



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102057036 B

(45)授权公告日 2017. 11. 17

(21)申请号 200980121838.3

(22)申请日 2009.05.19

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102057036 A

(43)申请公布日 2011.05.11

(30)优先权数据

08010641.2 2008.06.11 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2010.12.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2009/003586 2009.05.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02009/149816 EN 2009.12.17

(83)生物保藏信息

DSM 19825 2007.11.01

DSM 19826 2007.11.01

DSM 19827 2007.11.01

(73)专利权人 巴斯夫欧洲公司

地址 德国路德维希港

(72)发明人 M·波特纳 C·朗 M·维恩

M·施令 A·赖因德

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 史文静

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

(56)对比文件

WO 2006/022471 A1, 2006.03.02,

Benthin S等.Amino acid utilization by Lactococcus lactis subsp. cremoris FDI during growth on yeast extract or casein peptone.《Journal of Applied Bacteriology》.1996,第80卷(第1期),摘要,第68页图2.

Burton J.P等.A preliminary study of the effect of probiotic Streptococcus salivarius K12 on oral malodour parameters.《Journal of Applied Microbiology》.2006,第100卷(第4期),第754-764页. (续)

审查员 张锦广

(54)发明名称

用于预防和/或治疗口腔恶臭的用途和方法

(57)摘要

本发明描述了属于乳酸菌组的微生物,其能够显著降低唾液中的肽浓度,从而耗尽了口腔微生物群落的厌氧微生物使用的底物,所述微生物群落是口腔恶臭(oral malodour)的病原体。此外,还描述了属于乳酸菌组的微生物,所述微生物能够刺激唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)的生长,但不刺激变形链球菌(*Streptococcus mutans*)和/或牙龈红棕色单胞

菌(*Porphyromonas gingivalis*)的生长。还描述了含有上述微生物的组合物,所述组合物用于预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭(halitosis)的用途,以及预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭的方法。

权利要求书2页 说明书40页 附图4页

[接上页]

(56)对比文件

Takahashi N等.Effect of ultrafiltration of yeast extracts on their ability to promote lactic acid bacteria growth.《Canadian Journal of Microbiology》.1999,第45卷(第11期),第891-897页.

Haudreau H等.The use of crude

cellular extracts of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 to stimulate growth of a probiotic *Lactobacillus rhamnosus* culture in milk.《Enzyme and Microbial Technology》.2005,第36卷(第1期),摘要,第84页左栏第2段和第4段,第87页左栏第3段.

1. 鉴定用于减少口腔恶臭和/或口臭的属于乳酸菌组的微生物的方法,特征是对微生物进行下列测定(a),从而获得表现出下列性质(b)的微生物:

测定(a):

(a) 在37℃的厌氧条件下,在含有15g/l肽的合成培养基中用 1×10^7 细胞/ml的起始细胞密度培养微生物24h;

(b) 在4000xg离心15min去除细胞;和

(c) 确定所获得的上清液中的肽浓度;

性质(b):

微生物导致培养基中的肽浓度降低,使得与15g/l的起始浓度相比,在孵育24h后上清液中的肽浓度降低至少20%,即,微生物能够降低测定(a)中的培养基中的肽浓度至少20%。

2. 权利要求1的方法,其包括对微生物进行下列测定(A),从而获得还表现出下列性质(B)的微生物:

测定(A):

(a) 在37℃的厌氧条件下,在100ml合成培养基中用 1×10^7 细胞/ml的起始细胞密度培养微生物24h;

(b) 然后,在4000xg离心细胞15min并重悬在20ml H₂O中;

(c) 随后将细胞冷冻至-80℃,并在真空冻干16h;

(d) 将10mg冻干的细菌重悬在H₂O中,在4000xg离心10min;

(e) 将含7g/l肽的1ml合成培养基添加至细胞沉淀物,将细胞重悬在培养基中,在37℃需氧条件下孵育5min后,在4000xg离心15min去除细胞;和

(f) 确定所获得的培养基上清液中的肽浓度;

性质(B):与孵育期开始时的培养基浓度7g/l相比,冻干的细菌导致获得的培养基上清液中的肽浓度降低至少20%。

3. 权利要求1或2的方法,其中所述微生物还能够刺激唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)的生长,但不刺激变形链球菌(*Streptococcus mutans*)和/或牙龈红棕色单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)的生长。

4. 权利要求1的方法,其中所述微生物是属于乳杆菌属的微生物。

5. 权利要求4的方法,其中所述乳杆菌是嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)。

6. 根据权利要求1的方法,其进一步包括失活所获得的微生物从而获得所述微生物的失活形式,其表现出当添加至下述培养基并在37℃的需氧条件下孵育5min时,降低含7g/l肽的合成培养基的肽浓度至少20%的性质。

7. 根据权利要求5的方法,其进一步包括失活所获得的微生物从而获得所述微生物的失活形式,其表现出当添加至下述培养基并在37℃的需氧条件下孵育5min时,降低含7g/l肽的合成培养基的肽浓度至少20%的性质。

8. 权利要求3的方法,特征在于鉴定能够刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的微生物,其中所述乳酸菌属于选自以下的物种:嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、乳酸乳杆菌(*Lactobacillus lactis*)、*Lactobacillus algidus*、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、

布氏乳杆菌 (*Lactobacillus buchneri*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、*Lactobacillus camelliae*、*Lactobacillus coleohominis*、*Lactobacillus crustorum*、*Lactobacillus diolivorans*、异型腐酒乳杆菌 (*Lactobacillus heterohiochii*)、希氏乳杆菌 (*Lactobacillus hilgardii*)、*Lactobacillus kimchii*、林氏乳杆菌 (*Lactobacillus lindneri*)、口乳杆菌 (*Lactobacillus oris*)、*Lactobacillus pantheris*、类布赫内氏乳杆菌 (*Lactobacillus parabuchneri*) 和 *Lactobacillus saerimneri*。

9. 权利要求8的方法,其中所述微生物是属于乳杆菌属的微生物。

10. 权利要求9的方法,其中所述乳杆菌是嗜酸乳杆菌。

11. 权利要求8或9的方法,其中所述微生物被进一步失活以获得得到的微生物的失活形式。

12. 权利要求10的方法,其中所述微生物被进一步失活以获得得到的微生物的失活形式。

13. 权利要求8或9的方法,其进一步包括获得所述微生物的培养上清液。

14. 权利要求10的方法,其进一步包括获得所述微生物的培养上清液。

用于预防和/或治疗口腔恶臭的用途和方法

[0001] 本发明涉及属于乳酸菌组的微生物,其能够显著降低唾液中的肽浓度,从而耗尽了口腔微生物群落 (microflora) 的厌氧微生物使用的底物,所述微生物群落是口腔恶臭 (oral malodour) 的病原体。此外,本发明涉及属于乳酸菌组的微生物,所述微生物能够刺激唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*) 的生长,但不刺激变形链球菌 (*Streptococcus mutans*) 和/或牙龈红棕色单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 的生长。

[0002] 本发明还涉及含有上述微生物的组合物,所述组合物用于预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭 (halitosis) 的用途,以及预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭的方法。

[0003] 口腔卫生的常见问题是慢性口臭 (口臭)。治疗口臭的主流方法是通过使用含有例如薄荷醇的漱口剂类或口香糖掩饰或中和令人不快的气味。然而,这些方法仅短期有效,而长期内则无效。因此,需要预防或治疗口臭的长期方法。在本领域现有技术中,通过大概都以降低厌氧菌数量为目标的不同方法解决所述问题,所述厌氧菌生产“挥发性硫化物” (VSC),例如硫化氢和甲硫醇。

[0004] 一种已描述的降低这类细菌的方法是用刮舌器去除舌苔,从而从舌头上消除细菌繁殖用的底物。另一种方法是用金属盐 (例如,氯化锌) 或消毒剂 (例如,醇或氯己定) 处理舌头。然而,这类方法的缺点是金属盐和消毒剂也抑制其他无害或甚至有益的口腔微生物的生长。

[0005] 一种已描述的治疗或预防口臭的方法是维持唾液的pH在生理正常水平。已知与龋和粘膜感染相关的微生物物种偏爱酸性pH;与牙周病发展相关的微生物物种偏爱高于正常值的pH;而与良好的口腔健康相关的微生物物种偏爱正常的pH。使用该机制的含有益生菌 (例如,乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和链球菌属 (*Streptococcus*)) 的组合物公开在US200707137和US2006018843中。W02007/077210公开了用于重建与良好的口腔健康相关的口腔微生物群落的方法,使用产弱酸或不产酸的益生菌剂与具有提高pH或缓冲pH的物质 (例如,碳酸氢盐、尿素、磷酸盐、蛋白质和/或盐) 的物质组合,其中所述益生菌剂选自早期建群的通常存在于健康口腔微生物群落中的口腔细菌 (例如,链球菌属 (口)、真杆菌属 (*Eubacterium*)、奈瑟氏菌属 (*Neisseria*)、韦永氏球菌属 (*Veillonella*))。US2006045870公开了属于魏斯氏菌属 (*Weissella*) 的活乳酸菌,所述乳酸菌通过与VSC产生菌相互作用可抑制VSC产生菌的生长,并在有氧和无氧条件下产生过氧化氢。US2006171901公开了另一种抑制厌氧菌——特别是导致口臭的细菌——生长的方法,涉及生产BLIS (细菌素样抑制性物质) 的唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*) 菌株及其提取物。

[0006] 可获得的用于预防和治疗口臭的方法的缺点是,大部分这类方法不仅抑制已知是口腔恶臭的主要诱因的VSC产生菌的生长,而且它们还抑制其他无害的口腔微生物的生长。

[0007] 因此,本发明的目标是提供替代的手段和方法,用于预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭。

[0008] 因此,在本发明的第一个方面,涉及属于乳酸菌组的微生物,其特征是当进行下列测定 (a) 时,所述微生物表现出下列性质 (b):

[0009] 测定 (a):

[0010] (a) 在37℃的厌氧条件下,在含有15g/l肽的合成培养基中用 1×10^7 细胞/ml的起始细胞密度培养微生物24h;

[0011] (b) 在4000xg离心15min去除细胞;和

[0012] (c) 确定所获得的上清液中的肽浓度;

[0013] 性质(b):

[0014] 微生物导致培养基中的肽浓度降低,使得与15g/l的起始浓度相比,在孵育24h后上清液中的肽浓度降低至少20%,即,微生物能够降低测定(a)中的培养基中的肽浓度至少20%。

[0015] 在优选的实施方案中,当进行下列测定(A)时,本发明的微生物还表现出下列性质(B):

[0016] 测定(A):

[0017] (a) 在37℃的厌氧条件下,在100ml合成培养基中用 1×10^7 细胞/ml的起始细胞密度培养微生物24h;

[0018] (b) 然后,在4000xg离心细胞15min并重悬在20ml H₂O中;

[0019] (c) 随后将细胞冷冻至-80℃,并在真空冻干16h;

[0020] (d) 将10mg冻干的细菌重悬在H₂O中,在4000xg离心10min;

[0021] (e) 将含7g/l肽的1ml合成培养基添加至细胞沉淀物,将细胞重悬在培养基中,在37℃需氧孵育5min后,在4000xg离心15min去除细胞;和

[0022] (f) 确定所获得的培养基上清液中的肽浓度;

[0023] 性质(B):

[0024] 与孵育期开始时的培养基浓度(7g/l)相比,冻干的细菌导致获得的培养基上清液中的肽浓度降低至少20%。

[0025] 在优选的实施方案中,本发明的微生物降低了测定(a)或(A)中的肽浓度至少30%,更优选的至少40%,甚至更优选的至少50%。

[0026] 在特别优选的实施方案中,本发明的微生物能够降低测定(A)中的肽浓度至少60%,甚至更优选的至少70%。

[0027] 因此,本发明提供的微生物可以有效的降低它的环境中的肽浓度,特别还是在唾液中,如所附实施例中描述的。已知,口腔恶臭是由这样的事实导致的,所述事实是健康口腔菌群(大部分由唾液链球菌组成)和病原性口腔菌群(大部分由厌氧性革兰氏阴性菌组成)的比例向分解唾液中存在的蛋白质为挥发性化合物的厌氧性革兰氏阴性菌改变。这导致引起口腔恶臭的挥发性硫化物的产生。

[0028] 本发明的微生物能够通过减少肽的量,从而耗尽口腔菌群的厌氧性革兰氏阴性菌的底物而减少口腔恶臭。

[0029] 术语“合成培养基”指化学成分确知培养基,即,培养基的化学组成是已知的。合成培养基可以是适合培养所讨论的微生物的任何合成培养基。在一个优选的实施方案中,合成培养基是US 6,340,585中公开的合成培养基。

[0030] 在优选的实施方案中,合成培养基是具有下列组成的培养基:

[0031] 鸟嘌呤: 0.1g/l

[0032] 胞嘧啶: 0.1g/l

[0033]	胸苷:	0.1g/l
[0034]	2'-脱氧腺苷:	0.1g/l
[0035]	2'-脱氧尿苷:	0.1g/l
[0036]	K ₂ HPO ₄ :	2g/l
[0037]	醋酸钠:	5g/l
[0038]	MgSO ₄ -七水合物:	0.1g/l
[0039]	柠檬酸氢二铵:	2g/l
[0040]	CaCl ₂ -二水合物:	0.5g/l
[0041]	油酸:	0.1% (w/v)
[0042]	氰钴胺素:	0.02mg/l
[0043]	核黄素:	10mg/l
[0044]	叶酸:	0.2mg/l
[0045]	吡哆醛-5-磷酸-单水合物:	10mg/l
[0046]	4-氨基苯甲酸:	0.2mg/l
[0047]	D(+)-生物素:	1mg/l
[0048]	抗坏血酸:	500mg/l
[0049]	烟酸:	10mg/l
[0050]	泛酸钙:	10mg/l
[0051]	硫胺素:	1mg/l
[0052]	硝酸钴(II)-六水合物:	500mg/l
[0053]	MnSO ₄ -单水合物:	20mg/l
[0054]	MgSO ₄ -七水合物:	500mg/l
[0055]	Na ₂ MoO ₄ :	0.04mg/l
[0056]	PTU-提取物(Ohly, Deutsche Hefewerke Germany):	15g/l (或如别处所述)
[0057]	D-葡萄糖-单水合物:	10g/l
[0058]	术语“含有15g/l肽”(或“含7g/l肽”)意指在孵育期开始时合成培养基含有15g/l肽(或含7g/l肽,分别地)。原则上,肽可以是任何种类的肽。在优选的实施方案中,合成培养基中含有的肽是酵母提取物的形式,优选的PTU提取物。PTU提取物可购自Ohly, Deutsche Hefewerke, Germany。这是具有高含量的易获得肽的超滤低盐酵母提取物,优选的表现出下列特征:	
[0059]	<u>平均分析:</u>	
[0060]	●干物质:	96%
[0061]	●干物质中的蛋白质(Nx6, 25):	72.9%
[0062]	●干物质中的总氮:	11.7%
[0063]	●NaCl:	≤1.0%
[0064]	●灰份:	10%
[0065]	●pH(在2%溶液中):	5.7
[0066]	<u>维生素(典型):</u>	
[0067]	●盐酸化硫胺素 xHCl (B1):	1.2mg/100g

[0068]	●核黄素 (B2) :	7.0mg/100g
[0069]	●吡哆醇xHCl (B6) :	5.9mg/100g
[0070]	●烟酸:	47.8mg/100g
[0071]	●生物素:	0.022mg/100g
[0072]	●Ca-D-泛酸盐:	17.9mg/100g
[0073]	●叶酸:	3.7mg/100g

[0074] 氨基酸组成(典型),如图7所示。

[0075] 术语“细胞/ml的起始细胞密度”意指在培养期开始时用微生物接种合成培养基,使培养基中存在 1×10^7 细胞/ml。

[0076] 可以通过本领域技术人员已知的任何方法确定肽浓度。普遍确立的方法是例如,根据Biuret,Lowry或Bradford的方法。此外,可以使用任何可商购的试剂盒或用于确定肽浓度的其他工具。一个优选的实例是基于荧光染料的工具或试剂盒,例如Invitrogen的Quant-it蛋白质试剂盒。

[0077] 优选的如在所附实施例中描述的测定在上述测定(a)和/或测定(A)中的肽浓度的降低。

[0078] 如所附实施例中所示,令人惊讶的发现可以鉴别能够显著降低其环境中的肽浓度的乳酸菌。所述效应不仅在活细菌中观察到,而且还可见于冻干形式的菌。此外,实施例中显示,本发明的微生物不仅在上述测定中,而且在唾液中也表现出上述效应,当添加至唾液时,本发明的微生物的存在导致 H_2S 生产的显著降低。

[0079] 特别的,在优选的实施方案中,当进行下列测定(c)时,本发明的微生物还表现出下列性质(d):

[0080] 测定(c):

[0081] (a) 在37℃的厌氧条件下,在100ml合成培养基上用 1×10^7 细胞/ml的起始细胞密度培养微生物24h;

[0082] (b) 然后,在4000xg离心细胞15min并重悬在20ml H_2O 中;

[0083] (c) 随后将细胞冷冻至-80℃,并在真空冻干16h;

[0084] (d) 在深孔平板中,将10mg冻干的细菌重悬在 H_2O 中,在4000xg离心10min;

[0085] (e) 将含3g/l肽的1ml合成培养基添加至沉淀物,在37℃孵育5min后,在4000xg离心15min去除细胞;

[0086] (f) 然后将上清液转移至新的深孔平板中,随后接种10-100 μ l,优选的50 μ l未灭菌的人唾液,在37℃厌氧孵育6h,同时用浸透了醋酸铅的灭菌滤纸覆盖深孔平板;

[0087] (g) 通过确定滤纸的黑化(blackening)监控微生物在反应中生产的硫化氢;

[0088] 性质(d):

[0089] 与培养基没有用所述微生物预孵育的对照相比,存在本发明的微生物时,浸透醋酸铅的滤纸的黑化降低。降低的滤纸黑化表示用于接种培养基的未灭菌人唾液中含有的细菌的降低的 H_2S 生产。

[0090] 术语“降低的 H_2S 生产”意指与对照相比, H_2S 生产降低至少10%,更优选的至少20%,甚至更优选的至少30%,特别优选的至少40%,或者甚至至少50%。可以测量降低,例如通过密度分析滤纸的黑化。可选的,不使用滤纸测量步骤(f)和(g)中的硫化氢生产,而通

过使用气相色谱进行顶空分析来测量。

[0091] 本发明的第二个方面还涉及属于乳酸菌组的微生物,其特征是所述微生物能够刺激唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*) 的生长,但不刺激变形链球菌 (*Streptococcus mutans*) 和/或牙龈红棕色单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 的生长。

[0092] 术语“刺激”与唾液链球菌的微生物生长相关时,意指当与本发明的微生物接触时,该微生物的生长增加。增加的生长优选的意指繁殖的增加,即,每时间单位的细胞分裂。可选的,术语“刺激”还指单个细胞大小的增加。可以在用染料SYBR Green I (Molecular Probes, USA) 染色后,通过流式细胞仪 (例如, Becton-Dickinson FACS Sort 流式细胞仪, San José, CA) 评估细菌细胞的大小。用侧向角光散射 (SSC) 模式评估细菌细胞的大小。增加的生长因此意指每时间单位的生物量生产的增加。

[0093] 各微生物的生长的刺激优选的可以在体外观察,更优选的在测定中观察,在所述测定中本发明的微生物与唾液链球菌接触,并确定唾液链球菌的生长。可以通过在不同的孵育时间间隔计数细胞/集落的数目来确定生长,并可以与不含本发明的微生物的对照比较,从而允许确定是否存在生长的增加。

[0094] 用于确定生长的刺激的体外测定描述在实施例中,包括所谓的“光光测共孵育测定”。简而言之,此类测定包括下列步骤:

[0095] (a) 在1/2 TSY培养基中,将属于乳酸菌组的待测试的微生物与唾液链球菌混合,细胞计数比例为1:100 (乳酸菌:唾液链球菌);

[0096] (b) 在37°C 厌氧孵育培养悬浮液12h;

[0097] (c) 作为对照使用未消耗的1/2 TSY培养基或MRS light培养基;

[0098] (d) 在对数生长期确定最大光密度 ($OD_{600, \max}$) 和/或确定最大生长速率 ($V_{\max}$); 和

[0099] (e) 如果与对照相比,最大光密度 ($OD_{600, \max}$) 和/或最大生长速率 ($V_{\max}$) 增加至少10%,则将微生物分类为能够刺激唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*) 的生长的微生物。

[0100] 术语“1/2 TSY培养基”指以1:1 (体积:体积) 的比例用水稀释的TSY培养基。

[0101] 在优选的实施方案中,在96孔板中进行孵育。在更优选的实施方案中,在Bio Tek PowerWave微平板分光光度计 (Biotek Instruments GmbH, Germany) 中进行孵育。

[0102] 优选的如下确定 $OD_{600, \max}$ 和 $V_{\max}$:

[0103] 在开始孵育后,在延长的时间段 (优选的约8-12h) 测量OD为600时的光密度,以规律的间隔,例如每2.5分钟。对于确定 $OD_{600, \max}$,优选的在孵育后10h进行 OD_{600} 的确定。

[0104] 对于确定 $OD_{600, \max}$,根据所测量的三个最高值计算平均值。

[0105] 优选的通过选择表现出最陡峭的梯度的15个连续值来确定 $V_{\max}$ 。用于表示 $V_{\max}$ 的单位是mOD/min。优选的在时间段内进行用于计算 $V_{\max}$ 的 OD_{600} 的确定,所述时间段允许覆盖了培养微生物的对数生长期。

[0106] 优选的,与对照相比,本发明的微生物导致在上述测定中唾液链球菌的最大光密度 ($OD_{600, \max}$) 或最大生长速率 ($V_{\max}$) 的增加至少15%,更优选的至少20%,甚至更优选的至少30%和特别优选的至少40%、50%、60%、70%或者甚至80%。

[0107] 在优选的实施方案中,上述本发明的微生物不仅刺激唾液链球菌的生长,而且还刺激健康口腔微生物群落的至少一种其他微生物的生长。此类微生物的实例是口腔链球菌

(*Streptococcus oralis*) 和表皮链球菌 (*Streptococcus epidermidis*)。可以通过上述测定来测量这类细菌的刺激。

[0108] 上述本发明的微生物的特征还表征为其不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长。如果当与之接触时,微生物不导致变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的增加了的生长,则视所述微生物不刺激暂时病原性微生物群落的微生物的生长。可以在体外测试生长的刺激或刺激缺失。用于确定生长的刺激或刺激缺失的体外测定描述在实施例,包括所谓的“光测共孵育测定”。简而言之,在变形链球菌的情况下,此类测定包括下列步骤:

[0109] (a) 在37℃的厌氧条件下,在含150μl合成培养基的96孔板中,培养待测试的属于乳酸菌组的微生物24h,在4000xg离心沉淀细胞15min并去除上清液;

[0110] (b) 在封闭的15ml Falcon管中的5ml TSY培养基中37℃厌氧培养变形链球菌过夜;

[0111] (c) 将变形链球菌细胞培养物以2:1的容积比与步骤(a)的上清液混合;

[0112] (d) 在37℃厌氧孵育培养悬浮液12h;

[0113] (e) 作为对照,使用未消耗的1/2TSY培养基或MRS light培养基;

[0114] (f) 在对数生长期确定最大光密度 ($OD_{600,max}$) 或最大生长速率 (V_{max});和

[0115] (g) 如果与对照相比,最大光密度 ($OD_{600,max}$) 和/或最大生长速率 (V_{max}) 没有增加,则将微生物分类为不能够刺激变形链球菌生长的微生物。

[0116] 可选的,此类测定可以包括下列步骤:

[0117] (A) 在1/2TSY培养基中,将属于乳酸菌组的待测试的微生物与变形链球菌混合,细胞计数比例为1:100(乳杆菌(*Lactobacillus*):变形链球菌);

[0118] (B) 在37℃厌氧孵育培养悬浮液12h;

[0119] (C) 作为对照使用未消耗的1/2TSY培养基或MRS light培养基;

[0120] (D) 在对数生长期确定最大光密度 ($OD_{600,max}$) 和/或确定最大生长速率 (V_{max});和

[0121] (E) 如果与对照相比,最大光密度 ($OD_{600,max}$) 和/或最大生长速率 (V_{max}) 没有增加,则将微生物分类为不能够刺激变形链球菌生长的微生物。

[0122] 在牙龈红棕色单胞菌的情况下,此类测定包括下列步骤:

[0123] (h) 在37℃的厌氧条件下,在含150μl合成培养基的96孔板中,培养待测试的属于乳酸菌组的微生物24h,在4000xg离心沉淀细胞15min并去除上清液;

[0124] (i) 在封闭的15ml Falcon管中的5ml FAB培养基中37℃厌氧培养牙龈红棕色单胞菌过夜;

[0125] (j) 将牙龈红棕色单胞菌细胞培养物以2:1的容积比与步骤(h)的上清液混合;

[0126] (k) 在37℃厌氧孵育培养悬浮液45h;

[0127] (l) 作为对照,使用未消耗的FAB培养基;

[0128] (m) 在孵育 (OD_{600}) 10、15、21、39和45h后,确定光密度 (OD_{600});和

[0129] (n) 如果与对照相比,各测量时间时的光密度 (OD_{600}) 没有增加,则将微生物分类为不能够刺激牙龈红棕色单胞菌生长的微生物。

[0130] 可选的,此类测定包括下列步骤:

[0131] (H) 在FAB培养基中,将属于乳酸菌组的待测试的微生物与牙龈红棕色单胞菌混合,细胞计数比例为1:100(乳杆菌:牙龈红棕色单胞菌);

- [0132] (I) 在37℃厌氧孵育培养悬浮液45h;
- [0133] (J) 作为对照使用未消耗的FAB培养基;
- [0134] (K) 在对数生长期确定最大光密度($OD_{600,max}$)和/或确定最大生长速率(V_{max});和
- [0135] (L) 如果与对照相比,最大光密度($OD_{600,max}$)和/或最大生长速率(V_{max})没有增加,则将微生物分类为不能够刺激牙龈红棕色单胞菌生长的微生物。
- [0136] 在优选的实施方案中,在96孔板中进行步骤(d)和(B)中的孵育。在更优选的实施方案中,在Bio Tek PowerWave微平板(Fa.Biotek Instruments GmbH,Germany)分光光度计中进行孵育。
- [0137] 在优选的实施方案中,在96孔板中进行步骤(k)和(l)中的孵育。在另一个优选的实施方案中,在Whitley DG250厌氧工作站(Meintrup-DWS,Germany)中进行孵育。
- [0138] 关于 $OD_{600,max}$ 和 V_{max} ,如本文前述进行相同应用。
- [0139] 如果当与下述微生物接触时,变形链球菌或牙龈红棕色单胞菌生长不增加或仅轻微的增加,则所述微生物视为不刺激变形链球菌或牙龈红棕色单胞菌的微生物生长。“轻微增加”意指当与对照相比时,生长没有增加超过5%,更优选的当与对照相比时,生长没有增加超过2%。术语“没有增加”意指当与不存在本发明的微生物的对照相比时,与本发明的微生物接触时,在变形链球菌或牙龈红棕色单胞菌的生长之间不可见统计学相关的差异。在优选的实施方案中,术语“没有增加”还包括微生物实际上导致变形链球菌或牙龈红棕色单胞菌的生长降低的情况,即,所述微生物抑制此类微生物的生长。
- [0140] 在另一个优选的实施方案中,本发明的微生物不消极的影响变形链球菌或牙龈红棕色单胞菌的生长。术语“不消极的影响”意指当与不存在本发明的微生物的对照相比时,与本发明的微生物接触时,不可见变形链球菌或牙龈红棕色单胞菌的生长的抑制。
- [0141] 在优选的实施方案中,本发明的微生物不仅不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长,而且还不刺激口腔微生物群落的至少一种其他病原性微生物的生长。病原性口腔细菌的代表是厌氧的、革兰氏阴性菌。其他实例是伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)、内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)、核粒梭菌(*Fusobacterium nucleatum*)、核粒梭菌多形体(*Fusobacterium nucleatum polymorphum*)、中间拟杆菌(*Prevotella intermedia*)、*Solobacterium moorei*、格氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)、缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)、血链球菌(*Streptococcus sanguinis*)、*Tannerella forsythensis*和齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)。
- [0142] 可以通过上述用于变形链球菌和牙龈红棕色单胞菌的测定来测量这类细菌的生长的刺激或刺激缺失。
- [0143] 在优选的实施方案中,上述本发明的微生物的特征是它们不仅作为活细胞表现出刺激唾液链球菌的生长的效应,而且作为培养上清液也表现出所述效应。这意味着从本发明的微生物获得的培养上清液也表现出刺激唾液链球菌的生长的效应。优选的在下列测定中存在所述效应:
- [0144] (a) 在含8ml TSY培养基的6孔板中,37℃厌氧培养唾液链球菌过夜;
- [0145] (b) 在37℃的厌氧条件下,在含150 μ l合成培养基的96孔板中,培养待测试的属于乳酸菌组的微生物24h,在4000xg离心沉淀细胞15min并去除上清液;

[0146] (c) 在1/2TSY培养基中,将步骤(a)的唾液链球菌细胞培养物以2:1至4:1的容积比与步骤(b)的上清液混合;

[0147] (d) 在37℃厌氧孵育培养悬浮液12h;

[0148] (e) 作为对照,使用未消耗的1/2TSY或MRS light培养基;

[0149] (f) 在对数生长期,确定最大光密度($OD_{600,max}$)和/或确定最大生长速率(V_{max});和

[0150] (g) 如果与对照相比,最大光密度($OD_{600,max}$)和/或最大生长速率(V_{max})增加至少10%,则将微生物分类为能够刺激唾液链球菌生长的微生物。

[0151] 在优选的实施方案中,在96孔板中进行孵育。在更优选的实施方案中,在Bio Tek PowerWave微平板分光光度计(Biotek Instruments GmbH,Germany)中进行孵育。

[0152] 关于 $OD_{600,max}$ 和 V_{max} ,如本文前述进行相同应用。

[0153] 优选的,与对照相比,本发明的微生物导致在上述测定中唾液链球菌的最大光密度($OD_{600,max}$)或最大生长速率(V_{max})的增加至少15%,更优选的至少20%,甚至更优选的至少30%和特别优选的至少40%、50%、60%、70%或者甚至80%。

[0154] 在特别优选的实施方案中,由本发明的微生物表现出的对唾液链球菌生长的刺激耐热处理,即,当细胞(或其提取物)或培养上清液进行热处理时也存在上述刺激。热处理优选的是在60℃和100℃之间的温度,更优选的是在70℃和90℃之间,甚至更优选的是在75℃和85℃之间,和最优选的是在约80℃或精确的80℃的温度的热处理。

[0155] 通常,热处理应该持续至少1分钟的时间。优选的,热处理持续至少n分钟的时间,其中n是在2-60范围内的整数,n=10或15或20是特别优选的。然而,原则上孵育时间没有上限。然而,优选的不超过4、3、2或1小时。最优选的热处理是在孵育箱中80℃的温度下约10分钟。最优选的热处理被认为是消除所有的蛋白质功能和所有的细胞活力,从而将上述属于乳酸菌组的微生物与其他微生物区别开,因为前者仍然能够刺激唾液链球菌的生长。因此,如果需要微生物不应当存活时,用于本发明的上下文中的任何食品、饲料、饮料或组合物是非常有效的。

[0156] 在冷却后,在本文前述的测定中或如所附实施例的描述,确定本发明的微生物(或其提取物)或其培养上清液刺激唾液链球菌生长的能力。在上下文中,使用本发明的微生物的培养上清液,相应的测定优选的包括下列步骤:

[0157] (h) 在含8ml TSY培养基的6孔板中,37℃厌氧培养唾液链球菌;

[0158] (i) 在37℃的厌氧条件下,在含150μl合成培养基的96孔板中,培养待测试的属于乳酸菌组的微生物24h,在4000xg离心沉淀细胞15min并去除上清液;

[0159] (j) 在孵育箱中,80℃孵育上清液10min,然后将其冷却至室温;

[0160] (k) 在1/2TSY培养基中,将步骤(a)的唾液链球菌细胞培养物以2:1的容积比与步骤(j)的上清液混合;

[0161] (l) 在37℃厌氧孵育培养悬浮液12h;

[0162] (m) 作为对照,使用未消耗的1/2TSY或MRS light培养基;

[0163] (n) 在对数生长期,确定最大光密度($OD_{600,max}$)和/或确定最大生长速率(V_{max});和

[0164] (o) 如果与对照相比,最大光密度($OD_{600,max}$)和/或最大生长速率(V_{max})增加至少10%,则将微生物分类为能够刺激唾液链球菌生长的微生物。

[0165] 此外,本发明微生物不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌生长的性质也耐

受热处理。关于术语热处理的定义,如上述相同的应用。

[0166] 在另一个优选的实施方案中,本发明的微生物表现出的对唾液链球菌生长的刺激耐受冻干,即,当细胞经历冻干处理时仍存在。冻干处理优选的是将细胞(或其提取物)或细胞上清液首先冷冻至 -80°C ,然后在真空冻干16h的冻干处理。在冻干处理后,通过本文前述的测定或如所附实施例的描述,可以测试本发明的微生物刺激唾液链球菌生长的能力。在上下文中,使用本发明微生物的培养上清液,相应的测定优选的包括下列步骤:

[0167] (p) 在含8ml TSY培养基的6孔板中, 37°C 厌氧培养唾液链球菌过夜;

[0168] (q) 在 37°C 的厌氧条件下,在封闭的100ml瓶中的50ml合成培养基中,培养待测试的属于乳酸菌组的微生物过夜,在4000xg离心沉淀细胞15min并去除上清液;

[0169] (r) 将20ml步骤(q)的上清液冷冻至 -80°C ,在真空冻干16h;

[0170] (s) 将冻干的上清液重悬在20ml水中;

[0171] (t) 在96孔板中的1/2TSY培养基中,将步骤(a)的唾液链球菌细胞培养物以2:1的容积比与步骤(s)的上清液混合;

[0172] (u) 在 37°C 厌氧孵育培养悬浮液12h;

[0173] (v) 作为对照,使用未消耗的1/2TSY或MRS light培养基;

[0174] (w) 在对数生长期,确定最大光密度($\text{OD}_{600,\text{max}}$)和/或确定最大生长速率(V_{max});和

[0175] (x) 如果与对照相比,最大光密度($\text{OD}_{600,\text{max}}$)和/或最大生长速率(V_{max})增加至少10%,则将微生物分类为能够刺激唾液链球菌生长的微生物。

[0176] 根据特别优选的实施方案,本发明的微生物分别表现出在发明的第一和第二方面描述的两类性质,即,表现出如第一方面(显著降低肽浓度)中描述的性质(b)和/或(B),且表现出如第二方面所述的性质(刺激唾液链球菌生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌生长)。

[0177] 如上述,本发明的微生物由于其性质,允许将口腔微生物群落的平衡移向唾液链球菌,所述转移导致关于出现较少的恶臭的改善。

[0178] 如上明显可见,所有上述特征导致上述属于乳酸菌组的微生物成为减少口腔恶臭和/或口臭,或预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭的合适活性剂,所述口腔恶臭和/或口臭特别是由口腔微生物群落的病原性微生物导致的口腔恶臭和/或口臭,所述微生物特别是厌氧的、革兰氏阴性菌。因此,本发明的微生物具有降低口腔恶臭的效应,因而是用于预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭的有效活性剂。

[0179] 术语“预防口腔恶臭”包括口腔恶臭的预防。因此,从未遇到过上述导致产生口腔恶臭的微生物,但是可能存在遇到的风险,即,感染此类微生物的对象;或者仍然具有良好平衡的口腔微生物群落的对象可以受益于例如本发明的微生物、组合物、用途和方法,使所述对象可免于患口腔恶臭。因此,由于婴儿或幼兽的口腔通常不含导致产生口腔恶臭的微生物,故本发明的微生物、组合物、用途和方法可以例如用于婴儿、儿童或幼兽,用于预防口腔恶臭。然而,根据本发明使用的微生物和组合物不限于向婴儿、儿童或幼兽施用。

[0180] 术语“治疗口腔恶臭”和“治疗口臭”包括出于消除所产生的恶臭的量的目的,向患有口腔恶臭和/或口臭的对象施用如本文所述的微生物或组合物。

[0181] 任选的,本发明的微生物是益生微生物,所述益生微生物除了它的降低口腔恶臭的效应外,还具有对施用它的宿主生物的有利效应。通过通常接受的定义,“益生”是“通过

改善宿主的肠微生物平衡,有利的影响宿主动物的活微生物饲料添加物”。

[0182] 因此,本发明提供了易于施用的细菌的用途,所述细菌是食品级的生物,除其降低口腔恶臭的效应外,还可作为益生菌剂使用。

[0183] 令人惊讶的是,利用失活形式的微生物,例如冻干形式或用UV光或辐射处理获得的形式,也可以观察到本发明的微生物的效应,所述效应是从培养基中,因而也从唾液中有有效去除肽,从而阻止口腔微生物群落中存在的其他微生物生产相应物质,所述其他微生物是对产生导致生成口腔恶臭的物质生产负责的。

[0184] 最重要的是在存在唾液的条件下也存在所述效应,这使本发明的微生物特别适合以口腔应用的形式或作为食品、饲料或饮料的添加剂使用。引人注意的是,热失活的或冻干形式的本文公开的所述微生物,特别是其类似物、衍生物或片段,仍能够特别有效的降低上述测定中的肽浓度。

[0185] 相似的,本发明的微生物如本发明第二方面所述的性质,即,刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长,不仅在使用微生物本身时存在,而且在使用微生物的培养上清液和失活形式时也存在。特别是,刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的性质耐受热处理,且耐受冻干处理。

[0186] 这些令人惊讶的效应对于在用于动物,优选的用于人或哺乳动物的组合物中使用所述微生物的所述失活形式、培养上清液、类似物或片段,及其变体或衍生物,来预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭是有利的。特别是所述失活形式、培养上清液、类似物或片段可以方便的添加到任何组合物中,例如,化妆品或药物组合物,食品或饲料或饮料等。此外,此类失活形式、培养上清液、类似物或片段的产生是廉价且方便的,且可以在不损失它们的降低肽浓度和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力的条件下,储存延长的时间段。本发明的微生物的特别优势在于如果进行冻干或喷雾干燥或干燥,则其保留了它的降低肽浓度和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力。此外,甚至在热处理后,仍然保留了刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的性质。上述性质使本发明的微生物成为用于如本文所述的组合物中的有利成分。

[0187] 此外,在优选的实施方案中,本发明的微生物在存在唾液的条件下,也表现出上述性质(即,降低肽浓度和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长)。唾液是由唾液腺合成的外源分泌物。它是复杂的液体,除约99%的水外,还含有多种有机和无机化合物。唾液的生理成分特别是酶,例如淀粉酶、碳酸酐酶(carboanhydrase)、溶菌酶、过氧化物酶;或蛋白质,例如黏蛋白、乳铁蛋白(lactoferrin)、富含脯氨酸的蛋白质、半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatines)、富组蛋白(histatines)或statherines或可溶性IgA。因此,虽然唾液中存在多种潜在的干扰物质,但是本发明的微生物的上述性质不受唾液存在的阻碍。

[0188] 上述属于乳酸菌组的微生物的上述特征使它成为用于预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭的强力且有效的活性剂,因为它主要以各种形式向口中施用,包括口腔和牙齿,其中特别是在存在包含一些蛋白酶的唾液,以及在消化含碳水化合物的食物后存在低pH值时。此外,对热和/或冻干的抗性对于在制备所述食品的过程中,将上述属于乳酸菌组的微生物作为添加剂添加到食品中具有有益的效果。即,食品经常进行热灭菌、预烹饪、巴氏消

毒等,这对微生物的活力是有害的。

[0189] 本发明的其他实施方案和优点部分论述在本说明书中,而部分是根据说明书显而易见的,或者可以从本发明的实践中学习到。

[0190] 在详细描述本发明之前,应当理解本发明不限于本文中所述的特定方法学、方案、细菌、载体和试剂等,因为这些可加以变化。还应当理解本文中所用的术语仅用于说明特定实施方案的目的,并且不意图限制本发明的范围,该范围仅由后附的权利要求书限制。除非另外定义,本文中所用的全部技术术语和科学术语具有如本领域内普通技术人员通常所理解的相同含义。

[0191] 优选地,本文中所用术语如在“生物技术术语多国语言词汇表:(IUPAC推荐)”,**Leuenberger, H.G.W. Nagel, B.和 Kölbl, H.**编辑(1995),*Helvetica Chimica Acta*,CH-4010巴塞尔,瑞士)中描述。

[0192] 在本说明书和随后的权利要求书整个范围内,除非内容需要,否则词汇“包含(comprised)”和其变体如“包含了”和“包含着”(“comprises”和“comprising”)将理解为包含所述的整数或步骤或整数组或步骤组,是不排除任何其他其他的整数或步骤或整数组或步骤组。

[0193] 几份文献在本说明书文本中全篇引用。本文中所引用的每一份文献(包括全部专利、专利申请、科学公开、制造商说明书、指南等),无论在前或是在后,在本文中均完整引用作为参考。本文中任何内容不构成承认本发明由于在先发明而未进行授权以使此公开提前。

[0194] 必须指出如本文中所用以及在后续权利要求书中,单数形式“一个”和“该”(“a”、“an”和“the”)包括复数,除非内容清楚地标明。因此,例如谈及的“一种试剂”包括一份或多份此类不同试剂,并且谈及的“该方法”包括对可以加以修改或替换本文中所述方法的本领域技术人员所知的等效步骤和方法。

[0195] 当用于本发明上下文中时,术语“属于乳酸菌组的微生物”包含(a)属于细菌的,尤其属于革兰氏阳性发酵型真细菌,更特别地属于包括乳酸菌在内的乳杆菌科的细菌。此外,所述术语还涵盖了衍生物或变体或类似物或片段,例如如本文所述的所述微生物的细胞提取物或膜级分,所述细胞提取物或膜级分保留了上述性质(即,降低肽浓度和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长)。术语“衍生物”、“变体”、“类似物”和“片段”在本文其他地方描述。从分类学观点看,乳酸菌划分为亚类:链球菌属(*Streptococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、和乳杆菌属(*Lactobacillus*)。上述属于乳酸菌组的微生物优选是乳杆菌属物种。乳酸菌组的成员通常缺乏卟啉和细胞色素,不实施电子转运磷酸化作用,因此它们仅通过底物水平磷酸化作用得到能量。即在乳酸菌中,ATP通过糖类发酵合成。所有乳酸菌均厌氧生长,然而,与众多厌氧菌不同,大部分乳酸菌对氧不敏感并且因此可以在氧存在以及氧不存在时生长。因此,上述属于乳酸菌组的微生物优选是耐氧的厌氧乳酸菌,优选地属于乳杆菌属。

[0196] 上述乳杆菌细菌优选地呈杆状或球形,从修长和纤细的杆菌变化至短的弯曲杆菌,更优选地是不游动的和/或是不产生孢子的,并且产生乳酸作为主要或唯一的发酵代谢产物。在一个优选实施方案中,上述微生物所属的乳杆菌属按照如下特征分为三个主要亚组,因此预计上述乳杆菌属物种可以属于这三个主要亚组的每一个亚组:

- [0197] (a) 同型发酵的乳杆菌属
- [0198] (i) 通过糖酵解途径从葡萄糖产生至少85%量的乳酸,优选是L-、D-或DL-乳酸异构体;
- [0199] (ii) 在45℃温度生长,但在15℃温度不生长;
- [0200] (iii) 为长杆形;并且
- [0201] (iv) 在细胞壁中具有磷壁酸甘油;
- [0202] (b) 同型发酵的乳杆菌属
- [0203] (i) 通过糖酵解途径产生乳酸,优选是L-或DL-乳酸异构体;
- [0204] (ii) 在15℃温度生长,但在45℃显示可变生长;
- [0205] (iii) 为短杆形或棒状;并且
- [0206] (iv) 在它们的细胞壁中具有磷壁酸核糖醇和/或磷壁酸甘油;
- [0207] (c) 异型发酵的乳杆菌属
- [0208] (i) 通过磷酸戊糖途径从葡萄糖产生至少50%量的乳酸,优选是DL-乳酸异构体;
- [0209] (ii) 产生二氧化碳和乙醇;
- [0210] (iii) 在15℃或45℃温度显示可变生长;
- [0211] (iv) 为长杆状或短杆状;并且
- [0212] (v) 在它们的细胞壁中具有磷壁酸甘油。
- [0213] 基于上述特征,上述微生物可以划分为属于乳酸菌组,尤其乳杆菌属。通过运用经典分类学,例如参考“伯杰氏系统细菌学手册”(Williams &Wilkins Co.,1984)中的相关描述,可以确定微生物属于乳杆菌属。备选地,微生物可以通过本领域已知方法划分为属于乳杆菌属,例如,通过它们的代谢指纹,即此类一种或多种微生物的糖类代谢能力的比较性概览,或通过例如在Schleifer等, *System. Appl. Microb.*, 18 (1995), 461-467或Ludwig等, *System. Appl. Microb.*, 15 (1992), 487-501中所描述的其他方法。上述微生物能够代谢对属于乳杆菌属的微生物为典型并在本领域中已知的糖源。然而优选地,上述微生物具有选自如下的代谢指纹:
- [0214] (i) 它代谢D-乳糖,但不代谢L-山梨糖和/或D-蔗糖和/或D-菊粉,
- [0215] (ii) 它代谢菊粉,
- [0216] (iii) 它代谢L-山梨糖,但不代谢D-乳糖和/或D-蔗糖和/或菊粉,和
- [0217] (iv) 它代谢L-山梨糖,D-乳糖和菊粉。
- [0218] 优选地,上述微生物具有选自如下的代谢指纹:
- [0219] (i) 它代谢D-乳糖,但不代谢L-山梨糖,D-蔗糖和菊粉,
- [0220] (ii) 它代谢L-山梨糖,D-乳糖和菊粉,但不代谢D-蔗糖,
- [0221] (iii) 它代谢L-山梨糖,但不代谢D-乳糖,D-蔗糖和菊粉,和
- [0222] (iv) 它代谢L-山梨糖,D-乳糖,D-蔗糖,但不代谢菊粉。
- [0223] 当然,上述微生物不限于以前述代谢指纹形式代谢所提及的糖,但可以具有代谢通常为乳杆菌属物种所代谢的其他糖类的能力。
- [0224] 上述微生物属于乳杆菌属还可以使用本领域内已知的其他方法表征,如将待确定物种的总蛋白用SDS-PAGE凝胶电泳并将它们与已知且已表征的乳杆菌属菌株进行比较。本领域技术人员众所周知用于制备如上所述总蛋白图谱的技术以及此类图谱的数值分析。然

而,只有当此过程的每一阶段充分标准化后,结果才可靠。为了满足在测定微生物附着于乳杆菌属时所需的精确性,标准化的方法通常由这些方法的创始人向公众提供,如Pot等在1994年9月12日至16日比利时根特大学由欧盟组织的“专题讨论会”期间提出的标准化方法(用于细菌分类和鉴定的指纹技术、全细胞蛋白的SDS-PAGE)。该技术中用于分析SDS-PAGE电泳凝胶的软件非常重要,因为物种相关程度依赖于该软件所使用的参数和算法。无需深入理论细节,由密度计测量并通过计算机归一化的条带的定量比较优选以Pearson相关系数进行。如此得到的相似性基线可以借助UPGMA(使用平均连锁的非加权配对分组方法)算法组织,UPGMA不仅能将最相似的图谱分成一组,而且还能构建进化树(参见在M.Goodfellow,A.G.O'Donnell编辑的Computer-assisted Bacterial Systematic中第337-368页Kerster,Numerical Methods in the classification and identification of bacteria by electrophoresis,John Wiley and Sons Ltd,1985)。

[0225] 备选地,所述的微生物属于乳杆菌属还可以在所谓Riboprinter.RTM中从核糖体RNA方面表征。更优选地,上述物种与乳杆菌属的关系通过将所述细菌的16S核糖体RNA的核苷酸序列或编码16S核糖体RNA的基因组DNA的核苷酸序列与迄今所知乳酸菌的其他属和物种的核苷酸序列比较得到证实。另一种用于测定该物种与乳杆菌属的结合的优选替代方法是使用靶向16S-23S rRNA间隔区的种属特异性PCR引物。又一个优选的替代方法是借助产生株特异性DNA带型的RAPD-PCR(Nigatu等在Antonie van Leenwenhoek(79),1-6,2001),该方法允许确定鉴定的微生物来源于乳杆菌属。用于测定微生物来源于乳杆菌属的另一些技术是限制性片段长度多态性(RFLP)(Giraffa等,Int.J.Food Microbiol.82(2003),163-172)、重复元件指纹图谱(Gevers等,FEMS Microbiol.Lett.205(2001)31-36)或细菌细胞的脂肪酸甲酯(FAME)图式分析(Heyrman等,FEMS Microbiol.Lett.181(1991),55-62)。备选地,乳杆菌属细菌可以通过凝集素分型(Annuk等,J.Med.Microbiol.50(2001),1069-1074)或通过分析细菌的细胞壁蛋白质(Gatti等,Lett.Appl.Microbiol.25(1997),345-348)确定。

[0226] 上述微生物优选的是属于乳杆菌属的乳酸菌,更优选的是如本文所述的乳杆菌属物种,特别是属于选自以下的物种的乳杆菌:嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、乳酸乳杆菌(*Lactobacillus lactis*)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbruckii*)、*Lactobacillus algidus*、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、*Lactobacillus camelliae*、*Lactobacillus coleohominis*、*Lactobacillus crustorum*、*Lactobacillus diolivorans*、异型腐酒乳杆菌(*Lactobacillus heterohiochii*)、希氏乳杆菌(*Lactobacillus hilgardii*)、*Lactobacillus kimchii*、林氏乳杆菌(*Lactobacillus lindneri*)、口乳杆菌(*Lactobacillus oris*)、*Lactobacillus pantheris*、类布赫内氏乳杆菌(*Lactobacillus parabuchner*)和*Lactobacillus saerimneri*。甚至更优选的所述乳杆菌是嗜酸乳杆菌。然而,乳杆菌属物种不因此受限。上述微生物可优选经过“分离”或“纯化”。术语“分离”意指将物质从其原始环境中移出,例如当物质天然存在时从其天然环境中移出。例如,在天然系统中与某些或全部共同存在物质分开的天然存在的一种微生物优选乳杆菌属物种是分离的。此种微生物可以是组合物的部分,并且被视作仍是分离的,因为该组合物不是此微生物天然环境的部分。

[0227] 术语“纯化的”不需要绝对纯净；实际上，它意为一个相对的定义。自文库所获得的单个微生物已常规地纯化至微生物学上的均一，即当通过领域内已知方法在琼脂平板上划线时，它们长成单个的菌落。优选地，用于此目的的琼脂平板对乳杆菌属物种有选择性。此类选择性琼脂平板在本领域内已知。

[0228] 更优选的，上述属于乳酸菌组的微生物选自具有DSMZ登录号DSM19825、DSM19826、DSM19827的嗜酸乳杆菌，或其变体或衍生物，其中所述变体或衍生物保留了如前文所述在测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力。术语“具有DSMZ登录号的嗜酸乳杆菌”涉及属于物种嗜酸乳杆菌的微生物细胞，由BASF AG在德意志微生物保藏中心(Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) (“DSMZ”)在2007年11月1日保藏的，并具有下列保藏编号：DSM19825、DSM19826、DSM19827。DSMZ位于德国38124不伦瑞克，因霍芬路7b(Inhoffenstr.7b,38124 Braunschweig,Germany)。

[0229] 前述的DSMZ保藏根据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约的条款进行。

[0230] 上述属于乳酸菌组的微生物的“变体或衍生物”，优选的保藏的嗜酸乳杆菌的“变体或衍生物”优选的具有与各保藏菌株的相同的特征，即，它保留了如前文所述在测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力，和/或它保留了刺激唾液链球菌的生长，但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力。例如，所述衍生物可以进行基因工程化。在本发明的上下文中，术语“基因工程化”以其最广泛的含义用于本领域技术人员已知的方法以便在体外和体内修饰目的核酸，以至通过重组DNA技术实施了遗传修饰并改变了基因。因此，所述的方法包括重组核酸的克隆、测序和转化为优选。为此目的，包括用于乳杆菌属物种的适宜载体例如在EP-B1 506 789、EP-B1 316 677、EP-B1 251 064、EP-B1 218 230、EP-B1 133046或WO 89/01970中描述。

[0231] 引物、酶、用于克隆中间构建体的其他宿主细胞等可以得到使用并且为技术人员所知。优选地，基因工程变体包含上述属于乳酸菌组的微生物的细胞，优选地包含携带了包含在细菌染色体和/或质粒里的重组核酸的已保藏乳杆菌属物种的细胞。该重组核酸优选地对上述属于乳酸菌组的微生物为外来。说到“外来”，这意指多核苷酸和核酸分子对宿主细胞是异源的，即意味衍生自具有不同基因组背景的细胞或生物，或多核苷酸和核酸分子对宿主细胞是同源的但是处在与该核酸分子的天然存在对应物不同的基因组环境中。这意味如果核酸分子与宿主细胞同源，该核酸分子不处在所述宿主细胞基因组内该核酸分子的天然位置上，尤其该核酸分子由不同基因所包围。此时，多核苷酸可以受自身启动子控制或受异源启动子控制。在宿主细胞中存在的上述载体或核酸分子可以整合至宿主细胞基因组或可以以某种形式存在于染色体外。就此而言，还应当理解上述核酸分子可以用于通过同源重组恢复或创造突变基因。

[0232] 上述属于乳酸菌组的微生物的变体，优选地所保藏乳杆菌属菌株的变体优选地受到人工突变。根据本发明，术语“突变”意指例如天然引起或通过物理方法或化学化合物/物质/药剂如EMS或ENU引起遗传物质即核酸的永久性修饰。所述修饰包括点突变，如在核酸/基因/染色体内转换或颠换、缺失/插入/添加一个或多个碱基因而修饰核酸/基因/染色体，这尤其可能导致异常的基因表达/转录/翻译或无活性基因产物、组成型活化的/失活的基因产物，引起例如显性失活效应。优选的，突变导致增加的前文所述在测定(a)和/或测定

(A) 中降低肽浓度的能力。因此,已保藏的微生物的突变细胞也是优选的,所述突变细胞在所需基因中含有突变,或者通过本领域技术人员已知的方法在所需基因中诱导了突变。本领域还已知,可以通过任何合适的方法/表型,选择突变的或遗传改造的细菌细胞。在本发明的上下文中,可以根据前文或所附实施例中描述的方法测试变体,所述变体具有增加的前文所述在测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力,和/或具有刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力。然而,术语“变体”还包括属于乳酸菌组的上述微生物,优选的是已保藏的微生物的细胞,所述细胞的基因组(即,细菌基因组)中包含了天然存在的自发突变。“自发突变”是天然发生的突变,即,在没有人的直接的遗传操作或没有暴露于诱变剂的条件下。自发变体的选择可以通过培养菌株并选择所需要的变体完成,例如通过在前述的测定(a)和/或测定(A)中表现出增加的降低肽浓度的能力的变体细菌能力,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的变体细菌能力。(参见例如,Sambrook,Russell“Molecular Cloning,A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbor Laboratory,N.Y. (2001);Ausubel,”Current Protocols in Molecular Biology”,Green Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y. (1989))。例如,此类突变可以在培养期间发生,例如在与DNA复制偶联的正常细胞分裂期间或在上述属于乳酸菌组的微生物的变体传代和/或保存期间。

[0233] 本发明还涉及属于乳酸菌组的上述微生物的衍生物。术语“属于乳酸菌组的上述微生物的衍生物”包括属于乳酸菌组的上述微生物的失活形式、类似物或片段,其中所述失活形式、类似物或片段保留了在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力。

[0234] 根据本发明,术语“失活形式”包括死亡的或失活的本发明的细胞,所述细胞不再能够在平板上形成属于乳杆菌属的微生物的特异性单个集落。所述死亡或失活细胞可以具有完整的或破坏的细胞膜。用于杀死或失活属于乳酸菌组的上述微生物的细胞的方法是本领域已知的。El-Nezami等人,J.Food Prot.61(1998),466-468描述了通过UV辐射失活乳杆菌属物种的方法。优选的,如所附实施例中描述的热失活或冻干本发明的微生物的细胞。如上所述冻干细胞具有这样的优势,所述优势是它们可以方便的储存和处理,同时保留了在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力。此外,当在本领域已知的条件下施用,冻干的细胞可以在合适的液体或固体培养基上再次生长。通过本领域已知的方法进行冻干。优选的,在室温下进行至少2小时,即,在16℃和25℃之间的任何温度。特别优选的是在真空下进行16h。此外,属于乳酸菌组的上述微生物的冻干细胞在4℃的温度下至少4周稳定,仍然能够在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长。

[0235] 可以通过在80℃的温度下孵育属于乳酸菌组的上述微生物的细胞至少10分钟,来实现热失活。可以通过在121℃的温度和存在2bar气压的饱和蒸汽的条件下,高压灭菌所述细胞和/或上清液至少20分钟,来实现热失活。优选的,如本文上述,结合热处理来实现细胞或培养上清液的热失活。

[0236] 作为备选,上述属于乳酸菌组的微生物细胞的热失活通过将所述细胞在-20℃冷冻至少4周、3周、2周、1周、12小时、6小时、2小时或1小时完成。优选至少70%、75%或80%,

更优选85%、90%或95%并且特别优选至少97%、98%、99%并且更特别优选99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%以及最特别优选100%上述属于乳酸菌组的微生物的类似物的细胞是死亡或失活的,然而,它们仍然具有在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力。可以通过本领域已知的方法,测试属于乳酸菌组的上述微生物的失活形式、类似物或片段是否确实是死亡的或失活的,例如通过活力测试。

[0237] 术语“失活形式”或“类似物”还涵盖了上述微生物的裂解物、级分例如膜级分,或提取物,其中所述裂解物、级分或提取物保留了在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力。可以如本文所述,特别是如所附实施例所述测试这些能力。在本发明的微生物的裂解物、级分或提取物的情况下,如上文所述,可以不表现出在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力,然后,技术人员可以通过下文示例的本领域已知的方法,例如进一步纯化所述裂解物、级分或提取物,从而去除抑制降低作用的物质。之后,本领域技术人员可以再次测试所述裂解物、级分或提取物是否能够在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度。

[0238] 根据本发明,术语“裂解物”意指在本发明的微生物细胞的含水培养基中的溶液或悬浮液。然而,本术语不应当以任何限制性方式进行解释。细胞裂解物包含例如大分子如DNA、RNA、蛋白质、肽、糖、脂类等和/或小分子如氨基酸、糖、脂肪酸等,或其级分。此外,该裂解物包含可能是具光滑结构或颗粒结构的细胞片段。优选地,所述裂解物包括细胞壁、细胞膜或其两者,或细胞壁、细胞膜或其两者的部分或片段。用于制备微生物细胞裂解物的方法在本领域内已知,例如,通过使用法氏挤压(French press)、使用玻璃珠或铁珠的细胞磨或细胞的酶裂解法。此外,细胞的裂解涉及本领域内已知用于打开/破坏细胞的多种方法。用于裂解细胞的方法不重要并且可以采用能够完成裂解上述属于乳酸菌组的微生物细胞的任意方法。适宜方法可以由本领域的技术人员选择,例如细胞的打开/破坏可以通过酶、化学或物理方式实现。对酶和酶混合物的非限制性实例是蛋白酶,如蛋白酶K、脂肪酶或糖苷酶。对化学品的非限制性实例是离子载体、洗涤剂如十二烷基硫酸钠、酸或碱;并且物理方法的非限制性实例是高压如法式挤压(French pressing)、渗透压、温度如热或冷。此外也可以利用采用了除蛋白水解酶以外的酶、酸、碱等适宜组合的方法。例如,上述属于乳酸菌组的微生物的细胞可以通过冷冻和融化裂解,更优选地在低于-70℃的温度冷冻并在超过30℃的温度融化,特别地特别优选在低于-75℃的温度冷冻并且在超过35℃的温度融化并且最优选用于冷冻的温度低于-80℃并且用于融化的温度超过37℃。还优选将所述的冷冻/融化重复至少1次、更优选地至少2次、甚至更优选至少3次、特别优选至少4次并且最优选至少5次。

[0239] 因此,本领域技术人员可以通过参考以上一般性说明制备所需的裂解物并根据需要适当调整或改变这些方法。优选地,如所述用于裂解物的含水介质是水、生理盐水或缓冲溶液。细菌细胞裂解物的有利之处在于因为它需要较少的技术设施,故可以容易地产生并低成本地贮存。

[0240] 优选的,术语“提取物”意指上述属于乳酸菌组的微生物的亚细胞成份,例如大分子,如蛋白质、DNA、RNA、肽、糖类、脂类等,和/或小分子,例如氨基酸、糖、脂酸等,或任何其他有机化合物或分子,或所述大分子和/或小分子的组合,或其任何级分,其中所述提取物保留了在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力。可以如本文所述,特别是如所附实施例所述测试这些性质。优选地,所述提取物包含细胞壁或细胞膜或其两者,或细胞壁或细胞膜或其两者的部分或片段。更优选地,术语“提取物”指在无细胞培养基中任意的上述亚细胞成份。

[0241] 在另一优选的实施方案中,可以通过本领域公知的多种打开/损坏细胞的方法裂解细胞获得提取物,其如上所述和/或作为上述属于乳酸菌组的微生物培养物在本领域技术人员公知的任何合适的液体、培养基或缓冲液中的离心操作的上清液、或这类培养物的裂解物或任何其他适合的细胞悬浮液的离心操作的上清液。更优选的,该提取物可以是纯化的裂解物或细胞培养上清液或其任何级分或亚部分,其中所述纯化的裂解物或细胞培养上清液或其任何级分或亚部分保留了在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力。可以如本文所述,特别是如所附实施例所述测试这些性质。分级分离和纯化裂解物或培养上清液或提取物的合适的方法是本领域技术人员公知的并且包括,例如,亲合色谱法、离子交换色谱法、大小排阻色谱法、反相色谱法和使用其他材料柱或分批处理法的色谱法;其他分级方法,例如过滤法,例如超滤、透析、透析和使用离心中的大小排阻色谱法浓缩、密度梯度或分步基质(step matrices)离心;沉淀,例如亲合沉淀、盐溶或盐析(硫酸铵沉淀)、乙醇沉淀或其他合适的蛋白质化学、分子生物、生化、免疫、化学或物理方法。

[0242] 根据本发明,裂解物还是来自如上所提及裂解物的分子级分制备物。这些级分可以通过本领域技术人员已知的方法得到,例如层析,包括例如亲和层析、离子交换层析、大小排阻层析、反相层析和柱子内具有其他层析材料的层析或分批处理法、其他分级方法例如过滤方法如超滤、透析、透析和在离心时附带大小排阻作用的浓缩、在密度梯度或阶梯基质内的离心或者沉淀,例如亲和沉淀、盐析或盐溶(硫酸铵沉淀)、醇沉淀或其他蛋白质化学、分子生物学、生物化学、免疫学、化学或物理方法以分离裂解物的以上成分。在一个优选的实施方案中,优选免疫原性比其他级分更强的那些级分。本领域技术人员还能够选择合适方法并通过参考以上的一般描述和本文实施例中的具体描述测定其免疫原潜力,并根据需要适宜地修改或改变这些方法。

[0243] 因此,术语“失活形式或类似物”还涵盖了本发明的微生物的滤液,其中所述滤液优选的保留了在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力。可以如本文所述,特别是如所附实施例所述测试这些性质。如上文所述,如果属于乳酸菌组的上述微生物的滤液,可能不具有在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长的能力,那么技术人员可以通过下文示例的本领域已知的方法,例如进一步纯化所述滤液,从而去除抑制降低作用和/或生长刺激作用的物质。之后,本领域技术人员可以再次测试所述滤液是否能够在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌

和/或牙龈红棕色单胞菌的生长。

[0244] 术语“滤液”还意指本文如上所述的本发明微生物的无细胞溶液或悬浮液,其作为对在本领域技术人员公知的任何合适的液体、培养基或缓冲液中上述属于乳酸菌组的微生物培养物离心操作上清液而获得。然而,不应该以任何限制的方式解释该术语。滤液包含,例如大分子,如DNA、RNA、蛋白质、肽、糖类、脂类等,和/或小分子,例如氨基酸、糖、脂酸等,或其级分。用于制备微生物的滤液的方法是本领域公知的。此外,“过滤”涉及本领域公知的多种方法。具体的方法并不重要,并且可以使用能够实现本文如上所述的本发明的微生物的细胞过滤的任何方法。术语滤液还包括培养上清液,例如通过离心沉淀细胞并去除获得的上清液而得到的。

[0245] 在特别优选的实施方案中,滤液,最优选的培养上清液,经过进一步处理,特别是如前述的热处理或冻干。

[0246] 本发明的微生物的“片段”涵盖了属于乳酸菌组的上述微生物细胞的任何部分。优选地,所述片段是通过膜制备物得到的膜级分。属于乳杆菌属的微生物的膜制备物可以通过本领域已知方法得到,例如,通过采用在Rollan等,Int.J.食品Microbiol.70(2001),303-307,Matsuguchi等,Clin.Diagn.Lab.Immunol.10(2003),259-266或Stentz等,Appl.Environ.Microbiol.66(2000),4272-4278或Varmanen等,J.Bacteriology 182(2000),146-154中描述的方法。备选地,还考虑了完整细胞制备物。优选的,本文描述的属于乳酸菌组的上述微生物的衍生物或片段保留了在前述的测定(a)和/或测定(A)中降低肽浓度的能力,和/或刺激唾液链球菌的生长,但不刺激变形链球菌和/或牙龈红棕色单胞菌的生长能力。

[0247] 本发明还涉及包含上述本发明的微生物、其失活形式、衍生物或变体或类似物或片段的组合物。组合物优选的是化妆品组合物或药物组合物,例如用于治疗和/或预防口腔恶臭和/或口臭的,或者饲料或食品组合物。

[0248] 在优选的实施方案中,所述组合物包含如上述的微生物,所述微生物的量是在固体形式的组合物中, 10^2 至 10^{12} 个细胞/mg,优选的 10^3 至 10^8 个细胞/mg。在液体形式的组合物的情况下,微生物的量是在 10^2 至 10^{13} 个细胞/ml。然而,对于特定组合物,如本文所述微生物的量可以不同。

[0249] 化妆品组合物可以包括化妆品或经口可接受的载体或赋形剂。药物组合物可以包括药物或经口可接受的载体或赋形剂。饲料或食品组合物可以包括经口可接受的载体或赋形剂。

[0250] 本发明还涉及本发明的微生物、其失活形式、衍生物或变体或类似物或片段的用途,用于制备包含上述本发明的微生物、其失活形式、衍生物或变体或类似物或片段的组合物,特别是化妆品组合物、饲料或食品组合物,或用于预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭的药物组合物。

[0251] 可以通过这样的方法生产此类组合物,所述方法包括用化妆品、经口或可药用的载体或赋形剂配制本发明的微生物的步骤。

[0252] 如根据本发明使用的,术语“组合物”涉及包含至少一种如上述的微生物、变体或衍生物,或所述微生物的失活形式或类似物或片段的组合物。认为描述在下文中的根据本发明使用的组合物包括任意组合的上述成分。任选的,它可以包括至少一种适合预防和/或

治疗口腔恶臭和/或口臭的其他成分。因此,它可以任选的包括任意组合的后述其他成分。术语“适合预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭的成分”涵盖了本领域已知的降低口腔恶臭的化合物或组合物和/或其组合。实例是用于治疗舌头的金属盐如氯化锌、或消毒剂如醇或氯己定。另一个实例是帮助维持唾液的pH处于生理正常水平的化合物。这可以是具有pH提高或pH缓冲效果的物质(例如,碳酸氢盐、尿素、磷酸盐、蛋白质和/或盐)。已知与龋齿和粘膜感染相关的微生物物种偏爱酸性pH;与牙周病发展相关的微生物物种偏爱高于正常值的pH;而与良好的口腔健康相关的微生物物种偏爱中性pH。其他实例是如US200707137、US2006018843或W02007/077210中公开的益生菌(例如,乳杆菌属和链球菌属),或如US2006045870所述,属于魏斯氏菌属(*Weissella*)的乳酸菌,所述乳酸菌通过与VSC生产细菌相互作用以及在好氧和厌氧条件下产生过氧化氢,从而抑制VSC生产细菌的生长。最后1,在该上下文(US2006171901)中,可以提及BLIS(细菌素样抑制性物质)生产性唾液链球菌菌株及其提取物

[0253] 应当指出用于本发明的组合物可以任选地包含一种或多种适用于预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭的任选前述成分。因此,该组合物可以含有至少二、三、四、五等即“n”种任选成分,其中“n”不受限制地是大于二的整数。所述的任选成分可以在任何可能的组合中组合。

[0254] 组合物可以为固体、液体或气体形式,并且可以尤其是粉剂、片剂、膜制备物、溶液剂、气雾剂、颗粒剂、丸剂、混悬剂、乳剂、胶囊剂、糖浆剂、液体制剂、酞剂、提取物、酞剂或流体提取物的形式或处于特别适合经口施用的形式。

[0255] 可以使用水、常见糖如蔗糖、山梨醇和果糖、二元醇如聚乙二醇和丙二醇、油如芝麻油、橄榄油和大豆油、抗菌剂如对羟基苯甲酸酯、防腐剂如对羟基苯甲酸酯衍生物例如对羟基苯甲酸甲酯和苯甲酸钠以及其他材料如香料,例如草莓香料或欧薄荷制备适合经口施用的液体制剂,例如糖浆剂。

[0256] 此外可以使用常见的糖如蔗糖、葡萄糖、甘露醇和山梨醇、淀粉如马铃薯、小麦和玉米淀粉、无机材料如碳酸钙、硫酸钙、碳酸氢钠和氯化钠、植物粉末如结晶纤维素、甘草粉和龙胆粉、赋形剂如pinedex、崩解剂如淀粉、琼脂、明胶粉末、结晶纤维素、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、碳酸钙、碳酸氢钠和海藻酸钠、润滑剂如硬脂酸镁、滑石粉、氢化植物油、聚乙二醇和硅油、粘合剂如聚乙烯醇、羟丙基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羧甲基纤维素、明胶和淀粉胶流体(starch glue fluid)、表面活性剂如脂肪酸酯和增塑剂如甘油产生适合经口施用的制剂例如片剂、粉剂和颗粒剂。膜制备物可以通过本领域已知方法制备。用于制备膜的实例在本文实施例19中给出。

[0257] 在常规经口施用,上述微生物或类似物或片段的剂量可以(以干重计算)如本文上述相对于细胞数目或相对于质量是例如每日一次或每日数次对每个受试者1 μ g至50g、1 μ g至10g、1 μ g至5mg、1 μ g至1mg或任何其他重量。在向非人动物施用时,剂量根据动物年龄和种类及其症状特点或严重性变化。不做特定限制,用于动物的剂量是每日一次或每日数次以每1公斤体重0.1mg至10g、优选每1公斤体重1mg至1g施用。然而,这些剂量和剂量数根据个体状况改变。

[0258] 优选的,根据本发明的组合物是还包含化妆品可接受的载体或赋形剂的化妆品组合物。更优选的,所述组合物是洁牙剂(dentifrice)、口香糖、锭剂、漱口剂、口腔清洁剂、牙

线或洁牙带

[0259] 根据本发明的化妆品组合物包括如上文关于本发明的组合物描述的微生物、其失活形式、变体、衍生物、类似物或片段,以及另外的化妆品或经口可接受的载体。优选的,如关于本发明的组合物描述的,微生物、其失活形式、变体、衍生物、类似物或片段是上文描述的微生物、其失活形式、变体、衍生物、类似物或片段。优选的,根据本发明的化妆品组合物是用于经口应用。因此,它可以是牙膏(toothpaste)、洁牙剂(dentifrice)、牙粉(tooth powder)、局部口腔凝胶、口腔清洁剂、假牙产品、口腔喷雾、锭剂、口腔用片剂、口香糖、牙线或洁牙带的形式。

[0260] 术语“经口或化妆品可接受的载体”如本文中所示意指可以用于将本组合物以安全和有效的方式施用至口腔的合适载体。此类载体可以包括如下材料,如氟化物离子源、额外的防牙垢剂、缓冲剂、其他研磨材料、过氧化物源、碱金属碳酸氢盐、增稠材料、湿润剂、水、表面活性剂、二氧化钛、香料系统、甜味剂、木糖醇、着色剂及其混合物。术语“安全且有效的量”如本文中所示意指足以清洁和减少污点/蚀斑/龈炎/牙石而不损坏口腔中组织和结构的量。

[0261] 本文中所述的本组合物的pH范围优选地是大约3.0至大约9.0,优选的pH是大约5.5至大约9.0并且最优选的pH是从7.0至大约8.5或9.0。

[0262] 化妆品组合物是这样的产品,它在日常应用过程中为了特定治疗剂的全身施用目的不用于吞咽,但是为了口腔活性在口腔中滞留足够的时间以充分接触所有的牙齿表面/或口腔组织。口腔用组合物可以是单一相的口腔用组合物或可以是两种或多种口腔用组合物的组合。

[0263] 术语“洁牙剂”如本文中所示指膏、凝胶或液体制剂,除非另外说明。洁牙剂组合物可以处于任何所需要的形式,如深度带条的(deep striped)、表面带条的(Surface striped)、多层的、膏体周围包围凝胶或其任意组合。洁牙剂组合物可以包含在分散系统中物理分隔的区室内并且逐步分发。洁牙剂组合物例如在EP-B1 0 617 608中描述。

[0264] 优选的洁牙剂组合物描述于实施例13至16。除上述成分外,本发明的洁牙剂组合物可以含有多种任选的洁牙剂成分,其中某些描述如下。任选的成分包括例如,但不限于胶粘剂、发泡剂、增香剂、甜味剂、其他抗蚀斑剂、额外磨料和着色剂。这些任选的成分和其他任选的成分也例如在US 5,004,597;US 4,885,155;US 3,959,458和US 3,937,807中描述。

[0265] 例如,牙膏可以包含表面活性剂、螯合剂、氟化物源、牙齿增白活性物质和牙齿颜色调节材料、增稠剂、湿润剂、增香剂及甜味剂、碱金属碳酸氢盐、各种载体和/或其他活性物质。

[0266] 用于本发明的优选的任选物质中的一种物质是表面活性剂,优选地是选自肌氨酸酯表面活性剂、羟乙基磺酸盐(isethionate)表面活性剂或牛磺酸盐表面活性剂中的一种表面活性剂。这些表面活性剂的碱金属盐或铵盐优选地用于本文中。本文中最优选如下表面活性剂的钠盐和钾盐:月桂酰基肌氨酸盐、肉豆蔻酰基肌氨酸盐、棕榈酰基肌氨酸盐、硬脂酰基肌氨酸盐和油酰基肌氨酸盐。

[0267] 另一种优选的任选物质是螯合剂,如酒石酸及其可药用的盐、柠檬酸和碱金属柠檬酸盐及其混合物。螯合剂能够复合细菌细胞壁中发现的钙。螯合剂还可以通过将钙从有助于维持此生物物质完整的钙桥中移去而破坏蚀斑。

[0268] 通常使洁牙剂和其他口腔用组合物中具有额外的水溶性氟化物化合物,它的量足以于25℃在组合物中和/或在使用时产生大约0.0025%至大约5.0%重量、优选地大约0.005%至大约2.0%重量的氟化物浓度以提供抗龋效力。种类多样的产生氟化物离子的材料可以用于本组合物中作为可溶性氟化物的来源。产生氟化物离子的适宜材料实例在US 3,535,421和US3,678,154中找到。代表性氟化物离子源包括氟化亚锡、氟化钠、氟化钾、单氟磷酸钠及众多氟化物。特别优选氟化亚锡和氟化钠及其混合物。

[0269] 本发明的口腔护理组合物还可以包含牙齿增白活性物,所述牙齿增白活性物包含漂白剂或氧化剂,如过氧化物、过硼酸盐、过碳酸盐、过氧酸、过硫酸盐、金属亚氯酸盐及其组合。合适的过氧化物化合物包括过氧化氢、过氧化物脲、过氧化钙及其混合物。优选的过碳酸盐是过碳酸钠。其他合适的增白剂包括钾、铵、钠和锂的过硫酸盐和过硼酸盐单水合物和四水合物以及焦磷酸钠过氧水合物。合适的金属亚氯酸盐包括亚氯酸钙、亚氯酸钡、亚氯酸镁、亚氯酸锂、亚氯酸钠和亚氯酸钾。优选的亚氯酸盐是亚氯酸钠。其他的增白活性物可以是次氯酸盐和二氧化氯。

[0270] 除了漂白剂作为牙齿增白剂外,牙齿颜色修饰物质可以在用于本发明的口腔护理活性物中考虑。这些物质适于修饰牙齿的颜色以满足消费者。这些物质包含了在施加至牙齿表面后在光的吸收或反射方面修饰牙齿表面的颗粒。当含有此类颗粒的膜施加至牙齿表面上时,此类颗粒引起外观改善。

[0271] 在制备牙膏或凝胶时,需要添加某些增稠材料以提供组合物所需要的稠度、提供使用时所需要的活性物释放特征、提供货架稳定性并提供组合物的稳定性等。优选的增稠剂是羧乙烯聚合物、角叉菜聚糖、羟乙基纤维素、锂皂石以及纤维素醚的水溶性盐如羧甲基纤维素钠和羧甲基羟乙基纤维素钠。也可以是使用天然树胶,如刺梧桐树胶、黄原胶、阿拉伯树胶和黄蓍树胶。还可以使用胶体性镁铝硅酸盐或精细粉碎的二氧化硅作为增稠剂的部分以进一步改善质地。

[0272] 本发明组合物中局部用于口腔的载体的另一种任选成分是湿润剂。湿润剂的作用是防止牙膏组合物在接触于空气时变硬、给予组合物湿润口腔的感觉并且对于特定湿润剂而言赋予牙膏组合物受欢迎的甜美风味。在纯的湿润剂基础上,湿润剂通常占本文中组合物重量的大约0%至大约70%、优选地大约5%至大约25%。适用于主题发明组合物中的湿润剂包括可食的多元醇如甘油、山梨醇、木糖醇、丁二醇、聚乙二醇和丙二醇,尤其是山梨醇和甘油。

[0273] 还可以将增香剂和甜味剂添加至组合物。合适的增香剂包括冬青油、薄荷油、留兰香油、丁香花蕾油、薄荷脑、茴香脑、水杨酸甲酯、桉树脑、肉桂(cassia)、乙酸1-薄荷醇酯、鼠尾草、丁香酚、欧芹油、oxanone、 α 紫罗兰酮、马郁兰、柠檬、橙、丙烯基乙基愈创木酚、肉桂(cinnamon)、香草醛、麝香草酚、芳樟醇、称作CGA的肉桂醛乙酸甘油酯及其混合物。增香剂通常以占组合物重量大约0.001%至大约5%的水平用于组合物。

[0274] 可以使用的甜味剂包括蔗糖、葡萄糖、糖精、右旋糖、左旋糖、如上文中所述的乳糖、甘露醇、山梨醇、果糖、麦芽糖、木糖醇、糖精盐、竹芋蛋白、阿斯帕坦、D-色氨酸、二氢查耳酮、丁磺氨和环拉酸盐,尤其是环拉酸钠和糖精钠,以及其混合物。组合物优选地包含大约0.1%至大约10%的这些物质,优选地占组合物重量的大约0.1%至大约1%。

[0275] 本发明的组合物还可以包括碱金属碳酸氢盐。碱金属碳酸氢盐可溶于水并且倾向

于在含水系统中释放二氧化碳,除非加以稳定。碳酸氢钠又称作苏打粉,是优选的碱金属碳酸氢盐。本组合物可以含有大约0.5%至大约30%、优选地大约0.5%至大约15%、并且最优选地大约0.5%至大约5%的碱金属碳酸氢盐。

[0276] 用于制备商业合适的口腔用组合物中的水应当优选地具有低离子浓度并且无有机杂质。水通常包含本文中含水的牙膏组合物重量的大约10%至大约50%并且优选地是大约20%至大约40%。水的这些量包括额外添加的随同其他材料如山梨醇引入的游离水。还可以将二氧化钛添加至本组合物。二氧化钛是白色粉末,它增加了组合物的不透明性。二氧化钛通常占洁牙剂组合物重量的大约0.25%至大约5%。

[0277] 本发明组合物的pH优选地通过使用缓冲剂调节。如本文中所用的缓冲剂指可以用于调节组合物pH至范围大约4.5至大约9.5。缓冲剂包括磷酸二氢钠、磷酸钠、氢氧化钠、碳酸钠、焦磷酸钠、柠檬酸和柠檬酸钠。缓冲剂可以以本组合物重量大约0.5%至大约10%的水平施用。洁牙剂组合物的pH可以从3:1的含水洁牙剂浆例如3份水对1份牙膏进行测量。

[0278] 可用于本组合物中的其他任选物质包括选自烷基和烷氧基-聚二甲基硅氧烷共聚醇如C₁₂至C₂₀烷基聚二甲基硅氧烷共聚醇的聚二甲基硅氧烷共聚醇及其混合物。高度优选的是商品名称作Abi1 EM90的为十六烷基聚二甲基硅氧烷共聚醇。聚二甲基硅氧烷共聚醇通常占大约0.01%至大约25%、优选地大约0.1%至大约5%、更优选地大约0.5%至大约1.5%的重量水平。聚二甲基硅氧烷共聚醇有助于提供良好的牙齿感觉益处。其他有用载体包括双相洁牙剂制剂,如在US 5,213,790;US 5,145,666;US5,281,410;US 4,849,213和US 4,528,180中公开的那些载体。

[0279] 化妆品组合物还可以包括其他活性剂,如抗菌剂。此类物质包括非水溶性的非阳离子抗菌剂,如卤化的二苯醚、酚类化合物包括酚及其同系物、单烷基和多烷基的和芳香的卤代酚、间苯二酚及其衍生物、双酚化合物和卤化N-水杨酰替苯胺、苯甲酸酯和卤化N-碳酰苯胺。水溶性抗菌剂包括在其他水溶性抗菌剂中的季铵盐和bis-biquanide盐。三氯生单磷酸是额外的水溶性抗菌剂。季铵剂包括这样的季铵剂,在其中四价氮上的一个或两个取代基具有大约8至大约20个,通常大约10至大约18个碳原子的碳链长度(一般是烷基),与此同时剩余取代基(一般是烷基或苄基)具有数量较少的碳原子,例如大约1至大约7个碳原子,一般是甲基或乙基。溴化十二烷基三甲铵、氯化十四烷基吡啶鎓、度米芬溴、氯化N-十四烷基-4-乙基吡啶鎓、溴化十二烷基二甲基(2-苯氧乙基)铵、氯化苄二甲基硬脂基铵、氯化十六烷基吡啶鎓、季铵化5-氨基-1,3-双(2-乙基-己基)-5-甲基六氢嘧啶、苯扎氯铵、苄索氯铵和甲基苄索氯铵是示例性的常用季铵抗菌剂。其他化合物是如在US 4,206,215中公开的双[4-(R-氨基)-1-吡啶鎓]烷。还可以包括其他抗菌剂如双氨基乙酸铜、氨基乙酸铜、柠檬酸锌和乳酸锌。酶是可用于本组合物中的另外类型的活性物。有用的酶包括属于蛋白酶、裂解酶、蚀斑基质抑制剂和氧化酶组别的酶:蛋白酶包括木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、无花果蛋白酶、菠萝蛋白酶;细胞壁裂解酶包括溶菌酶;蚀斑基质抑制剂包括葡聚糖酶、齿斑葡聚糖酶;并且氧化酶包括葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶、半乳糖氧化酶、尿酸氧化酶、过氧化物酶包括辣根过氧化物酶、髓过氧化物酶、乳过氧化物酶、氯过氧化物酶。除抗菌活性外,氧化酶还具有增白/清洁活性。此类物质在US2,946,725并在US4,051,234中公开。抗菌剂包括氯己定、三氯生、三氯生单磷酸和香料油如麝香草酚。三氯生和此类型的其他物质在US 015,466和US 4,894,220中公开。这些提供抗蚀斑益处的物质可以占洁牙剂组合物重量的

大约0.01%至大约5.0%。

[0280] 术语“口香糖”如本文中定义意指适合咀嚼并包含本领域技术人员已知的任何合适量(优选为2%或更高的组合物重量)的高弹体的糖食组合物。合适锭剂和口香糖成分例如在US 4,083,955;US 6,770,264或US6,270,781中公开。优选的锭剂是在实施例11和12中描述的那些锭剂。优选的口香糖组合物在实施例17描述。

[0281] 根据本发明的组合物优选地包含一种高弹体或数种不同高弹体的混合物。高弹体材料通常在本领域已知,不过示例性实例包括丁苯橡胶(SBR);合成树胶;聚异丁烯和异丁烯-异戊二烯共聚物;天然树胶;糖胶树胶;天然橡胶;节路顿胶;巴拉塔树胶;杜仲胶;莱开欧胶(lechi caspi);sorva及其混合物。

[0282] 本发明的组合物优选地包含大约2%至大约30%、更优选地大约5%至大约25%重量的高弹体。这些含量由口香糖所需要的最终质感确定,因为当高弹体的总含量低于大约2%时,基础组合物缺乏弹性、咀嚼质感和粘性,而高于大约30%时,制品发硬,有弹性并且维持为硬的口香糖。高弹体溶剂也优选地存在于本发明的组合物内,因为它们辅助软化高弹体成分。用于本文的高弹体溶剂优选的实例包括部分氢化的木松香的季戊四醇酯、木松香的季戊四醇酯、部分二聚化化的松香的甘油酯、聚合松香的甘油酯、浮油松香、木松香或松香的甘油酯、部分氢化的松香的甘油酯、部分氢化的松香的甲基酯及其混合物。本发明的组合物优选地包含大约2%至大约50%、更优选地大约10%至大约35%重量的高弹体溶剂。

[0283] 可以制备根据本发明的锭剂,例如,通过本领域认可的用于形成压缩片剂的技术,其中将二糖分散在可压缩的固体载体上,任选地与任何适宜的压片助剂如润滑剂(例如硬脂酸镁)结合并被压缩为片剂。用于压片制剂的固体载体成分可以是可溶于唾液的固体如冷水可溶性淀粉或单糖,以至当锭剂含在嘴里时,它在嘴内迅速溶解以将所含的二糖酸释放于唾液溶液内,用于接触口/喉粘膜并且由其吸收。如上所述制剂的pH范围可以是大约4至大约8.5。

[0284] 还可以利用其他本领域认可的固体单一剂量制剂技术制备根据本发明的锭剂。

[0285] 根据本发明的漱口剂或口腔清洁剂可以优选地如下所示:

[0286]	A薄荷油	1.2份
[0287]	山金车(Arnicae)酊	3.0份
[0288]	没药(Myrrhae)酊	3.0份
[0289]	吐温	5.0份
[0290]	B 醇90%	50.0份
[0291]	C 苯甲酸钠	0.2份
[0292]	甜味剂(例如阿斯帕坦)	0.02份
[0293]	Agua destilata添加至100,	

[0294] 将A充分混合,将B在搅拌下加入并且随后加入C。得到的清亮液体在制备后48小时内过滤。另一种优选的漱口剂在实施例18中描述。

[0295] 无论剂型如何,是液体或固体,在本发明的一个优选实施方案中该剂型在患者嘴里停留一段时间以促进微生物或上述属于乳酸菌组的微生物的类似物或片段接触患者口腔。

[0296] 本文所用术语“牙线”和“洁牙带”意指移去和去除堆积在牙间和龈下表面的可分

解的食物材料的物质,和移去和去除堆积在口腔中的细菌、蚀斑和/或结石的物质。牙线或洁牙带除了含有本文上述的本发明微生物外,还可含有清洁剂、研磨剂、牙石控制组分、增白剂、表面活性剂和/或诸如氟化物、抗微生物剂、化疗剂或抗生素的活性组分。其他的物质是抗蚀斑剂、增香剂和着色剂。牙线或洁牙带可以是本领域技术人员已知的任何合适的形式,例如以PTFE (Teflon) 牙线的形式,其例如在US3,664,915、US 3,953,566、US 3,962,153、US 4,096,227、US 4,187,390、US4,256,806、US 4,385,093、US 4,478,665、US 4,776,358、US 5,033,488、US5,209,251、US 5,220,932、US 5,518,012、US 5,718,251、US 5,765,576或US 5,911,228中所述;以单丝牙间器械的形式,其例如在US 3,800,812、US 4,974,615、US 5,760,117、US 5,433,226、US 5,479,952、US 5,503,842、US 5,755,243、US 5,884,639、US 6,003,525或US 6,027,592中所述;或以生物相容性带的形式。优选地,牙线或洁牙带可以是弹性体包被的单丝的形式,其例如在US 20050226820中所述,或是基于定向热塑的洁牙带的形式,其例如在US 20020144704中所述。

[0297] 本文上述的化妆品组合物可用于人类口腔施用的范畴,和兽医口腔施用的范畴,优选用于非人哺乳动物,更优选用于宠物。如果化妆品组合物用于兽医口腔施用的范畴,该组合物可包含本领域技术人员已知的适合此类施用的其他组分。

[0298] 本发明还涉及本发明的微生物或其失活形式用于制备药物组合物的用途,所述药物组合物用于治疗/和/或预防口腔恶臭和/或口臭。优选的,药物组合物还包含可药用的载体或赋形剂。

[0299] 药物组合物包含治疗有效量的本发明的微生物,并可配制成多种形式,例如固体、液体、粉末、水溶液、冻干形式。

[0300] 药物组合物可以与可药用的载体一起向患者施用,如本文所述。在特定的实施方案中,术语“可药用的”意指受管理机构或其他普遍承认的药典同意用于动物的,更特别的用于人的。

[0301] 术语“载体(carrier)”指随同治疗剂一起施用的稀释剂、辅助剂、赋形剂或运载体(vehicle)。此种载体可药用。即在所用的剂量和浓度上对受者无毒。它优选地是等渗的、低渗的或微弱高渗的并且具有如由蔗糖溶液所提供的相对低的离子强度。此类药用载体可以是无菌液体如水和油,包括石油、动物油、植物油或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。盐溶液和右旋糖和甘油的水溶液可以用作液体载体,尤其用于可注射的溶液。合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻、面粉、碳酸钙、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石粉、钠离子、脱脂乳粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。赋形剂可以如上文文中所述含有乳糖,最优选地它不含乳糖。根据需要,组合物还可以含有少量湿润剂或乳化剂,或pH缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、缓释剂等形式。经口施用制剂可以包括标准载体如药用级的甘露醇、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适药用载体的实施例在E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中描述。还可以使用脱脂乳、脱脂乳粉、不含乳或不含乳糖的产品。通常将脱脂乳粉在磷酸盐缓冲盐水(PBS)内混悬,高压灭菌或过滤以除去蛋白质杂质和活着的污染物,随后冷冻干燥、加热干燥、真空干燥或冻干。可以充当药用载体的物质的某些其他实例是糖,如葡萄糖和蔗糖;淀粉如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和纤维素乙酸酯;粉化的黄耆糖;麦芽;明胶;滑石;硬脂酸;硬脂酸镁;

硫酸钙;碳酸钙;植物油如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可属植物的油;多元醇如丙二醇、甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;琼脂;海藻酸;无热原的水;等渗盐水;蔓越橘(Cranberry)提取物和磷酸盐缓冲溶液;脱脂乳粉;以及药物制剂中所用的其他无毒的可兼容物质例如维生素C、雌激素和紫松果菊属(Echinacea)植物。湿润剂和润滑剂如十二烷基硫酸钠以及着色剂、增香剂、润滑剂、赋形剂、压片剂、稳定剂、抗氧化剂和防腐剂也可以存在。

[0302] 多种在本领域内众所周知的适合经口施用的载体和/或赋形剂可以为本发明目的使用。根据需要,组合物还可以含有多种已知的添加剂如防腐剂、硬化剂、润滑剂、乳化剂、稳定剂、香料等。此类组合物含有与合适载体结合的治疗有效量的前述化合物,这些化合物优选地为纯化的形式,以便提供正确施用于患者的形式。制剂应当适应施用的模式。

[0303] 通常,将成分以单位剂量形式例如作为干燥的冻干粉或无水浓缩物在标明活性制剂量的气密封接容器如安瓿或sachette内单独提供或混合在一起提供。在组合物通过输注施用,组合物可以用含有药用级的无菌水或盐水的输注瓶递送。

[0304] 本发明的药物组合物可以配制为中性形式或盐形式。可药用盐包括与阴离子所形成的可药用盐如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些可药用盐,以及与阳离子所形成的可药用盐如衍生自氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些可药用盐。

[0305] 可以任选地采用体外分析法帮助确定最适的剂量范围。在制剂中待使用的精确剂量还取决于施用途径和疾病或病症的严重性,并且应当根据执业医师的判断和每一患者的状况确定。可以从衍生自体外或动物模型测试系统的剂量反应曲线外推出有效剂量。优选地,药物组合物直接施用或与辅助剂组合施用。辅助剂可以选自氯喹、质子极化性化合物如丙二醇、聚乙二醇、甘油、EtOH、1-甲基-L-2-吡咯烷酮或其衍生物或者非质子极化性化合物如二甲亚砜(DMSO)、二乙基亚砜、二正丙基亚砜、二甲基砜、环丁砜、二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺、四甲基脒、乙腈或它们的衍生物。将这些化合物在各自pH界限的条件下添加。可以将用于本发明的组合物施用于脊椎动物。“脊椎动物”如本文中所述将具有如本领域技术人员通常所理解的相同意思。特别地,“脊椎动物”包含哺乳动物,并且更特别地是人。

[0306] 术语“施用”意指施用治疗有效剂量的前述组合物。通过“治疗有效量”意指这样的剂量,其产生施用该剂量时意图产生的效果,这种效果优选地是防龋。确切剂量将取决于治疗目的,并且由本领域技术人员使用已知技术确定。如本领域内已知并且如上所述,可能需要针对全身递送或局部性递送、年龄、体重、一般健康、性别、饮食、施用时间、药物相互作用和疾病严重性进行调整,并且由本领域技术人员用常规实验确定。

[0307] 本方法可应用于人的治疗和兽医用途。本文中所述的具有所需要的治疗活性的化合物可以如本文中所述在生理上可接受载体内施用于患者。化合物可以如下所述以多种方式配制,其取决于导入方式。制剂中的治疗活性化合物的浓度可以在大约0.1-100wt%变化。物质可以单独施用或于其他治疗组合施用。

[0308] 可以以如下所述的多种方式完成药物组合物的施用,包括但不限于经口、皮下、静脉内、动脉内、节内、脊髓内、鞘内、心室内、鼻内、支气管内、经皮的、结节内、直肠内、腹膜内、肌内、肺内、阴道、直肠或眼内。

[0309] 施用优选经过口或颊。住院医师和临床因素将决定剂量方案。医学领域内众所周

知用于任一患者的剂量取决于多种因素,包括患者体形大小、体表面积、年龄、待施用的特定化合物、性别、施用的时间和途径、一般健康和同时施用的其他药物。一般剂量范围可以是例如0.001至1000 μ g;然而,低于和高于这种示例性范围的剂量得到预期,尤其当考虑前述因素时。

[0310] 剂量优选地每周给予一次,然而,随着治疗进行,剂量可以在更长的时间间隔上给予并且根据需要可以在更短时间间隔例如每日给予。在优选的情况下,免疫反应使用本文中所述方法和本领域技术人员所知的其他方法监测并且剂量得到优化,例如在时间、数量和/或组合方面。可以通过定期评估监测进展。本发明的药物组合物可以局部施用或全身施用。还可以预计药物组合物在共治疗方法中使用,即与其他药剂或药物共同施用,例如用于预防、治疗或改善龋的其它药物,如本文所述。

[0311] 在另一个优选的实施方案中,本发明涉及本发明的微生物用于制备用于治疗 and/或预防口腔恶臭和/或口臭的组合物的用途,其中组合物是食品或饲料;还涉及包含本发明的微生物、其失活形式、变体、衍生物、类似物或片段的食品或饲料。优选的以食品或饲料形式的组合物是包含如本文所述的微生物、其失活形式、变体、衍生物、类似物或片段的食品或饲料组合物,其还包含可口腔用的载体或赋形剂。

[0312] “食品”或“饲料”包括用于哺乳动物例如人或动物,如本文描述的宠物的任何可食用的、适口的和/或可饮用的材料。食品和饲料描述在本文中的其他地方。“可口腔用的载体”描述在前文中,优选的是无毒的且食品和/或饲料级别的。该术语还涵盖了涉及根据本发明使用的药物组合物中提及的载体。

[0313] 根据本发明,术语“食品”包含所有可食用和可饮用的食品和饮料。因此,微生物、其失活形式、衍生物、类似物或片段可以包含在食品或饮料中。这些食品或饮料例如是口香糖、喷雾剂(spray)、饮料、糖果、婴儿配方食品、冰淇淋、冷冻食品、甜色拉酱、奶制品、乳酪、凝乳(quark)、无乳糖酸奶、酸化乳、coffee cream或搅打稀奶油等。

[0314] 以基于乳的产品也在本发明的预期范围内。然而应当将乳理解为动物来源如奶牛、山羊、绵羊、水牛、斑马、马、猴或骆驼的乳。乳可以是天然状态、还原乳、脱脂乳或这样的乳,其补充了为细菌生长所需或为后续的发醇乳加工所需的物质,例如脂肪、酵母提取物的蛋白质、胨和/或表面活性剂。术语“乳”还适用于通常称作的植物乳,即已经处理的植物材料的提取物,或豆科植物(大豆、鹰嘴豆、小扁豆等)或油籽(油菜籽、大豆、芝麻、棉籽等等)的提取物,这些提取物含有在溶液或胶体性悬浮液中的蛋白质,其通过化学作用、酸性发酵和/或加热可凝结。最后,词语“乳”还指动物乳和植物乳的混合物。

[0315] 当本发明的微生物、其失活形式、或衍生物、或类似物或片段添加到酸奶和具有相似内容物的物质时,则通常充分添加本发明的微生物为约 10^5 - 10^7 个细胞/ml的浓度。

[0316] 此类食品、饮料或饲料可以通过用于产生食品和饮料或饲料的的常用方法产生,包括将活性成分添加至食品、饮料或饲料的原材料或烹制的材料内。本发明食品、饮料或饲料可以用如通常用于食品、饮料或饲料的相同方式成型和制粒。成型和制粒的方法包括造粒法如流体层造粒法、搅拌造粒法、挤出造粒法、滚动造粒法、气流造粒法、压模造粒法、破碎造粒法、喷雾造粒法和喷射造粒法,包衣方法如锅包衣法(pan coating)、流体层包衣法和干法包衣、吹干法(puff dry)、过量蒸汽(excess steam)法、发泡垫(foam mat)法、膨胀法如微波孵育法以及用挤压造粒机和挤压机的挤压方法。

[0317] 本发明的食品、饮料或饲料包括任何食品、饮料或饲料，其包含本发明的微生物、其失活形式、衍生物、或类似物或片段作为活性成分的食品、饮料或饲料。食品、饮料或饲料中的活性成分不特别地限于任何浓度只要所得的食品、饮料或饲料可以发挥其减少口腔恶臭的活性。活性成分的浓度优选地是占0.001至100%重量的、更优选是0.01至100%重量的并且最优选是0.1至100%重量的包含此类活性成分或具有本文中所述那些细胞数目的食品、饮料或饲料。

[0318] 添加活性成分的特定食品或饮料包括例如果汁、提神饮料、汤、茶、酸奶饮料、乳制品如发酵乳、冰淇淋、冰、黄油、乳酪、加工奶和脱脂乳、肉制品如火腿、腊肠和汉堡牛排、鱼肉饼制品、蛋制品如调味炸蛋卷和蛋凝乳、糖果糕点如饼干、果冻、零食和口香糖、面包、面条、腌菜、烟熏制品、干鱼和调味品。食品或饮料的形式包括例如粉末食品、层样食品、瓶装食品、罐头食品、蒸煮食品、胶囊食品、食品片和流体食品。

[0319] 将由婴儿摄入的根据本发明的食品或饮料优选地是用于婴儿的营养组合物。此类用于婴儿的营养组合物包括为婴儿制备的改性乳、蛋白质分解乳、特定营养改性乳或婴儿食品是为幼儿制备的食品。用于婴儿营养组合物的形式包括但不特别限于已脱脂和粉碎的奶粉以及婴儿食品，并且还包括适合婴儿摄入的日常食品如冰淇淋、发酵乳和果冻。

[0320] 根据本发明用于婴儿的营养组合物主要由蛋白质、脂类、糖、微生物和/或矿物质组成。在营养组合物中，活性成分与这些成分混合。

[0321] 蛋白质包括乳蛋白质，如脱脂乳、酪蛋白、乳清干酪、乳清蛋白质浓缩物和乳清蛋白质分离物及它们的级分如 α 酪蛋白、 β 酪蛋白、 α 乳白蛋白和 β 乳球蛋白。此外，卵蛋白质如蛋黄蛋白质、蛋清蛋白质和卵清蛋白，或大豆蛋白质如大豆脱脂蛋白质、大豆分离蛋白质和大豆浓缩蛋白质可以使用。除这些蛋白质以外，蛋白质如面筋、鱼肉蛋白质、牛肉蛋白质和胶原也可以令人满意地加以使用。此外，这些蛋白质的级分、来自它们的酸处理或酶处理的肽或无酸的肽也可以令人满意地加以使用。游离氨基酸可以起到氮源作用并且还可以用于产生特定的生理作用。此类游离氨基酸包括例如牛磺酸、精氨酸、半胱氨酸、胱氨酸和谷氨酸。脂包括动物脂肪和动物油，如乳脂、猪油、牛油和鱼油、植物油如大豆油、油菜籽油、玉米油、椰油、棕榈油、红花油、亚麻子油、月见草油、中链脂肪酸三酰甘油和棉籽油、细菌产生的脂肪和油以及其经过级分的油，其氢化油和其酯交换油。待掺入脂类的量根据用途变化。

[0322] 糖类包括例如淀粉、可溶性多糖、糊精中的一种或多种、单糖如蔗糖、如本文中所述的乳糖、麦芽糖、葡萄糖和果糖以及其他寡糖。这类糖的总量优选地占营养组合物中总固体重量的40至80%。此外，人造甜味剂如阿斯帕坦可以令人满意地加以使用。人工甜味剂的量大约是营养组合物中总固体重量的0.05至1.0%。

[0323] 维生素包括但不限于作为必需成分的番茄红素，此外包括例如维生素，如维生素A、维生素B族、维生素C、D和E和维生素K族、叶酸、泛酸、烟酰胺、肉碱、胆碱、肌醇和生物素，只要该维生素可以施用于婴儿即可。此类维生素的重量在用于婴儿的营养组合物中优选地为每份总固体10mg至5g。

[0324] 此外，矿物质包括钙、镁、钾、钠、铁、铜、锌、磷、氯、镁、硒和碘。此类矿物质的重量在用于婴儿的营养组合物中优选地为每份总固体1mg至5g。

[0325] 除以上所述这些成分以外，根据本发明的用于婴儿的营养组合物可以与想要混入营养组合物的任何成分混合，例如膳食纤维、核苷酸、核酸、香料和色料。

[0326] 根据本发明的食品或饮料可以用作保健食品或饮料或功能食品或饮料以预防和/或治疗口腔恶臭。

[0327] 当摄入本发明的食品或饮料时,不特别限制待摄入的量。基于活性成分的总量,待摄入的量通常是每日0.1至50g、优选0.5g至20g。连续以这个量摄入该食品或饮料一段时间,从一天至5年、优选地从2周至一年。这里摄入量可以调整至适宜的范围,这取决于摄入食品和饮料的个体的症状严重程度、年龄和体重等。

[0328] 根据本发明的饲料可以是包含活性成分的任何饲料。饲料包括例如用于狗、猫和大鼠的宠物饲料、用于奶牛和猪的牛饲料、用于鸡和火鸡的鸡饲料和用于鲷和黄狮鱼的鱼培养饲料。

[0329] 饲料可以通过将本文上述的活性成分适宜地混入饲料原料中产生,其中饲料原料包括例如谷物、糠、油籽粕、动物源饲料原料、其他饲料原料和纯化的产物。

[0330] 谷物包括例如mile、小麦、大麦、燕麦、黑麦、糙米、荞麦、粟米(Fox-tail millet)、中国粟(Chinese millet)、Deccan grass、玉米和大豆。

[0331] 麸糠包括例如米糠、脱脂米糠、麸皮、等级最低的面粉、小麦胚、大麦麸、screening pellet、玉米麸和玉米胚。

[0332] 油籽粕包括例如大豆粕、大豆粉,亚麻子粕、棉籽粕、花生粕、红花籽粕、椰子粕、棕榈油粕、芝麻粕、葵花籽粕、油菜籽粕、木棉籽粕和芥末粕。

[0333] 动物源饲料原料包括例如鱼粉、导入粉(import meal)、全粉(whole meal)和烤粉(coast meal)、鱼膏、肉粉、肉骨粉、血粉、水解毛发、骨粉、屠宰副产品、羽毛粉、蚕蛹、脱脂乳、酪蛋白、干乳清和磷虾。

[0334] 其他饲料原料包括例如植物茎和叶如苜蓿、干草块、苜蓿叶粉和洋槐叶粉,来自玉米加工工业的副产品如玉米蛋白粉、玉米蛋白饲料和玉米浸液、淀粉、糖、酵母、来自发酵工业的副产品如啤酒糟、麦芽根、酒糟(liquor residue)和酱油渣、以及农副产品如柑桔加工残渣、豆腐渣、咖啡渣和可可渣、木薯、蚕豆、瓜尔豆粕、海藻、螺旋藻(spirulina)和小球藻(chlorella)。

[0335] 纯化的产物包括例如蛋白质,如酪蛋白和白蛋白、氨基酸、淀粉、纤维、糖如蔗糖和葡萄糖、矿物质和维生素。

[0336] 在将本发明的饲料供给动物时,待摄入的饲料量不特别加以限制,但基于活性成分的量优选地是例如每日每公斤体重0.1mg至50g、优选地每日每公斤体重0.5mg至20g。饲料以这个量连续被摄入持续从一天直至5年、优选地从2周至一年的时间。所摄入的量也可以调整至适宜范围,这取决于摄入饲料的动物的物种、年龄和体重等。

[0337] 在其他实施方案中,本发明涉及用于食品、饮料或饲料的添加剂,所述食品、饮料或饲料包含根据本发明的微生物、其失活形式、变体、衍生物、类似物或片段,以及根据本发明的微生物、其失活形式、变体、衍生物、类似物或片段用于制备用于治疗 and/或预防口腔恶臭和/或口臭的组合物的用途,其中组合物是食品、饮料或饲料的添加剂。优选的,食品或饮料的添加剂包括用于婴儿的营养组合物的添加剂。

[0338] 用于食品的添加剂可以通过产生用于食品、饮料或饲料的添加剂的常用方法生产。根据需要,可以令人满意地添加通常用于食品、饮料或饲料的添加剂,例如Food Addictive Handbook(日本食品添加剂协会1997年1月6日发行)中所述的添加剂,包括甜味

剂、色料、防腐剂、增稠剂和稳定剂、抗氧剂、固色剂、漂白剂、防腐剂、树胶基、苦味剂、酶、增白剂、酸化剂、调料、乳化剂、强化剂、用于制造的制剂、香料和香料提取物。此外，可以令人满意地添加先前所提及的用于药物片剂的常见糖、淀粉、无机材料、植物粉末、赋形剂、崩解剂、润滑剂、粘合剂、表面活性剂和增塑剂。

[0339] 添加剂包括如下添加剂。

[0340] 甜味剂包括阿斯帕坦、甘草、甜菊、木糖和罗汉果(罗汉果(*Momordica grosvenori*)的果实)。色料包括类胡萝卜素和姜黄油树脂、类黄酮、焦糖色素、螺旋藻色素、小球藻、紫甘薯红色素、紫山药色素、紫苏红色素、兰莓色素。

[0341] 防腐剂包括例如亚硫酸钠、苯甲酸盐、安息香提取物、山梨酸酯和丙酸盐。增稠剂和稳定剂包括例如，树胶如阿拉伯树胶和黄原胶、藻酸盐、壳多糖、脱乙酰壳多糖、芦荟提取物、瓜儿豆树胶、羟丙基纤维素、酪蛋白钠、玉米淀粉、羧甲基纤维素、明胶、琼脂、糊精、甲基纤维素、聚乙烯醇、微纤维纤维素、微晶纤维素、海藻纤维素、聚丙烯酰胺钠、聚磷酸钠、角叉菜聚糖或酵母细胞壁。

[0342] 抗氧化剂包括例如维生素C组、乙二胺四乙酸钠、乙二胺四乙酸钙、赤藻糖酸、谷维素、儿茶素、槲皮素、丁香提取物、酶处理的芸香苷、苹果提取物、芝麻籽提取物、二丁基甲酚、小茴香提取物、辣根提取物、水芹提取物、茶提取物、生育酚、油菜籽提取物、咖啡豆提取物、葵花籽提取物、阿魏酸、丁基羟基苯甲醚、兰莓叶提取物、蜂胶提取物、胡椒提取物、凤仙花提取物、没食子酸、桉树属植物提取物和迷迭香提取物。

[0343] 固色剂包括例如亚硝酸钠。漂白剂包括例如亚硫酸钠。

[0344] 抗菌剂包括例如邻苯基苯酚。树胶基包括例如乙酰基蓖麻酸甲酯、漆蜡、酯胶、榄香树脂、棕小叶蜡、贝壳杉树胶、巴西棕榈蜡、甘油脂肪酸酯、鲸蜡、**珞吧**香脂、**珞吧**树脂、橡胶、米糠蜡、蔗蜡、虫胶、节路顿胶、蔗糖脂肪酸酯、解聚的天然橡胶、石蜡、加拿大香脂、丙二醇脂肪酸酯、纸浆粉、稻壳粉、霍霍巴油、聚异丁烯、聚丁烯、微晶蜡、乳香、蜂蜡和磷酸钙。

[0345] 苦味剂包括例如异- α -苦酸、咖啡因、云芝(*Coriolus versicolor*)提取物、红金鸡纳树(*redbark cinchona*)提取物、黄槿(*Phellodendron*)树皮提取物、龙胆(*gentian*)根提取物、香料提取物、经酶修饰的柚皮苷、牙买加决明属(*Jamaica cassia*)植物提取物、茶褐素(*theabromine*)、柚皮苷、决明属植物提取物、苦艾(*absinth*)提取物、香茶菜(*isodonis*)提取物、橄榄茶(*olive tea*)、酸橙(*Citrus aurantium*)提取物、啤酒花提取物和苦艾(*wormwood*)提取物。

[0346] 酶包括例如淀粉酶、胰蛋白酶或粗制凝乳酶。

[0347] 增白剂包括例如漆蜡和野漆树蜡。酸化剂包括例如己二酸、衣康酸、柠檬酸、琥珀酸、乙酸钠、酒石酸、二氧化碳、乳酸、植酸、富马酸、苹果酸和磷酸。调料包括例如氨基酸如天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、丝氨酸、胱氨酸、酪氨酸、亮氨酸和脯氨酸，核酸如肌苷钠、尿苷酸钠、鸟苷酸钠、胞苷酸钠、核糖核苷酸钙和钠核糖核苷酸，有机酸如柠檬酸和琥珀酸、氯化钾、低氯化钠卤水、粗氯化钾、乳清盐、磷酸钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠和小球藻提取物。

[0348] 强化剂包括例如锌盐、维生素C组、多种氨基酸、5-腺苷酸、氯化铁、橙皮苷、多种煅烧的钙、多种非煅烧的钙、二苯甲酰基硫胺素、氢氧化钙、碳酸钙、硫胺素盐酸盐、盐藻、胡萝卜素、生育酚、烟酸、胡萝卜的胡萝卜素、棕榈油胡萝卜素、泛酸钙、维生素A、羟脯氨酸、焦磷酸二

氢钙、焦磷酸亚铁、焦磷酸铁、铁蛋白、血红素铁、甲基萘醌类、叶酸和核黄素。

[0349] 用于制造的物质包括例如加工助剂,如丙酮和离子交换树脂。香料包括例如香子兰精而香料提取物包括例如辣椒属(capsicum)植物提取物。

[0350] 这些多种添加剂可以根据本发明在考虑施用的模式下添加至活性成分。

[0351] 根据本发明的组合物涵盖了本发明的微生物。可以想象组合物包含益生微生物形式的微生物。即,除益生效应外,上述属于乳酸菌组的益生微生物可用于治疗和/或预防口腔恶臭和/或口臭。所述益生微生物的量在合理的医学判断范围内,足够高从而显著积极的修饰所治疗的状况,优选的口腔恶臭,但是足够低从而避免严重的副作用(以合理的收益/风险比)。有效量的所述益生微生物可以根据要实现的特定目标、治疗患者的年龄和生理条件、潜在疾病的严重程度、治疗持续期、同步治疗的性质和所使用的特定微生物而改变。因而,所述益生微生物的有效量可以是提供所需效应的最小量。例如当以大约0.05ml至大约20ml的量施用时,在0.05ml磷酸缓冲盐溶液或在0.05ml琼脂悬浮液中存在 1×10^9 个活细菌细胞或死细菌细胞或等量干重的细胞壁片段是有效的。

[0352] 已确定的实践优势是益生生物可以用方便的方式施用,如通过经口施用途径。包含这种益生生物的活性成分可能需要包裹在一种材料内以保护所述生物免受酶、酸或其他可以灭活该生物的天然因素作用,这取决于施用途径。为了通过其他的胃肠道外施用方式施用益生生物,益生生物应当由一种材料包裹或与该材料结合进行施用以防止被灭活。例如,益生生物可以与酶抑制剂一起或在脂质体内共同施用。酶抑制剂包括胰脏的胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟磷酸(DFP)和特斯乐。脂质体包括水-油-水的P40乳剂以及常规设计和专门设计的转运乳杆菌或其副产物至尿生殖道表面的脂质体。分散系还可以例如在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油里制备。通常,分散系通过将多种已消毒的益生生物掺入含有基础分散介质和来自如上所列举成分中所需要的其他成分的无菌载体进行制备。当无菌散剂用于制备无菌注射溶液时,优选的制备方法是从事先无菌过滤的其成分溶液中形成活性成分加任何额外所需要成分的粉末的真空干燥技术和冷冻干燥技术。额外优选的制备方法包括但不限于冻干和热干燥。

[0353] 组合物还包含用于经口施用或口含施用的包含如本文中所述的可药用载体的产物,其中上述属于乳酸菌组微生物的细胞例如以新鲜的、浓缩的或干燥的形式添加至可药用载体或其表面。当然,还可以添加所述微生物的失活形式、衍生物或类似物或片段或如本文所述的微生物、其衍生物和/或类似物和/或片段的任意组合。这些产品可以以可摄入的混悬剂、凝胶剂、扩散体、胶囊剂、硬明胶胶囊剂、糖浆剂或以任何本领域技术人员所知的盖伦制剂形式提供。

[0354] 当益生生物如上所述受到适宜保护时,活性化合物可以例如随惰性稀释剂或可吸收的可食载体经口施用或它可以密封在硬质或软质的明胶胶囊层内,或它可以压制为设计通过胃的片剂(即肠包衣的)或它可以直接掺入膳食食品。为了经口治疗性施用,益生生物可以与赋形剂混合并以可摄入的片剂、口含片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂等形式使用。本发明的组合物或制备物如此制备以至经口施用单位剂型含有每毫升例如大约 1×10^9 个活的或死亡的例如乳杆菌。为方便且有效地以有效量施用,将益生生物与合适的可药用或可食品用载体复合为如文中前述的单位剂型。单位剂型可以例如含有量为大约每毫升 10^9 个活的或死的例如乳杆菌的主要活性复合物。在含有补充成分如益生菌

剂的组合物的情况下,通过参考所述成分的常用剂量和常见施用方式确定剂量。

[0355] 在其他实施方案中,本发明涉及预防和/或治疗口腔恶臭和/或口臭的方法。优选的,预防和/或治疗的方法包括向对象施用如前所述的根据本发明的微生物或所述微生物的失活形式、或变体、衍生物、类似物或片段。

[0356] 优选的,治疗对象是动物。更优选的,动物是哺乳动物,甚至更优选的,哺乳动物是宠物哺乳动物。在优选的实施方案中,宠物是狗、猫、仓鼠、猴、大鼠或小鼠。在另一个优选的实施方案中,动物是牛、马、猪、驴、绵羊或山羊。在另一个优选的实施方案中,哺乳动物是人类。

[0357] 在本发明的治疗和/或预防方法的上下文中,根据本发明的微生物的施用可以以本领域技术人员已知的任何合适形式进行。优选地,施用包括使用和应用本文上述的组合,所述组合物可任选包含例如本文上述的药物或化妆品载体或赋形剂。施用的剂量和时间过程可根据本领域技术人员已知的任何合适的信息建立。优选地,所述剂量和时间过程可如本文上述建立。

[0358] 可以通过图1至7如下文所述示例本发明:

[0359] 图1显示了分析乳杆菌降低肽浓度对唾液中存在的革兰氏阴性厌氧菌的 H_2S 生产的影响的实验结果。

[0360] 图2显示了如实施例3所述,分析乳杆菌上清液对唾液链球菌生长的影响的实验结果。

[0361] 图3显示了如实施例5所述,分析乳杆菌对牙龈红棕色单胞菌生长的影响的实验结果。

[0362] 图4显示了如实施例6所述,分析热处理过的乳杆菌上清液对唾液链球菌生长的影响的实验结果。

[0363] 图5显示了根据本发明,分析乳杆菌降低肽浓度的实验结果。

[0364] 图6显示了根据本发明,分析冻干的乳杆菌降低肽浓度的实验结果。

[0365] 图7显示了PTU提取物的典型的氨基酸谱。

[0366] 可以从下列实施例获得对本发明及其许多优点的更好理解,下列实施例仅供示例的目的,并非意在以任何方式限制本发明的范围。

[0367] 实施例1

[0368] 培养基

[0369] TSY-培养基:

[0370] TSY-混合物 (Difco, USA) 30g/l

[0371] 酵母提取物 (Deutsche Hefewerke, Germany) 3g/l

[0372] MRS light-培养基:

[0373] 蛋白胨胰胨: 1.0g/l

[0374] 酵母提取物: 0.5g/l

[0375] 柠檬酸氢二铵: 0.2g/l

[0376] 醋酸钠: 0.5g/l

[0377] $MgSO_4$ -七水合物: 0.050g/l

[0378] $MnSO_4$ -单水合物: 0.025g/l

[0379]	D-葡萄糖-单水合物:	1g/l
[0380]	K ₂ HPO ₄ :	0.2g/l
[0381]	油酸:	0.1% (w/v)
[0382]	<u>合成培养基:</u>	
[0383]	鸟嘌呤:	0.1g/l
[0384]	胞嘧啶:	0.1g/l
[0385]	胸苷:	0.1g/l
[0386]	2'-脱氧腺苷:	0.1g/l
[0387]	2'-脱氧尿苷:	0.1g/l
[0388]	K ₂ HPO ₄ :	2g/l
[0389]	醋酸钠:	5g/l
[0390]	MgSO ₄ -七水合物:	0.1g/l
[0391]	柠檬酸氢二铵:	2g/l
[0392]	CaCl ₂ -二水合物:	0.5g/l
[0393]	油酸:	0.1% (w/v)
[0394]	氰钴胺素:	0.02mg/l
[0395]	核黄素:	10mg/l
[0396]	叶酸:	0.2mg/l
[0397]	吡哆醛-5-磷酸-单水合物:	10mg/l
[0398]	4-氨基苯甲酸:	0.2mg/l
[0399]	D(+)-生物素:	1mg/l
[0400]	抗坏血酸:	500mg/l
[0401]	烟酸:	10mg/l
[0402]	泛酸钙:	10mg/l
[0403]	硫胺素:	1mg/l
[0404]	硝酸钴(II)-六水合物:	500mg/l
[0405]	MnSO ₄ -单水合物:	20mg/l
[0406]	MgSO ₄ -七水合物:	500mg/l
[0407]	Na ₂ MoO ₄ :	0.04mg/l
[0408]	PTU-提取物(Ohly, Deutsche Hefewerke Germany):	15g/l (或如别处所述)
[0409]	D-葡萄糖-单水合物:	10g/l
[0410]	<u>FAB培养基:</u>	
[0411]	蛋白胨混合物:	15.0g/l
[0412]	酵母提取物:	10.0g/l
[0413]	巯基乙酸钠:	0.5g/l
[0414]	氯化钠:	2.5g/l
[0415]	琼脂No.1:	0.75g/l
[0416]	L-半胱氨酸HCl:	0.5g/l
[0417]	Resazurin:	0.001g/l

- [0418] 碳酸氢钠: 0.4g/l
[0419] 氯化血红素: 0.005g/l
[0420] 维生素K: 0.0005g/l

[0421] 储存和生长

[0422] 储存和生长可以根据常规程序进行。例如,菌株可以作为冷冻储存物储存在-80℃。1ml培养物可以在MRS培养基中生长至平稳期(OD_{600}/mL 4-8),并与500 μ l的无菌50%甘油溶液混合和冷冻。

[0423] 唾液链球菌的培养物在TSY培养基中生长至平稳期(OD_{600}/mL 1-2),并如上述处理。用于实验中的唾液链球菌菌株优选的是唾液链球菌DSM 20560 (Andrews和Horder, 1906)。

[0424] 在含8ml TSY培养基的6孔板中,37℃厌氧培养唾液链球菌 (DSM20560) 以及分离物过夜。

[0425] 在96孔板中在150 μ l合成培养基中,37℃厌氧培养乳杆菌 (DSM19825、19826、19827) 24小时。

[0426] 在1/2TSY培养基中,按1:100的细胞数比例,将乳杆菌和唾液链球菌混合。在96孔板中完成混合。

[0427] 在37℃下,在BioTek PowerWave微平板分光光度计中,孵育培养悬浮液12h。

[0428] 作为对照,使用未消耗的1/2TSY培养基或MRS light-培养基替代乳杆菌培养物。

[0429] 在孵育10小时后($OD_{600,max}$)或在数生长期(V_{max}),比较含有和不含乳杆菌的最大光密度($OD_{600,max}$)或最大生长速率(V_{max}),可以见到唾液链球菌的生长刺激。

[0430] 将刺激定义为最大光密度($OD_{600,max}$)或最大生长速率(V_{max})增加至少10%。

[0431] 实施例2

[0432] 菌株的分类学鉴别

[0433] 根据碳水化合物发酵模式进行菌株的分类学鉴别。利用API 50 CH (bioMerieux, France) 系统确定,并利用APILAB PLUS软件3.3.3版 (bioMerieux, France) 分析。

[0434] 实施例3

[0435] 乳杆菌上清液对唾液链球菌的生长刺激的测试

[0436] 如实施例1培养细菌。通过在4000xg离心15min获得乳杆菌 (特别是DSM 19826) 的上清液。在1/2TSY培养基中,以2:1至4:1的容积比 (唾液链球菌:乳杆菌-上清液) 混合乳杆菌上清液与唾液链球菌。在96孔板中进行该混合。在37℃下,在BioTek PowerWave微平板分光光度计中,孵育培养悬浮液12h。作为对照,使用未消耗的1/2TSY培养基或MRS light-培养基替代乳杆菌上清液。

[0437] 如实施例1测定生长刺激。可以观察到乳杆菌上清液对唾液链球菌生长的成功刺激。上述结果显示在图2中。

[0438] 实施例4

[0439] 对口腔菌群变形链球菌的口腔病原体成员无刺激作用

[0440] 如实施例1生长唾液链球菌培养物。在封闭的15ml Falcon管中,变形链球菌 (DSM 20253) 在5ml TSY培养基中生长过夜。将口腔细菌以2:1的容积比与乳杆菌上清液混合,并如实施例1测定生长。作为对照,使用未消耗的1/2TSY培养基代替乳杆菌上清液培养口腔细

菌。

[0441] 没有观察到乳杆菌对口腔病原体变形链球菌的生长刺激。

[0442] 此外,可以通过下列检测来测定对变形链球菌生长的无刺激作用:

[0443] 在96孔板中在150 μ l合成培养基中,37℃厌氧培养乳杆菌(例如,DSM 19825、19826、19827)24小时。在封闭的15ml Falcon管中,变形链球菌(DSM 20253)在5ml TSY培养基中37℃厌氧条件下生长过夜。在1/2TSY培养基中,按1:100的细胞数比例(乳杆菌:变形链球菌),将乳杆菌和变形链球菌混合。在96孔板中进行该混合。在37℃下,在BioTekPowerWave微平板分光光度计中,厌氧孵育培养悬浮液12h。作为对照,使用未消耗的1/2TSY培养基取代乳杆菌培养物。

[0444] 实施例5

[0445] 对口腔菌群牙龈红棕色单胞菌的口腔病原体成员的无刺激作用

[0446] 如实施例1生长唾液链球菌培养物。在封闭的15ml Falcon管中,牙龈红棕色单胞菌(DSM 20709)在5ml FAB培养基中37℃厌氧生长过夜。将牙龈红棕色单胞菌以2:1的体积比与乳杆菌上清液(来自DSM 19826)混合,并在96孔板中厌氧培养。作为对照,使用未消耗FAB培养基代替乳杆菌上清液培养牙龈红棕色单胞菌。

[0447] 没有观察到乳杆菌对口腔病原体牙龈红棕色单胞菌的生长刺激。结果显示在图3中。

[0448] 此外,可以通过下列检测来测定对牙龈红棕色单胞菌生长的无刺激作用:

[0449] 在96孔板中在150 μ l合成培养基中,37℃厌氧培养乳杆菌(例如,DSM 19825、19826、19827)24小时。在封闭的15ml Falcon管中,牙龈红棕色单胞菌(DSM 20709)在5ml FAB培养基中37℃厌氧生长过夜。在FAB培养基中,按1:100的细胞数比例(乳杆菌:牙龈红棕色单胞菌),将乳杆菌和牙龈红棕色单胞菌混合。在96孔板中进行该混合。在37℃下,在Whitley DG250厌氧工作站(Meintrup-DWS,Germany)中,厌氧孵育培养悬浮液45h。作为对照,使用未消耗FAB培养基取代乳杆菌培养物。

[0450] 实施例6

[0451] 乳杆菌的刺激能力的温度耐受性

[0452] 如实施例1生长细菌。在孵育箱中,80℃孵育(DSM 19827的)乳杆菌上清液10min。将上清液冷却至室温后,将乳杆菌上清液以1:2的容积比与生长的唾液链球菌培养物混合,并如实施例1测定刺激作用,包括对照实验。

[0453] (仍利用口腔病原性细菌,如实施例4和5中略述的,测定刺激作用。证实乳杆菌对口腔病原性细菌的无刺激行为不受热处理的影响。)

[0454] 未能观察到热处理对唾液链球菌的刺激活性的影响。结果显示在图4中。

[0455] 实施例7

[0456] 刺激作用对冻干的敏感度

[0457] 如实施例1生长唾液链球菌。在封闭的100ml瓶(Schott,Germany)中,将乳杆菌在50ml合成培养基中37℃厌氧培养过夜。通过在4000 $\times$ g离心15min获得乳杆菌的上清液。将20ml上清液冷冻至-80℃,并在真空冻干16h。将冻干的上清液重悬在20ml H₂O中。在1/2TSY培养基中,将重悬的上清液与唾液链球菌培养物按2:1的比例(唾液链球菌:重悬的上清液)在96孔板中混合。如实施例1中的测定生长刺激作用,包括对照实验。

[0458] 冻干不降低刺激活性。

[0459] 实施例8

[0460] 乳杆菌降低肽浓度

[0461] 如实施例1培养乳杆菌 (DSM 19827)。在含15g/l的肽 (PTU提取物) 的合成培养基中培养主培养物。用10 μ l培养悬浮液接种培养基, 在37℃厌氧培养24小时。然后确定肽浓度, 在24h后表现出降低至少20%。

[0462] 结果显示生长的乳杆菌有效的降低了肽浓度, 如图5所示。

[0463] 实施例9

[0464] 肽浓度降低对冻干的敏感度

[0465] 在100ml合成培养基中37℃培养乳杆菌 (DSM 19827) 24h。在4000xg离心全培养物15min, 并重悬在20ml H₂O中。将20ml重悬的乳杆菌冷冻至-80℃, 并在真空冻干16h。

[0466] 对于肽摄入测定, 将10mg冻干的乳杆菌重悬在H₂O中, 并在4000xg离心10min。向沉淀添加含7g/l肽的1ml合成培养基, 并在5min 37℃孵育后, 通过离心去除细胞。确定上清液中的肽浓度。去除细胞后, 培养基中的肽浓度降低至2g/l。这对应每mg的冻干乳杆菌摄入0.5mg的肽。

[0467] 上述结果显示, 冻干状态的乳杆菌有效的降低了肽浓度, 如图6所示。

[0468] 实施例10

[0469] 乳杆菌降低肽浓度对革兰氏阴性厌氧菌的H₂S生产的影响

[0470] 如实施例8培养并冻干乳杆菌。对于该实验, 在深孔板中, 将10mg冻干的乳杆菌重悬在H₂O中, 并在4000xg离心10min。向沉淀添加含3g/l肽的1ml合成培养基, 并在37℃孵育5min后, 通过离心去除细胞。

[0471] 孵育不改变培养基的pH。

[0472] 然后, 用50 μ l未灭菌的人唾液接种培养基, 并在37℃厌氧孵育6h。用浸透了醋酸铅的灭菌的滤纸覆盖深孔板。通过滤纸的黑化监控唾液微生物的硫化氢产生。

[0473] 通过将黑化与没有用乳杆菌预孵育的对照实验的黑化相比较, 观察到在乳杆菌处理的培养基中降低的H₂S生产。

[0474] 上述结果显示, 用乳杆菌预孵育培养基导致后来在用来自人唾液的微生物孵育培养基的过程中, 降低的H₂S生产

[0475] 实施例11

[0476] 锭剂组合物 (I)

[0477] 锭剂组合物优选地如在DE-C2 36 45 147第8页实施例4中所述制备, 其中, 在除所述实施例4中所提及的成分之外, 还将上述属于乳酸菌的微生物以每毫克锭剂10²至10¹²个、优选地10³至10⁸个细胞的量添加。

[0478] 实施例12

[0479] 锭剂组合物 (II)

[0480] 锭剂组合物优选地如在DE-C2 36 45 147第8页实施例5中所述制备, 其中, 在除所述实施例5中所提及的成分之外, 还将上述属于乳酸菌的微生物以每毫克锭剂10²至10¹²个、优选地10³至10⁸个细胞的量添加。

[0481] 实施例13

[0482] 洁牙剂组合物

[0483] 洁牙剂组合物优选地如DE-C2 36 45 147第8页实施例3中所述制备,其中,在除所述实施例3中所提及的成分之外,还将上述属于乳酸菌的微生物以每毫克洁牙剂组合物 10^2 至 10^{12} 个、优选地 10^3 至 10^8 个细胞的量添加。

[0484] 实施例14

[0485] 基于白垩的洁牙剂组合物

[0486] 基于白垩的洁牙剂组合物优选地如W.Umbach (编者) 的教科书“Kosmetik”第二版, Thieme Verlag, 1995第205页第7.1.4.4章“Rezepturbeispiel”中所述制备,其中,在除第205页该章中所提及的成分之外,还将上述属于乳酸菌的微生物以每毫克基于白垩的洁牙剂 10^2 至 10^{12} 个、优选地 10^3 至 10^8 个细胞的量添加。

[0487] 实施例15

[0488] 基于硅酸/氟化钠的凝胶洁牙剂

[0489] 基于硅酸/氟化钠的凝胶洁牙剂优选地如W.Umbach (编者) 的教科书“Kosmetik”第二版, Thieme Verlag, 1995第205页第7.1.4.4章“Rezepturbeispiel”中所述制备,其中,在除第205页该章节中所提及的成分之外,还将上述属于乳酸菌的微生物以每毫克基于硅酸/氟化钠的凝胶洁牙剂 10^2 至 10^{12} 个、优选地 10^3 至 10^8 个细胞的量添加。

[0490] 实施例16

[0491] 抗牙石的洁牙剂组合物

[0492] 抗牙石的洁牙剂组合物优选地如W.Umbach (编者) 的教科书“Kosmetik”第二版, Thieme Verlag, 1995第206页第7.1.4.4章“Rezepturbeispiel”中所述制备,其中,在除第206页该章节中所提及的成分之外,还将上述属于乳酸菌的微生物以每毫克抗牙石的牙粉 10^2 至 10^{12} 个、优选地 10^3 至 10^8 个细胞的量添加。

[0493] 实施例17

[0494] 口香糖组合物

[0495] 口香糖组合物优选地如DE-C2 36 45 147第9页实施例6中所述制备,其中,在除所述实施例6中所提及的成分之外,还将上述属于乳酸菌的微生物以每毫克口香糖 10^2 至 10^{12} 个、优选地 10^3 至 10^8 个细胞的量添加。

[0496] 实施例18

[0497] 浓缩的漱口组合物

[0498] 浓缩的漱口组合物优选地如W.Umbach (编者) 的教科书“Kosmetik”第二版, Thieme Verlag, 1995第206页第7.1.4.4章“Rezepturbeispiel”中所述制备,其中,在除第206页该章节中所提及的成分之外,还将上述属于乳酸菌的微生物以每毫升浓缩的漱口组合物 10^2 至 10^{13} 个细胞的量添加。

[0499] 实施例19

[0500] 膜制备物

[0501] 膜的制备:

[0502] 1. 水相

[0503] -加热水至60°C

[0504] -将阿斯帕坦 (甜味剂) 在搅拌下加入

[0505] -完全溶解阿斯帕坦

[0506] -将水溶性聚合成膜剂如Kollicoat IR (在聚乙烯醇上的聚乙二醇) 或PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 或天然聚合物如藻酸盐在搅拌下加入直至它们溶解。

[0507] -十分钟后, 除去剩下的泡沫

[0508] -将上述属于乳酸菌的微生物以每份成品香味薄膜 10^2 至 10^{12} 个、优选地 10^3 至 10^8 个细胞的量在冷却混合物后添加; 备选地, 可以添加上述属于乳酸菌的微生物的变体或衍生物或者上述属于乳酸菌的类似物或片段。

[0509] 2. 油相

[0510] -将薄荷醇溶解于薄荷油

[0511] -将聚山梨酯80搅拌下添加至薄荷油-薄荷醇混合物

[0512] -随后将该混合物搅拌下添加至丙二醇

[0513] -可以添加任选的色料 (如色素、色淀)

[0514] 3.-在搅拌下将油相与水相缓慢混合

[0515] 4.-薄膜使用切割装置机械地生成。

[0516] 样品配方:

[0517]

	配方 I		配方 II	
	重量[g]	膜内的组分 [%]	重量[g]	膜内的组分[%]
相 I				
阿斯帕坦	0.7	1.4	0.7	1.8
Kollicoat IR	35.0	68.5	25.0	65.8
抗坏血酸	-	-	1.0	2.6
樱桃香精			6.0	15.8
去矿化水	85.0	-	80.0	
相 II				
薄荷醇	1.4	2.7	-	
薄荷油	5.6	11.0	-	
聚山梨酯 80	0.7	1.4	-	
丙二醇	7.0	13.7	5.0	13.2
绿色淀	0.7	1.4	-	
偶氮玉红色淀	-	-	0.3	0.8
总计	136.1	100.0	118.0	100.0
固体含量	51.1		38.0	

[0518] 本发明的其他实施方案和用途对本领域技术人员而言在本文中公开的本发明说明书和实施例后是明显的。本文中无论出于何种原因所引用的全部参考文献, 包括所有出

出版物、全部美国专利和外国专利以及美国专利申请和外国专利申请均具体而完整地引用作
为参考用于全部目的。说明书和实施例旨在仅应当视为起示例性,同时本发明的范围和精
神由如下权利要求书描述。

[0519]

申请人或代理人卷号 N3128 PCT S3	国际申请号
----------------------------------	-------

[0520] 与保藏的微生物或其它生物材料有关的声明

[0521] (PCT细则第13条之2)

[0522]

A. 以下声明涉及说明书第 22 页 第 20-28 行所提及的保藏的微生物或其它生物材料	
B. 保藏鉴定 其它保藏物在附页鉴定 ☐	
保藏机构名称 DSMZ-德意志微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国家) 德国 38124 不伦瑞克 因霍芬路 7b	
保藏日 2007 年 11 月 1 日	保藏号 DSM 19825
C. 附加声明 (如果不适用可不填) 此信息在附页中续 ☐	
申请人在条约 32 EPC 下使用该权利	
D. 声明适用的指定国 (若声明不是针对所有的指定国)	
E. 声明的单独提供 (如果不适用可不填)	
如下所示声明将随后提交给国际局 (指明声明的一般属性, 如“保藏登录号”)	

仅供受理局使用	仅供国际局使用
☐ 该页连同国际申请一起收到	☐ 国际局收到此页日期:
授权官员	授权官员

[0523] PCT/RO/134表 (1998年7月;2004年1月重印)

[0524]

申请人或代理人卷号 N3128 PCT S3	国际申请号
----------------------------------	-------

[0525] 与保藏的微生物或其它生物材料有关的声明

[0526] (PCT细则第13条之2)

[0527]

A. 以下声明涉及说明书第 22 页 第 20-28 行所提及的保藏的微生物或其它生物材料	
B. 保藏鉴定 其它保藏物在附页鉴定 ☐	
保藏机构名称 DSMZ-德意志微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国家) 德国 38124 不伦瑞克 因霍芬路 7b	
保藏日 2007 年 11 月 1 日	保藏号 DSM 19826
C. 附加声明 (如果不适用可不填) 此信息在附页中续 ☐	
申请人在条约 32 EPC 下使用该权利	
D. 声明适用的指定国 (若声明不是针对所有的指定国)	
E. 声明的单独提供 (如果不适用可不填)	
如下所示声明将随后提交给国际局 (指明声明的一般属性, 如“保藏登录号”)	

仅供受理局使用	仅供国际局使用
☐ 该页连同国际申请一起收到	☐ 国际局收到此页日期:
授权官员	授权官员

[0528] PCT/RO/134表 (1998年7月;2004年1月重印)

[0529]

申请人或代理人卷号 N3128 PCT S3	国际申请号
---------------------------	-------

[0530] 与保藏的微生物或其它生物材料有关的声明

[0531] (PCT细则第13条之2)

[0532]

A. 以下声明涉及说明书第 22 页 第 20-28 行所提及的保藏的微生物或其它生物材料	
B. 保藏鉴定 其它保藏物在附页鉴定 ☐	
保藏机构名称 DSMZ-德意志微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国家) 德国 38124 不伦瑞克 因霍芬路 7b	
保藏日 2007 年 11 月 1 日	保藏号 DSM 19827
C. 附加声明 (如果不适用可不填) 此信息在附页中续 ☐	
申请人在条约 32 EPC 下使用该权利	
D. 声明适用的指定国 (若声明不是针对所有的指定国)	
E. 声明的单独提供 (如果不适用可不填)	
如下所示声明将随后提交给国际局 (指明声明的一般属性, 如“保藏登录号”)	
仅供受理局使用 ☐ 该页连同国际申请一起收到	仅供国际局使用 ☐ 国际局收到此页日期:
授权官员	授权官员

[0533] PCT/RO/134表(1998年7月;2004年1月重印)

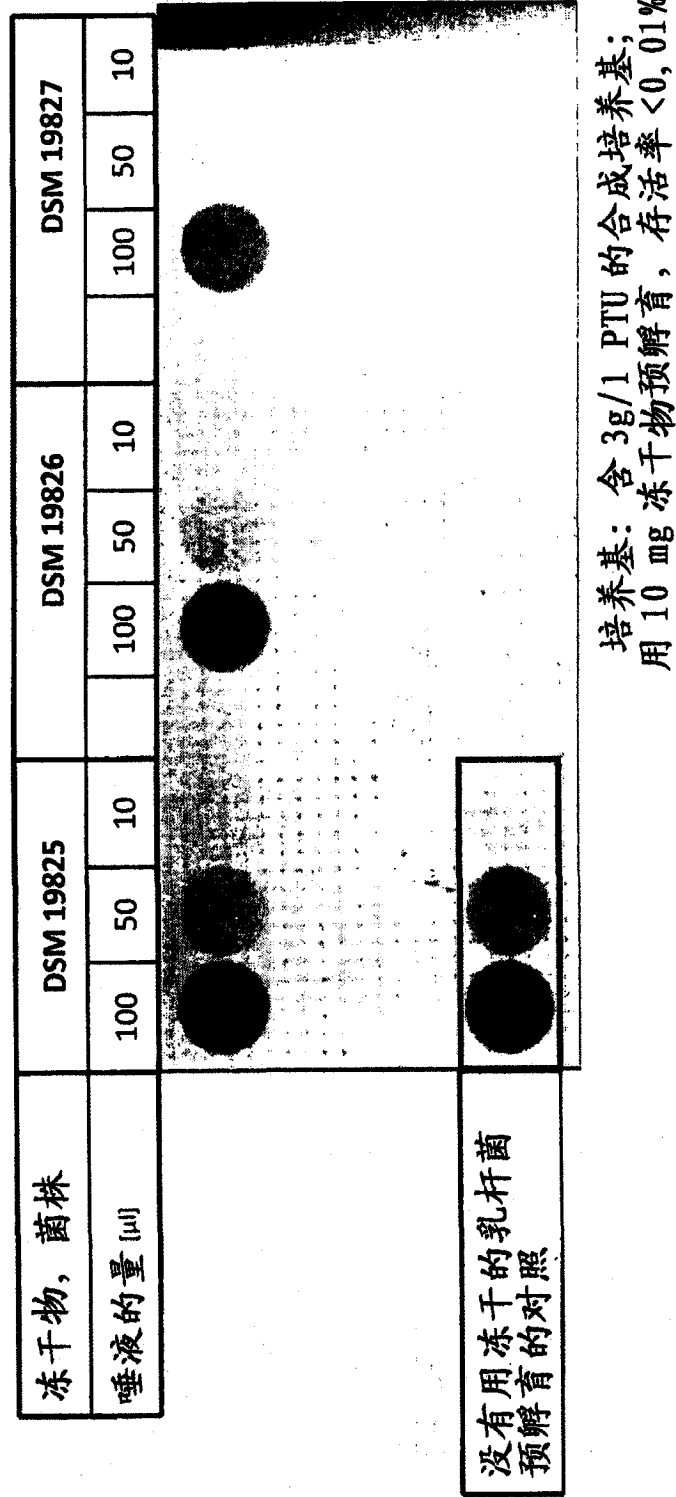


图1

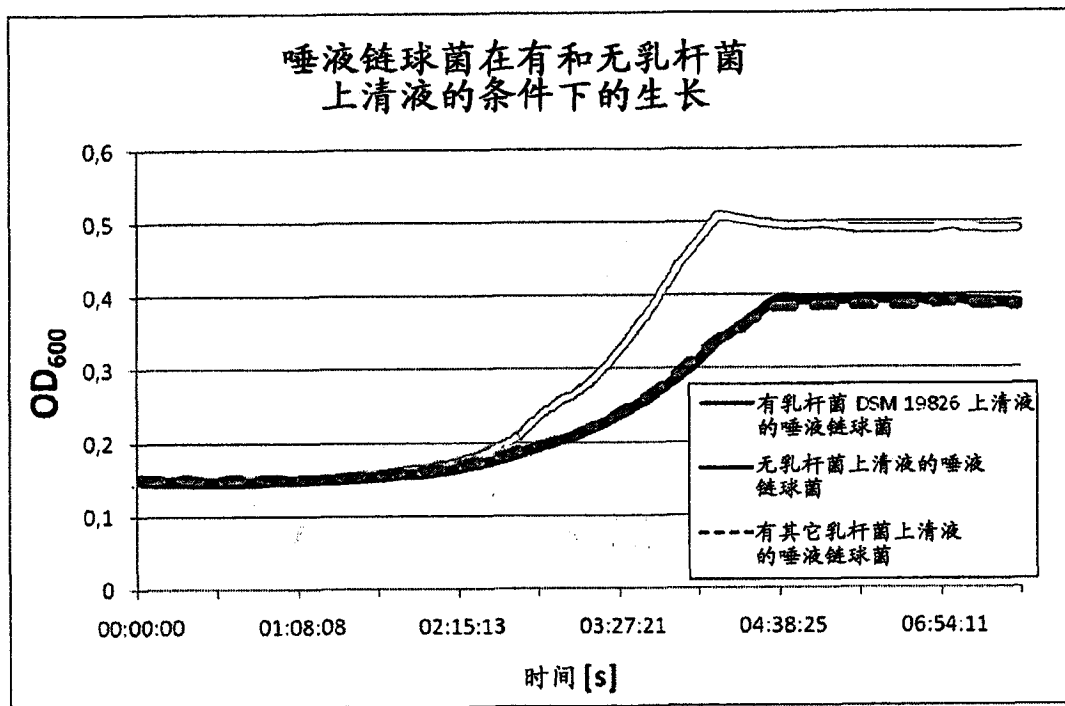


图2

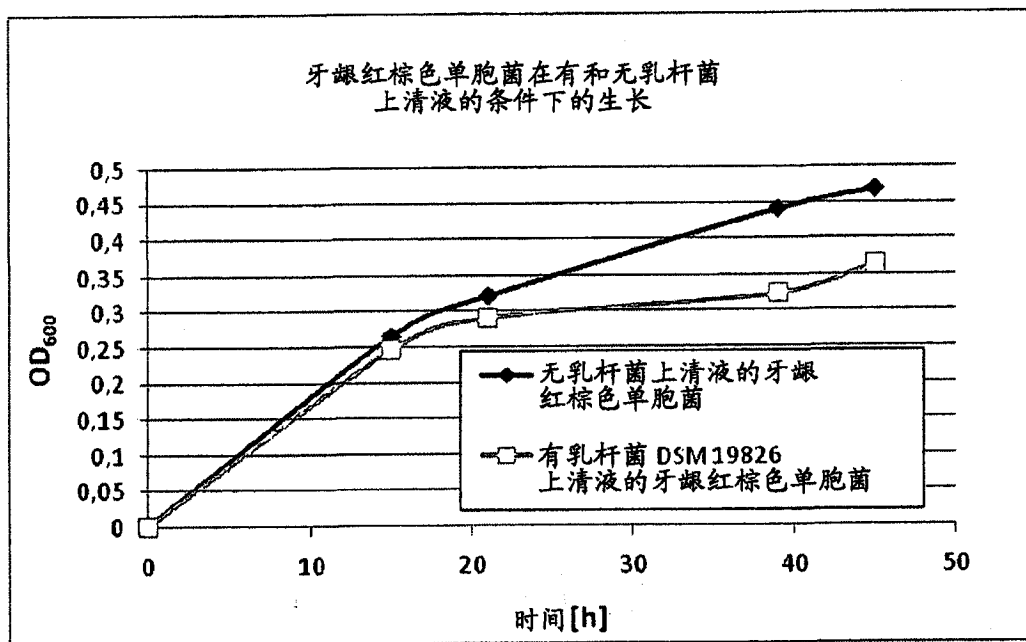


图3

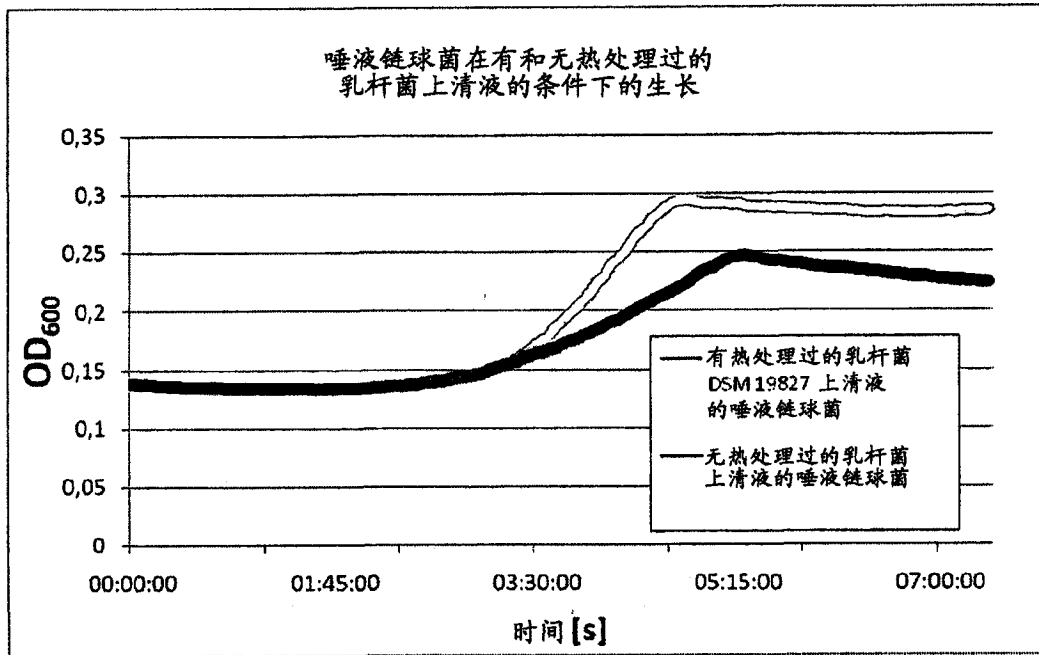


图4

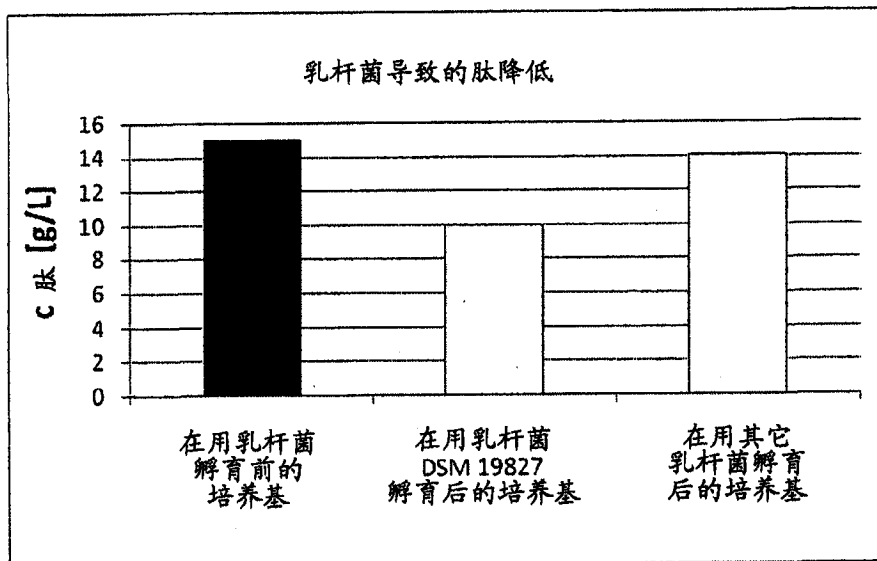


图5

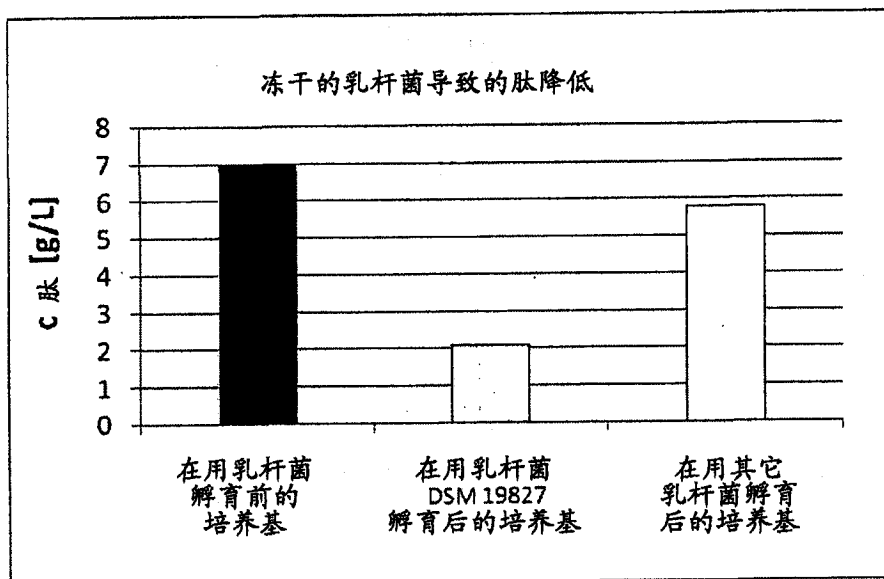


图6

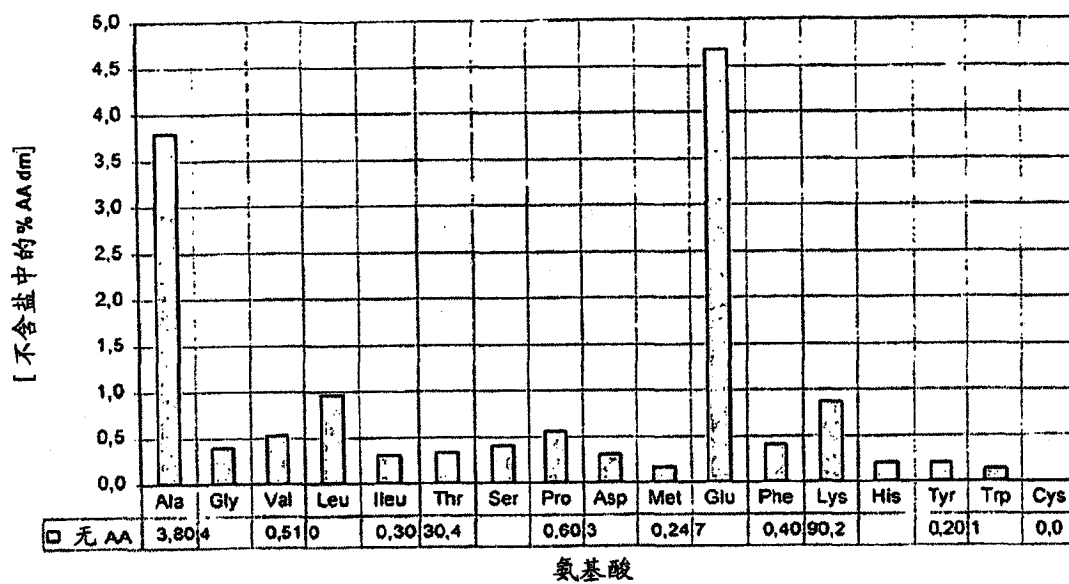


图7