACCAATGGCGGAAAGCGGCTGTCTTGGTCTGTAACTGACGCTGAAGGCTC
GAAAGCATGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCC TGGTATGTCATGCCGTAAACGATGAGTGTAGGTGTGGA
GGGTTTTCGGCTTCAATGCGCGCAGCTAACGCATTAGCACTCCTGCTGGGAGTAGGACCGCAAGGTTGAA
ACTCAAAAGGAATTAAGGGGGGGCCCGC

```

图11

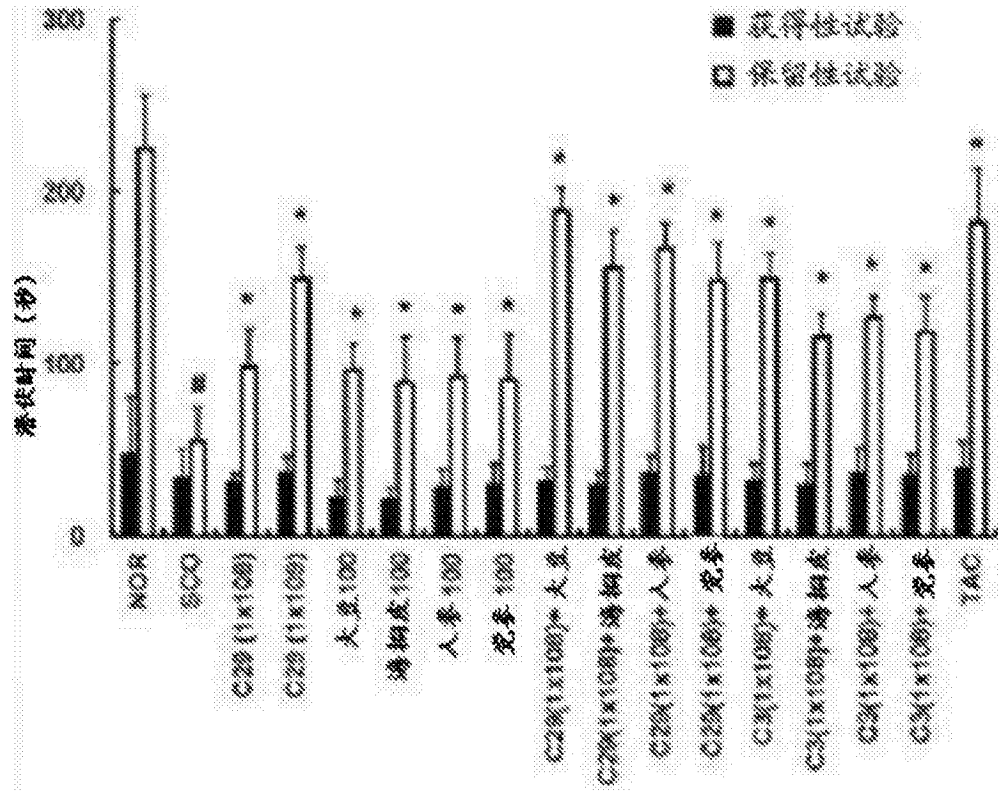


图12