

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 1/20

C12N 1/16 A23L 1/30



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99800117.1

[45] 授权公告日 2004 年 7 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1158383C

[22] 申请日 1999.2.4 [21] 申请号 99800117.1

[30] 优先权

[32] 1998. 2. 5 [33] JP [31] 24892/1998

[86] 国际申请 PCT/JP1999/000480 1999.2.4

[87] 国际公布 WO1999/040178 日 1999.8.12

[85] 进入国家阶段日期 1999.10.8

[71] 专利权人 理化学研究所

地址 日本琦玉县

共同专利权人 A·L·A·公司 水谷武夫

[72] 发明人 水谷武夫 新良一 铃木百百代

三浦一志

审查员 徐 莉

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 丁业平

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 8 页

[54] 发明名称 功能性组合物

[57] 摘要

本发明提供一种含混合物微生物的未处理或处理的培养物的组合物和一种含所述组合物的功能性食品。含混合微生物的未处理或处理的培养物的组合物含有与啤酒酵母浊合的至少三种乳酸菌，所述乳酸菌选自德氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、发酵乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、乳酸乳球菌和嗜热链球菌中的至少三种乳酸菌。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种组合物，其含有混合微生物培养物的上冷冻干或喷雾干燥的产物，其中所述混合微生物由啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和
5 乳酸菌组成，所述乳酸菌由选自德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)的3-
10 8种组成。

2. 按权利要求1所述的组合物，其中所述的乳酸菌由德氏乳杆菌、干酪乳杆菌和乳酸乳球菌组成。

15 3. 按权利要求1所述的组合物，其中所述的乳酸菌由嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和乳酸乳球菌组成。

4. 按权利要求1所述的组合物，其中所述的乳酸菌由植物乳杆菌、干酪乳杆菌和嗜热链球菌组成。

20 5. 按权利要求1所述的组合物，其中所述的乳酸菌由发酵乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和嗜热链球菌组成。

25 6. 按权利要求1所述的组合物，其中所述的乳酸菌由德氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、发酵乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、乳酸乳球菌和嗜热链球菌组成。

功能性组合物

5 技术领域

本发明涉及包含混有酵母的乳酸菌的未处理或处理的培养物的组合物，还涉及含所述组合物的功能性食品。

背景技术

10 人们一直期望含乳酸菌的发酵食品能预防成人疾病和促进健康。这样的食品以了发酵乳（酸牛奶）为代表。另外，乳酸菌饮料和酸牛奶已相当普及。

15 有关乳酸菌和发酵食品的生理活性报告已有许多，因此，预计这类食品可作为保健食品使用。

在大多数酿造的食品中，包括清酒、豆瓣酱（味噌）和酱油，已知通过在培养基中共培养的一些微生物之间的共生或拮抗作用可以产生独特的风味和味道以及一些组分。但是，通过所谓共培养仅有少数
20 几种乳酸菌或其发酵食品产生，且人们对乳酸菌的生理活性也一直不了解。

本发明内容

25 本发明的目的在于提供包含混有酵母的乳酸菌的未处理或处理的培养物的组合物，还涉及含所述组合物的功能性食品。

本发明的发明人为解决上面提到的问题进行了巨大的努力，并且发现混有酵母的乳酸菌的培养物或经处理的该培养物能显示各种功能。由此，完成了本发明。

30

本发明提供一种含至少三种乳酸菌的未处理或处理的培养物组合
物，所述乳酸菌选自德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*)、嗜酸乳
杆菌 (*Lactococcus acidophilus*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、
发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus*
5 *casei*)、鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)、乳酸乳球菌
(*Lactococcus lactis*) 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)，它
们与啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 混合。用于本发明中的混
合微生物包括德氏乳杆菌、干酪乳杆菌、乳酸乳球菌和啤酒酵母；嗜
酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、乳酸乳球菌和啤酒酵母；植物乳杆菌、干
酪乳杆菌、嗜热链球菌和啤酒酵母；以及发酵乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、
10 嗜热链球菌和啤酒酵母。

另外，本发明还提供含所述组合物的功能性食品。

15 本说明书包括如日本专利申请 JP 98/24892 的说明书和/或附图中
公开的部分或全部内容，该专利申请为本申请的优先权书面证明。

下面对本发明予以更详细的说明。

20 本发明的组合物包括通过培养（共培养）含乳酸菌和酵母的混合
微生物得到的培养物，或经处理的该培养物。

乳酸菌包括属于乳酸杆菌属、乳球菌属或链球菌属的那些，如德
氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、发酵乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠
李糖乳杆菌、乳酸乳球菌和嗜热链球菌。
25

酵母包括啤酒酵母。

使用的所述微生物通常可从市场上买到；它们不限于所述微生物
30 的特殊菌株，只要这些微生物的未处理或处理的共培养物能作为功能

性食品使用就行。例如，属于乳酸杆菌属的乳酸菌包括德氏乳杆菌菌株 ALAL007、嗜酸乳杆菌菌株 ALAL005、植物乳杆菌菌株 ALAL006、发酵乳杆菌菌株 ALAL001 和 JCM1173、干酪乳杆菌菌株 ALAL002、ALAL003 和 JCM1053，以及鼠李糖乳杆菌菌株 ALAL004、ALAL010 和 JCM1136；属于乳球菌属的乳酸菌包括乳酸乳球菌霍氏亚种（*Lactococcus lactis* subsp *hordinae*）菌株 ALAL008 和 ALAL009；属于链球菌属的乳酸菌包括嗜热链球菌菌株 ALAL011 和 ALAL012；以及酵母包括（例如）啤酒酵母菌株 JCM1499、ALAY001、ALAY002、ALAY003 和 ALAY004。

10

啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株 ALAY001、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)菌株 ALAL001、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)菌株 ALAL003 和鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)菌株 ALAL004 已在 1997 年 11 月 28 日按布达佩斯条约保藏在日本国立生命科学与人体技术研究所（National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology）（1-3 Higashi 1-chome, Tsukubashi, Ibaraki, 305-0046, Japan），保藏号分别为 FERM BP-6626、6627、6628 和 6629。

15

按照本发明，混合微生物由至少三种任选的乳酸菌和一种酵母组成。例如，按表 1 列出的微生物的组合可以是 A 到 D 组的任意一组。

20

表 1

| 组 | 乳酸菌 | | | 酵母 |
|---|-----------------|--------|---------------|------|
| | (1) | (2) | (3) | |
| A | 德氏乳杆菌 保加利亚亚种 | 干酪乳杆菌 | 乳酸乳球菌 霍氏亚种 | 啤酒酵母 |
| B | 嗜酸乳杆菌 | 鼠李糖乳杆菌 | 乳酸乳球菌 霍氏亚种 | 啤酒酵母 |
| C | 植物乳杆菌 | 干酪乳杆菌 | 唾液链球菌 嗜热亚种 | 啤酒酵母 |
| D | 发酵乳杆菌 | 鼠李糖乳杆菌 | 唾液链球菌 嗜热亚种 | 啤酒酵母 |

可以单独使用 A 组到 D 组中的任一组（4 种微生物菌株），或将其两组或更多组组合起来。若有待组合和使用的两组或更多组中包含了同一种类的微生物（例如，当组 A 和 C 有待组合时，干酪乳杆菌和啤酒酵母重叠），应使用同一种类的不同菌株。

本发明的组合物可通过在含大豆的热水提取物的培养基中培养含乳酸菌和酵母的混合微生物来获得。

培养基含大豆的热水提取物。在把每毫升 1×10^5 - 1×10^6 的各乳酸菌与每毫升 1×10^4 - 1×10^6 酵母混合后，将混合微生物在所述培养基中接种并于 20-37°C 下培养 4-10 天。

当来自不同组的许多微生物有待组合时，将待组合的各组先在上述条件下培养再彼此混合，接着在上述条件下再培养。

培养后，将培养物在 80°C 下煮沸以灭菌和回收。

本发明的组合物可通过冷冻或喷雾干燥培养物而得到。用另一种方法是，培养物用过滤或离心或用其他方法进行处理以使上清液与细胞分离。在这种情况下，上清液和细胞可同样被冷冻或喷雾干燥，以分别制备本发明的组合物。

本发明的组合物可以以任何形式存在并可处理成液体、固体、颗粒或诸如此类。颗粒状是优选的，因为颗粒便于操作。

当处理成颗粒时，可将其包含在多糖如环糊精中。

用上述方法获得的本发明组合物具有多种活性，因此可以用作具有某些功能的保健食品（功能性食品）。所述活性包括（例如）改进

肝和肾功能的活性，抗致突变活性，抑制肿瘤细胞生长活性和改进肠道细菌菌丛活性。

5 当通常以颗粒状存在时，本发明的组合物可通过吃颗粒状的组合物本身或将适当的量颗粒状组合物加到食品中作为功能性食品来使用。

食品包括（但不限于）例如饼状物如果冻和糖果、饮料如果汁、茶和营养饮料以及米饭。

10

可对加到食品中的本发明组合物的数量和比例适当加以调节，一般每种食品为 0.1-1%（按重量计）。

附图简述

15

图 1 表明根据本发明的组合物改善肝功能的活性。

图 2 表明根据本发明的组合物改善肾功能的活性。

图 3 表明根据本发明的组合物改善肾功能的活性。

图 4 表明根据本发明的组合物改善肾功能的活性。

图 5 表明根据本发明的组合物改善肝功能的活性。

20

图 6 表明试验鼠体重的变化。

图 7 表明根据本发明的组合物抑制致癌作用的活性。

图 8 表明根据本发明的组合物抗致突变作用的活性。

完成本发明的最好方式

25

通过下面的实施例对本发明进行更详细地说明。但是，本发明的范围不限于这些实施例。

实施例 1：组合物的制备

30

将八（8）种、12 个乳酸菌菌株和一种、4 个酵母菌株分成 4 组（组 A-D），如表 2 所示。

表 2

| 组 | 乳酸菌 | | | 酵母 |
|---|------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------|
| | (1) | (2) | (3) | |
| A | 德氏乳杆菌保加利 亚种 ALAL007 | 干酪乳杆菌 ALAL003 | 乳酸乳球菌霍氏 亚种 ALAL008 | 啤酒酵母 ALAY003 |
| B | 嗜酸乳杆菌 ALAL005 | 鼠李糖乳杆 菌 ALAL004 | 乳酸乳球菌霍氏 亚种 ALAL009 | 啤酒酵母 ALAY004 |
| C | 植物乳杆菌 ALAL006 | 干酪乳杆菌 ALAL002 | 嗜热链球菌 ALAL011 | 啤酒酵母 ALAY001 |
| D | 发酵乳杆菌 ALAL001 | 鼠李糖乳杆 菌 ALAL010 | 嗜热链球菌 ALAL012 | 啤酒酵母 ALAY002 |

对于各组，将分别含有 4 个菌株的预培养物接种到大豆的热水提
 5 取物中（各菌株分别为：乳酸菌-- $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6 / \text{ml}$ ；酵母--
 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5 / \text{ml}$ ）并在 $20 \sim 37^\circ\text{C}$ 下培养 5-10 天。

将各培养物和新鲜培养基混合并在 $20 \sim 37^\circ\text{C}$ 下继续培养 2~5
 10 天。培养后，将培养物加热消毒并冻干，每升产生 90 克的干产物。另
 一方面，将培养物过滤并将清液冻干，每升得到 40 克干产物。

在如此获得的组合物中，将从培养物本身得到的那些和从清液中
 得到的那些组合物分别命名为 RS-II 和 RS-I。

15 实施例 2：改善肝功能活性试验（对施用了胆汁酸的患肝病鼠的作用）

脱氧胆酸（下文称之为 DCA）是一种由肠细菌从胆酸产生的有代
 表性的次级胆汁酸。DCA 是高度有毒的，并且已知它是引起试验动物
 患胆汁郁积性肝病的原因。此外，据报道 DCA 还可能是导致急性胰腺
 20 炎和结肠癌的因素。

胆汁酸在血液和胆汁中的含量和组成可能随个体的饮食习惯和生理状态的不同而不同，例如，已知糖尿病患者和糖尿病试验动物模型的胆汁中的 DCA 量明显增高。此种效应对于活体而言是极其重要的。

5 因此，为了研究本发明组合物的对肝病的作用效果，用 DCA 来诱发肝病。

(1) 方法

10 从 Charles River 购进 5 周龄 Wistar 雄鼠，在空调良好的饲养室预饲养 1 周，室内温度控制在 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ，湿度为 $50 \pm 5\%$ ，光周期循环为 12 小时光照/12 小时暗。6 周龄时，将鼠分成两组，每组 6 只鼠，使各
15 组体重平均值和偏差彼此基本相同，一组给药本发明组合物，而另一组为对照组。给给药组饲喂含 0.5% DCA 和 5% RS-I 的 MF 粉状饲料（东方酵母有限公司），而给对照组饲喂仅含 0.5% DCA 的 MF 粉状
15 饲料。这些饲料与自来水一起由两组鼠自由采食 6 周。

20 从开始给药的第 0、2、4 和 6 周时，从尾部静脉取血并分离出血清。测量谷草转氨酶（GOT）、谷丙转氨酶（GPT）、血尿素氮（BUN）、尿酸（UA）和胆甾醇（CHL）的值。给药 5 周时，用代谢笼测尿量和
20 尿中的电解质浓度。给药后，杀死小鼠并进行解剖。称量器官重量并从采集的血液中分离出血清，分析该血清的生化性能。

(2) 结果

25 当输入 DCA 时，鼠的血清 GOT 活性迅速增加。在对照组中，第 2 周时该活性升至 1366 ± 467 (Karmen) 和如图 1A 所示的 5122 ± 1848 (Karmen)。相反，在 RS-I 给药组中，第 2 周时为 406 ± 88 (Karmen)。由此，GOT 活性的升高被显著地抑制 ($P < 0.05$)。即使
30 在第 4 周时，也仅有 1636 ± 630 (Karmen)，这表明 GOT 活性的升高趋于被抑制（图 1A）。另一方面，还可观察到血清 GPT 活性的升高如同 GOT 活性一样被抑制（图 1B）。

对于 BUN 值来说，RS-I 给药组在第 4 和 6 周时与对照组比较明显表现出较低的值 ($P < 0.01$) (图 2)。观察到 RS-I 给药对 UA 和 CHL 没有影响。

5

RS-I 给药组在第 5 周时倾向表现排泄出大量的尿 (图 3A) 并且对喝入的水量排泄的比例也较大 (图 3B)。

RS-I 给药组与对照组之间在尿中电解度浓度上没有区别。在对照组中，尿量更多些，因此排泄的电解质量也多些 (图 4)。

10

根据给药 DCA 后的血清生化分析，对于总蛋白质 (TP)、碱性磷酸酶 (ALP)、r-谷氨酰基肽基转移酶 (r-GPT)、亮氨酸氨肽酶 (LAP)、葡萄糖 (GLU)、总胆甾醇 (T-CHL)、类脂过氧化物 (LPO)、 β -脂蛋白 (β -LP) 和胆红素的数值没有观察到因给药 RS-I 而有变化。但是血清中总胆汁酸的浓度在对照组中为 81 ± 36 (nmol/ml) 而在 RS-I 给药组中为 46 ± 34 (nmol/ml)。因此，与对照组比较，RS-I 给药组血清中的总胆汁酸趋于显示低浓度。

15

显示出 RS-I 给药抑制由 DCA 的输入引起的血清 GOT 和 GPT 活性提高，因此证明 RS-I 对改善肝功能损伤是有用的。

20

此外，RS-I 给药降低了血清 BUN 值和增大了排泄的尿量。因此，发现 RS-I 具有改善肾功能损伤的活性。

25

实施例 3：对半乳糖胺肝病大鼠的作用

在本实施例中，研究 RS-I 给药对肝病的作用，此肝病具有不同于实施例 1 由 DCA 诱导模式的机理。

30

(1) 方法

由 Charles River 购得 5 周龄 Wistar 雄性大鼠，在空调良好的饲养室内预饲养 1 周，室内控制温度为 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ，湿度 $50 \pm 5\%$ ，光周期循环为 12 小时照明/12 小时暗。6 周龄时，把大鼠分成两组，每组 6 只，以使各组中的体重平均值和偏差基本上彼此相同，一组给药本发明的组合

5 物，而另一组为对照组。给给药组饲喂含 5% RS-I 的 MF 粉状饲料，而对照组饲喂 MF 粉状饲料。这些饲料与自来水一起由两组的大鼠自由采食 3 周。

在以 RS-I 饲料饲喂第 3 周时，腹膜内注射约 1ml 的 D-半乳糖胺盐酸盐水溶液，所述溶液事先已制备好，以使大鼠每 kg 体重给药 500mg 的 D-半乳糖胺盐酸盐。在半乳糖胺给药后第 1、2、3 和 6 天，从尾静脉取血并化验血清的 GOT、CHL、GLU 和 BUN 值。

10

(2) 结果

半乳糖胺给药后，大鼠血清 GOT 迅速升高。1 天时，对照组血清 GOT 值升至 5148 ± 1711 (Karmen) (图 5) 而 RS-I 给药组的血清 GOT 为 2244 ± 1241 (Karmen)。这样，由于半乳糖胺使 RS-I 给药显示出明显抑制 GOT 活性的上升 ($P < 0.05$) (图 5)。未观察到 RS-I 给药对血清 CHL、GLU 和 BUN 值有任何影响。

15

20

实施例 4：对 DMH 结肠癌变鼠的作用

在本例中，使用由二甲基肼 (DMH) 诱导的结肠癌变鼠完成下面有关本发明组合物抑制致癌作用的实验。

25 (1) 方法

使 CF#1 (其品系保留在物理与化学研究所内) 鼠交配，并饲养 60 只雄鼠。该品系小鼠对 DMH 特别敏感，尤其是能诱导结肠息肉。进行饲养的条件是温度为 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ，湿度为 $50 \pm 5\%$ 和光周期循环为 12 小时光照/12 小时黑暗。作为喂养的饲料，由东方酵母有限公司生产的专用饲料 (CMF) 与自来水一起自由地供应。

30

第5周时，按表3所列将鼠分成3组（每组20只），以便体重的平均值和误差相同（图6）。正如表3所示，三个组是由RS-II给药组、RS-I给药组和对照组组成，各组按所列的各自量给药。按每kg体重20mg给小鼠腹膜内注射DMH溶液，每周一次，共10周。给对照组只饲喂CMF。

表3

| 组 | 给药量（%） | 鼠数 |
|-------|--------|----|
| 对照组 | - | 20 |
| RS-II | 3 | 20 |
| RS-I | 5 | 20 |

10

在DMH给药后35周时(40周龄)观察所述三组小鼠的结肠息肉。

(2) 结果

对照组息肉发生率为94%而RS-II给药组为65%。这样，给药组与对照组相比，发生率显著降低（ $P<0.05$ ）（图7A）。然而，RS-I给药组显示的息肉发生率为94%，与观察到的对照组没有差别。

15

对照组每只小鼠息肉数为 4.0 ± 2.7 （平均值±标准偏差），而在RS-II给药组为 1.4 ± 1.5 ，显著（ $P<0.01$ ）低于对照组（图7B）。RS-I给药组显示息肉数为 2.7 ± 1.9 ，也显著（ $P<0.05$ ）低于对照组的数值（图7B）。

20

对照组肿块尺寸为 $3.1\pm 1.8\text{mm}$ ，RS-II给药组为 $2.5\pm 1.3\text{mm}$ 。RS-II给药组与对照组相比，显示出肿块尺寸显著（ $P<0.05$ ）地小（图7C）。

25

根据上述结果，可以认识到本发明的组合物具有抑制致癌作用。

实施例 5：由乳酸菌产生的物质的抗致突变试验

已知大多数具有致突变作用的物质都有致癌性。

- 5 由于实施例 4 的结果显示本发明的组合物能抑制结肠癌，所以提出本发明的组合物也具有抑制致突变的作用。

由此，研究本发明的组合物对下列致突变物质的作用。

10 (1) 实验方法

(i) 致突变物质

将 4-硝基喹啉-1-氧化物 (4NQO: 0.25 μ g/平板)、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG: 0.5 μ g/平板) 和 3-氨基-1-甲基-5H-吡啶并 (4,3-b) 吡啶乙酸酯 (Trp-P-2: 5 μ g/平板) 分别溶解于 DMSO 中。

15

Trp-P-2 是燃烧蛋白质或氨基酸如烧鱼时产生的物质。MNNG 是引起胃癌的一种物质。

(ii) 抗致突变试验

- 20 抗致突变试验是由 Ames 法完成的。所用试验细胞是鼠伤寒杆菌 (*Salmonella typhimurium*) 菌株 TA100 (his^+)。菌株 TA100 在营养肉汤中培养过夜并用 Na-K 缓冲液洗涤。将悬浮液中细胞的最终浓度调节到约 $2 \times 10^9/ml$ 。

- 25 把干燥的 RS-I 产品按各浓度溶解在灭菌水中。按顺序往试管中加 RS-I 溶液、100 μ l 致突变物质、0.5ml S9 混合物或 Na-K 缓冲液以及有待试验的 0.5ml 细菌溶液。于 37°C 下反应 30 分钟后，进行离心并弃去上清液。加入含组氨酸 (1 μ M) 和生物素 (1 μ M) 的软琼脂，再于葡萄糖琼脂基本培养基中接种。将其在 37°C 下培养并于 2 或 3 天后计数
- 30 菌落数。

(2) 结果

对于 4NQO, 在 0.06mg/平板的 RS-I 浓度下突变抑制作用为 64% ; 对于 MNNG, 在 0.25mg/平板的 RS-I 浓度下为 86%; 而对于 Trp-P-2, 在 0.5mg/平板的 RS-I 浓度下为 72%(图 8)。试验 DMH、苯并芘(BP)和 DCA 的浓度分别达到 20 μ g/平板、20 μ g/平板和 0.5 μ g/平板, 但通过这些物质未出现菌株 TA100 的致突变作用。因此, 未检测到 RS-I 的抑制率。

根据上述结果, 已发现本发明的组合物对 4NQO、MNNG 和 Trp-P-2 具有抗致突变活性作用。

实施例 6: 改进肠内微生物区系的活性

实施本例是为了检验由本发明组合物改进肠内菌丛的活性, 通过改进人肠内菌丛有助于增强人体的健康, 也就是说, 在抑制肠内有害细菌如大肠杆菌(*Escherichia coli*)生长的同时, 增加有益细菌包括双歧杆菌(*Bifi-dobacterium*)和乳杆菌的数量。

(1)实验方法

(i) 在液体培养基中的抗菌性能的研究

使用的培养基是含脑心浸液的培养基(Difco)和适于好氧细菌的 ABCM 培养基(Eiken)和 GAM 培养基(Nissui Seiyaku)或加入有半态-维生素 K₃ 的 GAM 培养基和适于厌氧细菌的 ABCM 培养基。把培养基分配到小试管中, 各 2ml, 以 1%(w/v)的浓度加入溶于相同培养基中的 RS-I。

25

将含指定预培养细胞的细胞溶液(表 4)稀释至最终浓度 1×10^5 /ml, 加到上述培养基中再于 37 $^{\circ}$ C 下培养 18-24 小时, 使用微量培养板读出器(Bio-Rad, 型号 3550)测量 655nm 下的吸收值, 再把如此测量的浊度表达成相对对照值(100)的相对值并表示生长率。

30

(2) 结果

正如从表 4 中的结果所见，显示本发明组合物在 1% 的浓度时促进有益菌如双歧杆菌和乳杆菌(表 4，上部)生长的活性。另一方面，还观察到了抑制有害菌如大肠杆菌和拟杆菌(Bacteroides)(表 4，下部)生长的活性。

5

表 4

| 菌株 | 生长率(%) |
|---|--------|
| 长双歧杆菌(<i>Bifidobacterium longum</i>) E1946 | 206 |
| 婴儿双歧杆菌(<i>Bifidobacterium infantis</i>) 12 | 187 |
| 双歧双歧杆菌(<i>Bifidobacterium bifidum</i>) 560 | 132 |
| 植物乳杆菌 JCM 1149 | 360 |
| 嗜酸乳杆菌(<i>Bactobacillus acidophilus</i>)I-65 | 118 |
| 路氏乳杆菌(<i>Bactobacillus reuteri</i>) JCM 1112 | 302 |
| 大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)123 | 58 |
| 金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)JCM 2413 | 31 |
| 酿脓链球菌(<i>Streptococcus pyogenes</i>) JCM 5674 | 53 |
| 鼠伤寒杆菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)TA98 | 44 |
| 变异链球菌(<i>Streptococcus mutans</i>) JCM 5705 | 49 |
| 产气荚膜梭菌(<i>Clostridium perfringens</i>) JCM 3816 | 72 |
| 凝固拟杆菌(<i>Bacteroides coagulans</i>) ATCC 29798 | 38 |
| 牙龈卟啉单胞菌(<i>Porphyromonas gingivalis</i>) 381 | 53 |

本文引证的全部出版物，专利和专利说明书在此以其整体引入作为参考。

10

工业用途

根据本发明，提供了乳酸菌混有酵母的组合物或未处理或处理的培养物以及含所述组合物的功能性食品。由此，能期望本发明的组合物可促进人肠内有益细菌如双歧杆菌和乳杆菌的生长并且抑制有害细菌如大肠杆菌的生长，因此对促进人体的健康能作出贡献。

15

图 1A 血清 GOT (Karmen)

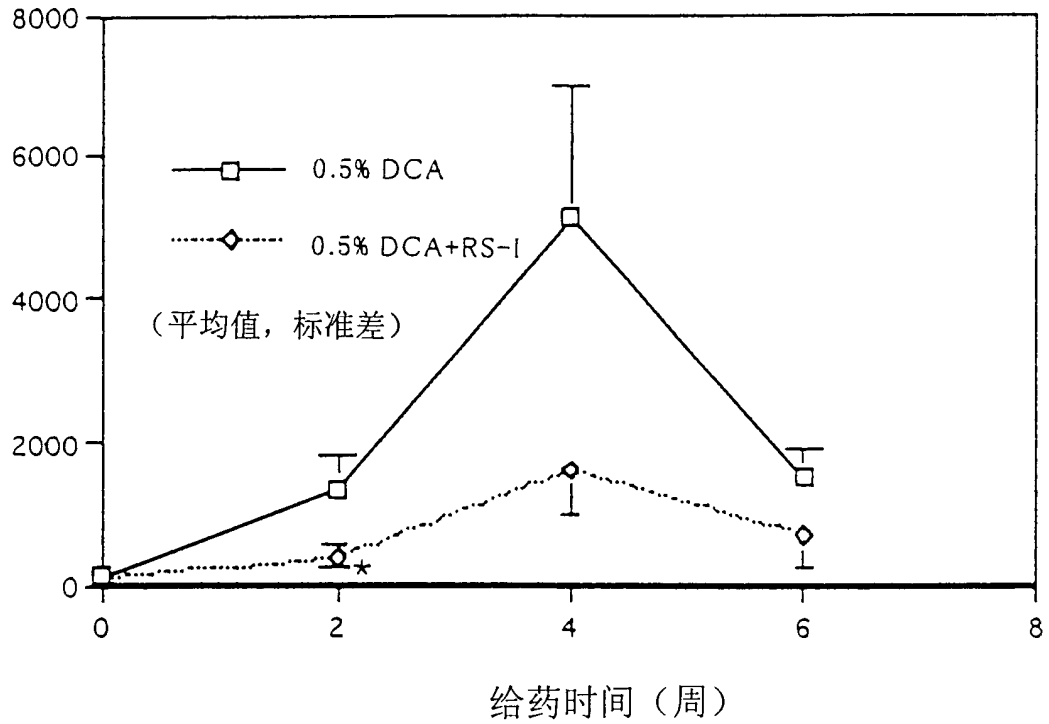
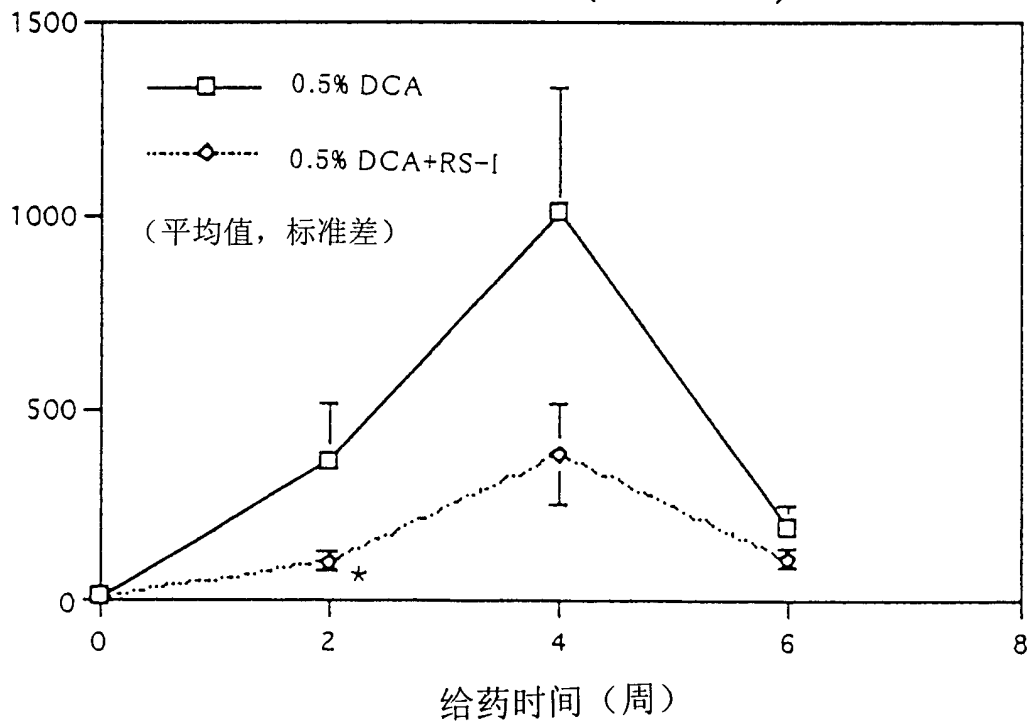


图 1B 血清 GPT (Karmen)



* : p < 0.05

图 2

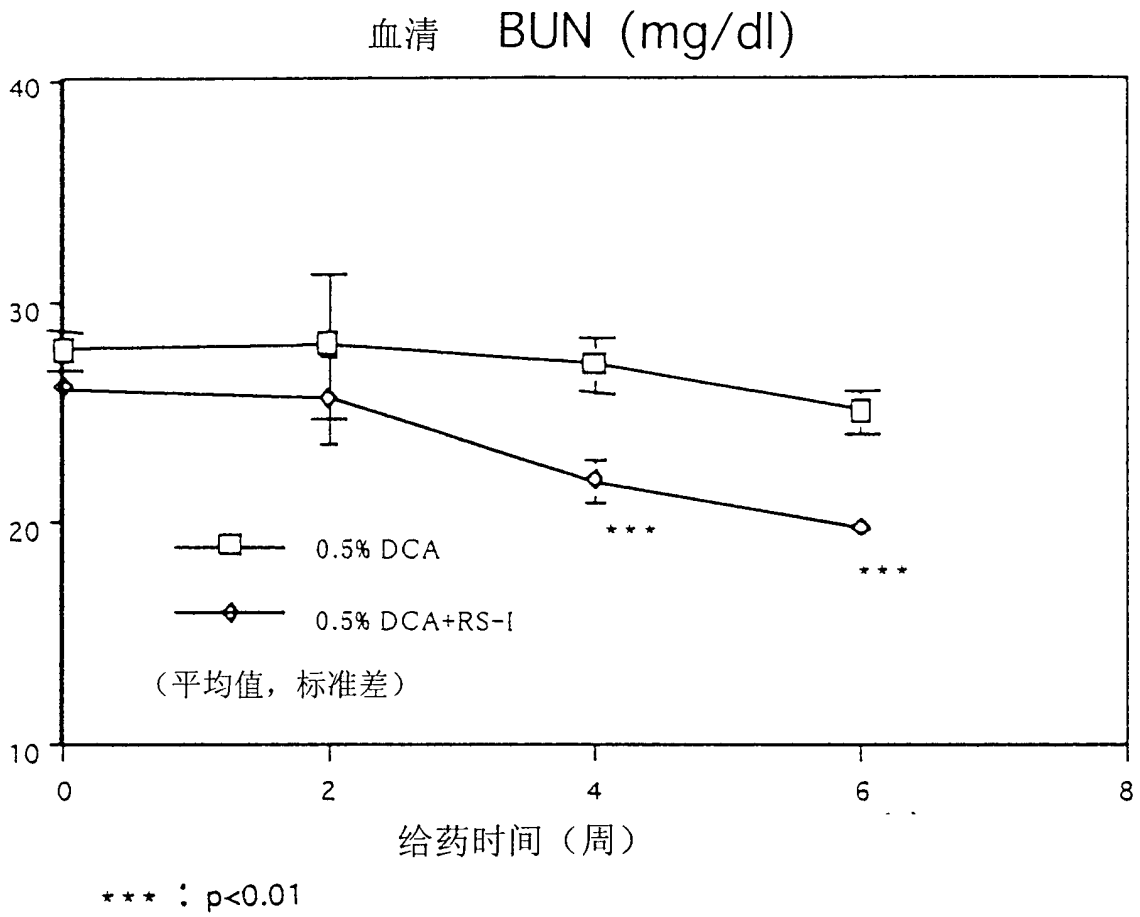


图 3A

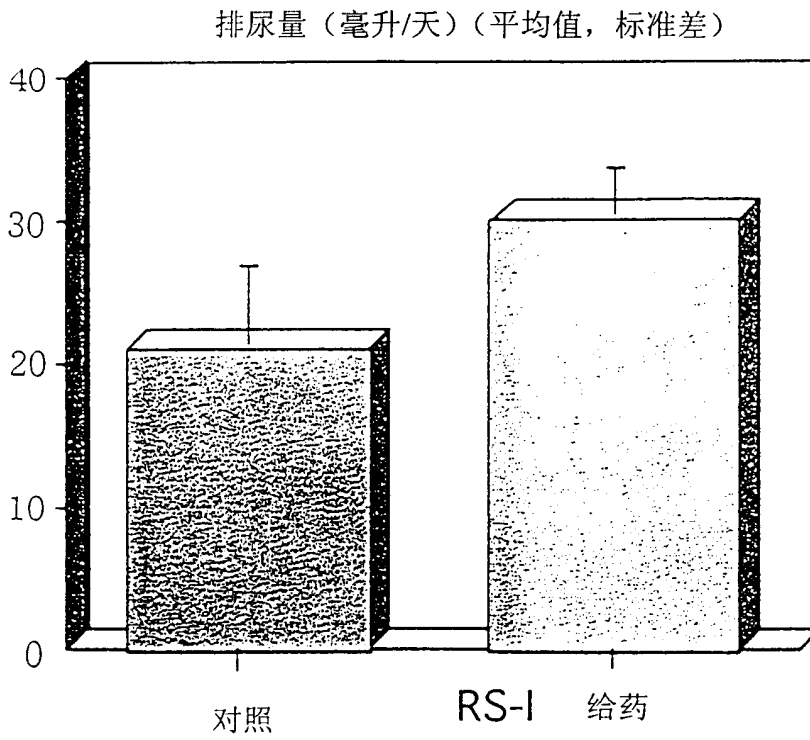


图 3B

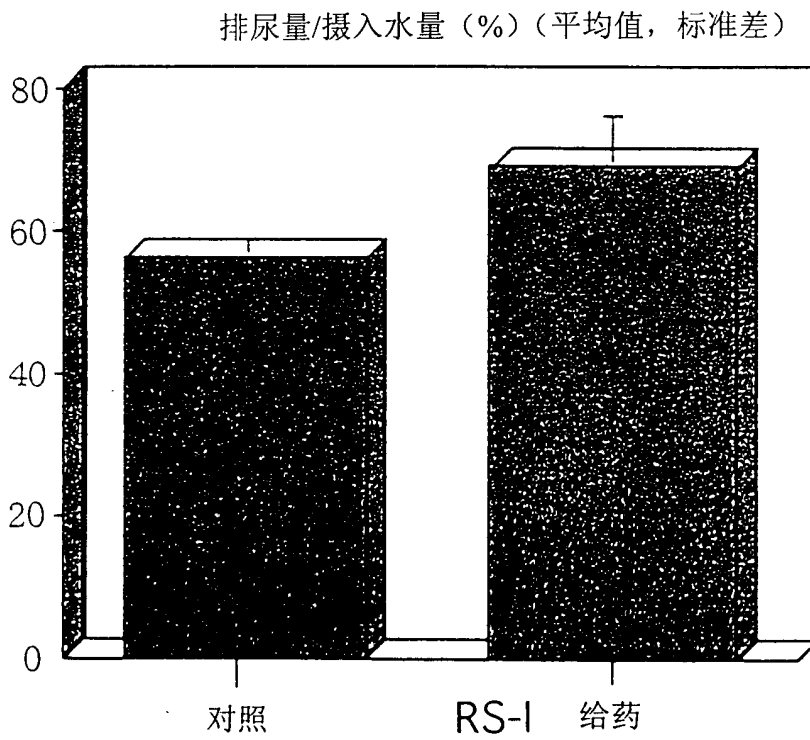


图 4

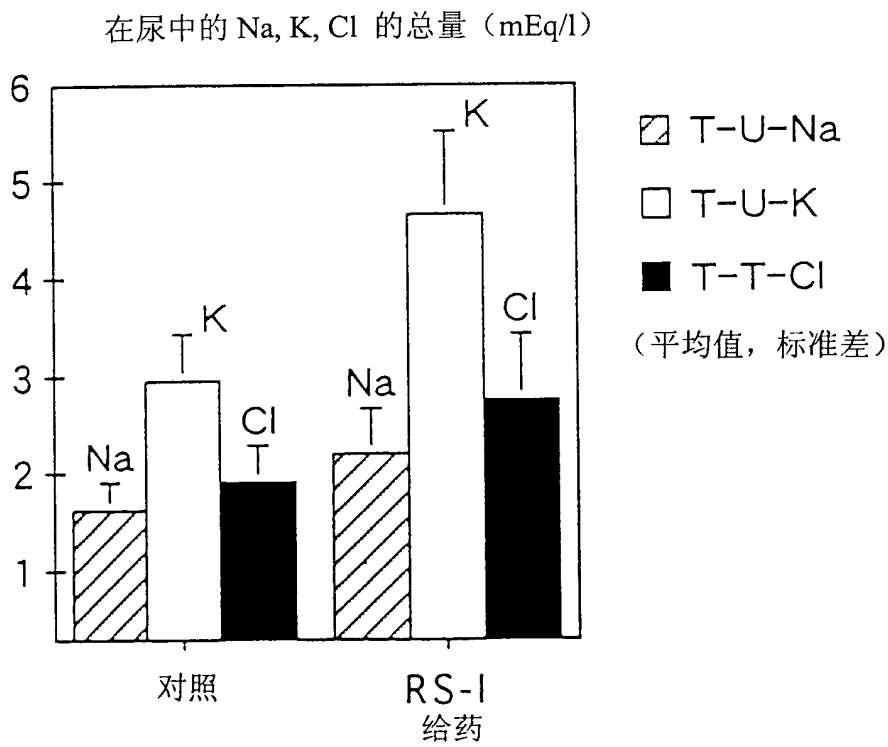
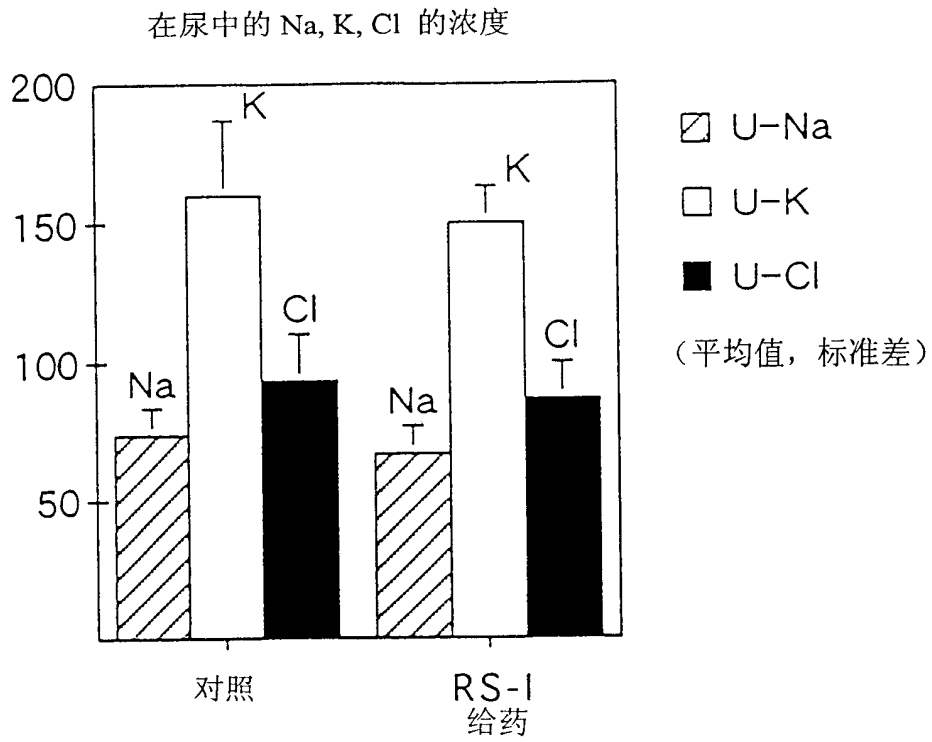
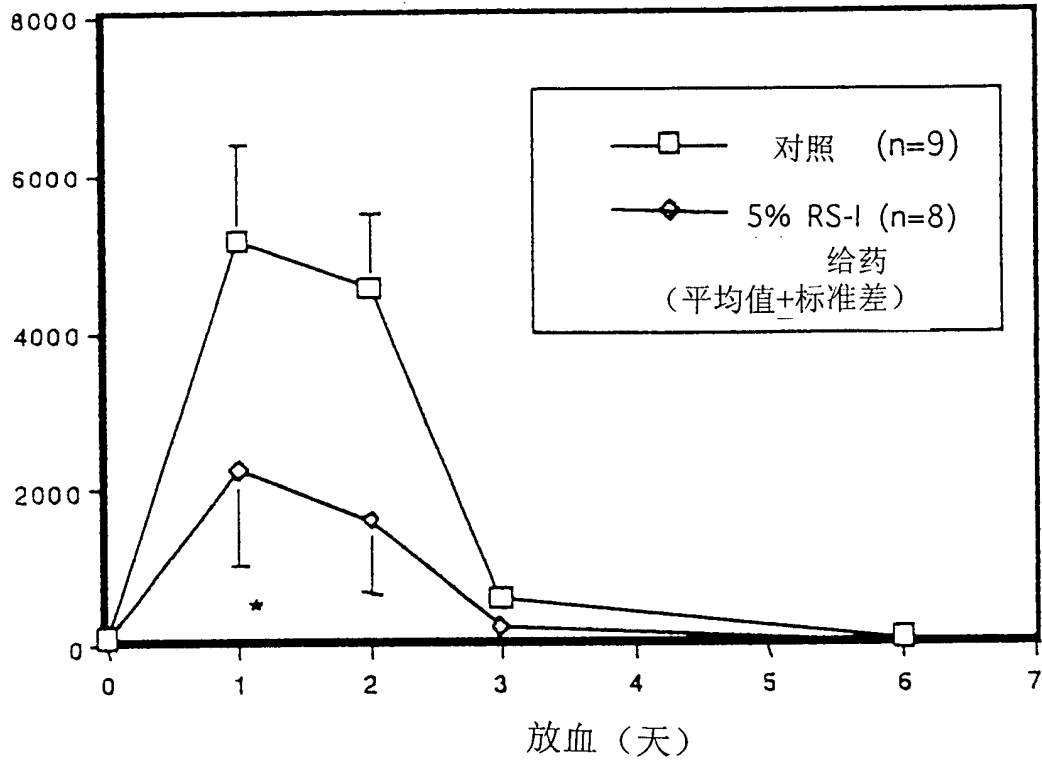


图 5

血清 GOT (Karmen)



* : $p < 0.05$ (Mann-Whitey's U-检验)

图 6

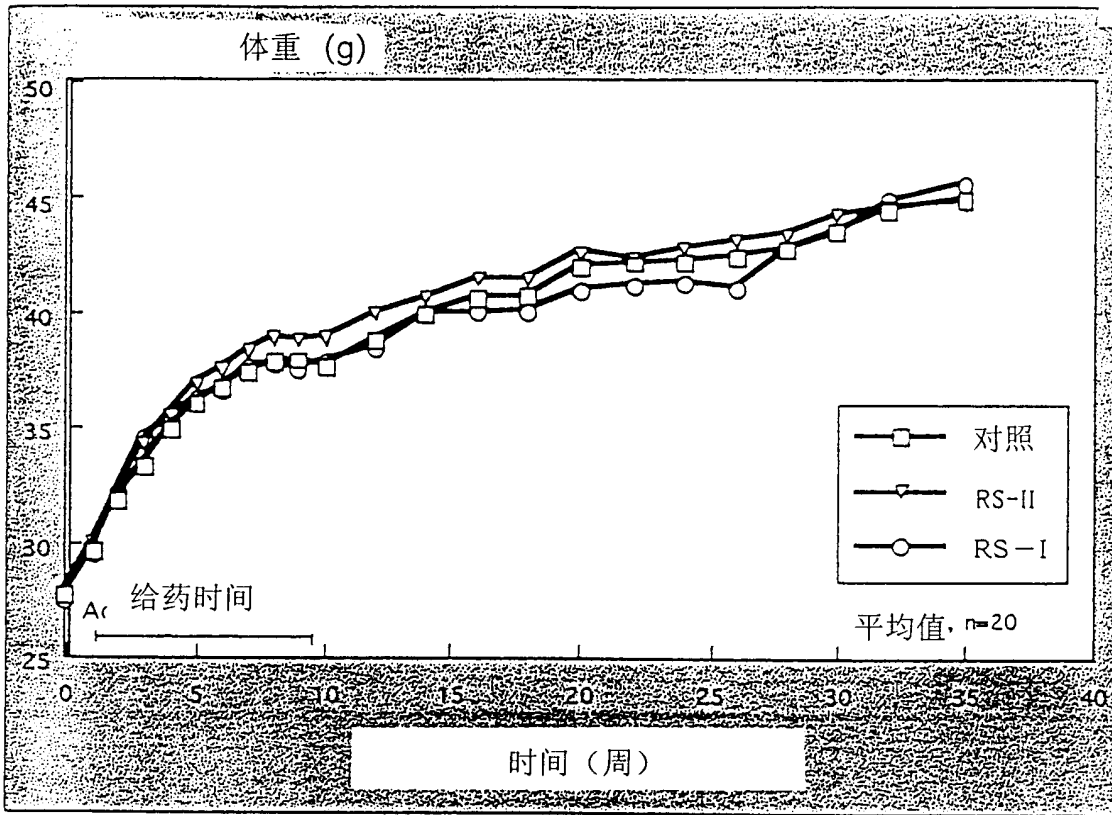


图 7A

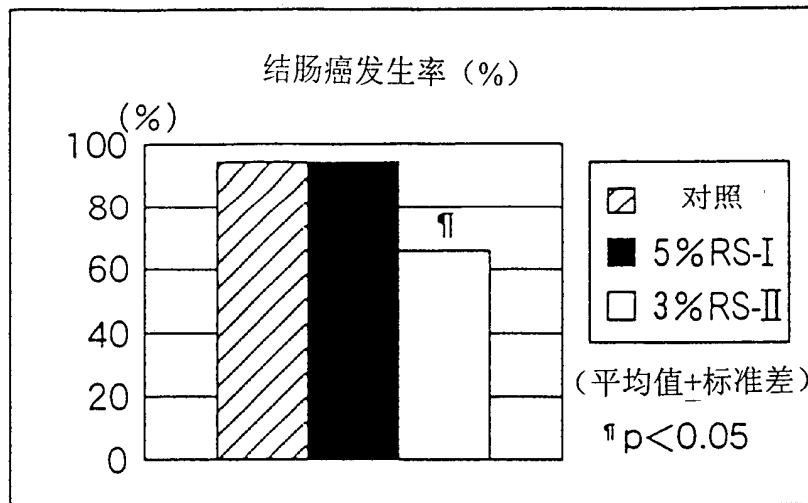


图 7B

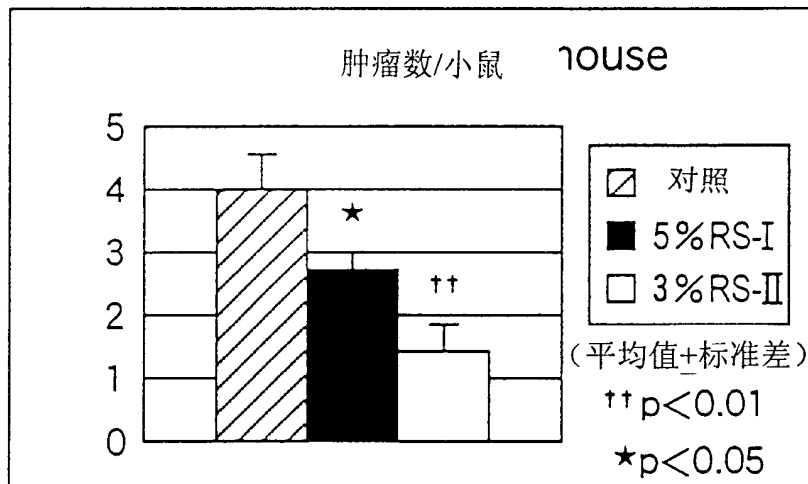
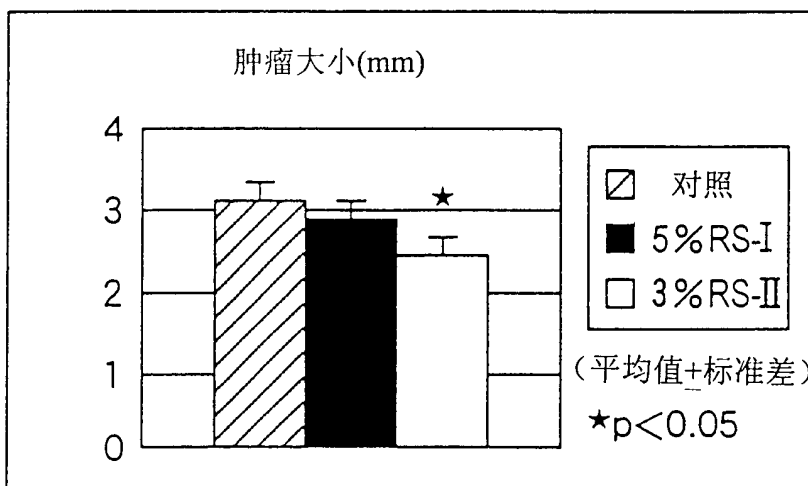


图 7C

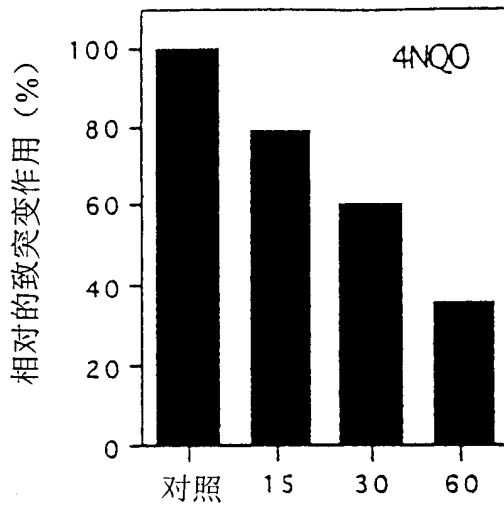


‡: p < 0.01 (U-检验, t-检验)

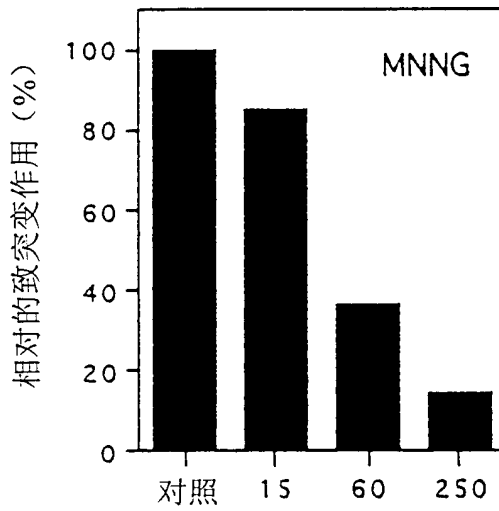
★: p < 0.05 (t-检验)

‡: p < 0.05 (χ² 检验)

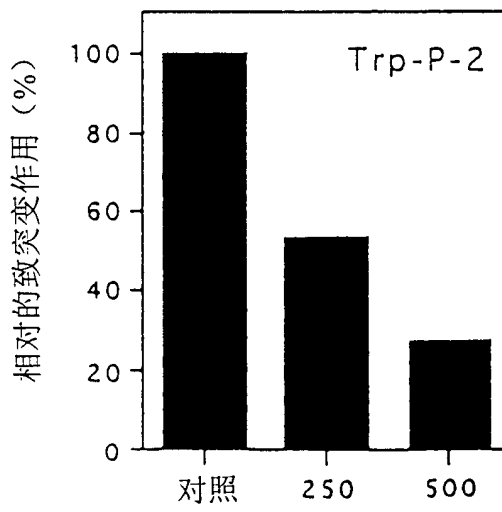
图 8



RS-I 浓度 (微克/管)



RS-I 浓度 (微克/管)



RS-I 浓度 (微克/管)