



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I401086B1

(45)公告日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 11 日

(21)申請案號：099123851

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 20 日

(51)Int. Cl. : *A61K35/74 (2006.01)* *A23L1/30 (2006.01)*
A61P13/02 (2006.01)(71)申請人：中國醫藥大學(中華民國) CHINA MEDICAL UNIVERSITY (TW)
臺中市北區學士路 91 號

(72)發明人：林文鑫 LIN, WEN HSIN (TW)

(74)代理人：陳翠華

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 910472 2010 年 04 月 30 日

(56)參考文獻：

TW 201016847

KR 2003-0077895

審查人員：黃教威

申請專利範圍項數：12 項 圖式數：1 共 0 頁

(54)名稱

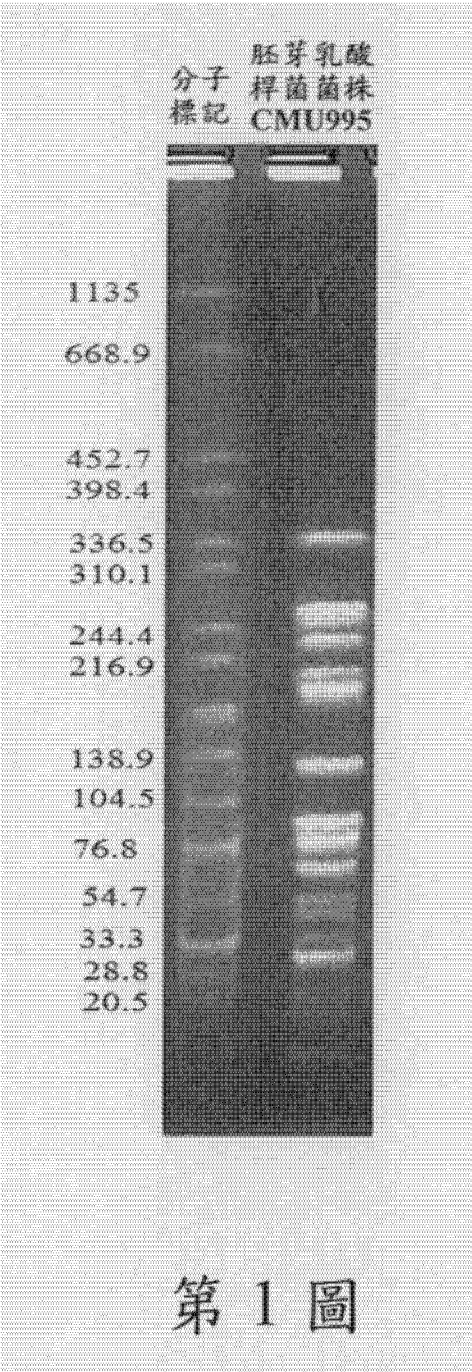
胚芽乳酸桿菌及其用途

LACTOBACILLUS PLANTARUM AND USES THEREOF

(57)摘要

一種經分離之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995，其係寄存於財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC 910472，及寄存於德國國家菌種保藏中心，寄存編號為 DSM 23780。一種包含胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 之組合物，及胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 於製造抑制病原菌、保護腸胃道、及預防或治療泌尿道感染之藥物或保健食品的用途。

An isolated *Lactobacillus plantarum* CMU995, which was deposited in the Food Industry Research and Development Institute with the accession number BCRC 910472 and German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ) with the accession number DSM 23780, is provided. Also provided are a composition comprising *Lactobacillus plantarum* CMU995 and uses of *Lactobacillus plantarum* CMU995. This strain is manufactured as a medicament or health food for inhibiting pathogens, protecting the gastrointestinal tract, and preventing or treating the infection of the urinary tract.



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99/12385/

A61K 35/74 (2006.01)

※申請日：99.7.20.

※IPC 分類：

A23L 1/30 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 13/02 (2006.01)

胚芽乳酸桿菌及其用途 / LACTOBACILLUS PLANTARUM AND
USES THEREOF

二、中文發明摘要：

一種經分離之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995，其係寄存於財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC 910472，及寄存於德國國家菌種保藏中心，寄存編號為 DSM 23780。一種包含胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 之組合物，及胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 於製造抑制病原菌、保護腸胃道、及預防或治療泌尿道感染之藥物或保健食品的用途。

三、英文發明摘要：

An isolated *Lactobacillus plantarum* CMU995, which was deposited in the Food Industry Research and Development Institute with the accession number BCRC 910472 and German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ) with the accession number DSM 23780, is provided. Also provided are a composition comprising *Lactobacillus plantarum* CMU995 and uses of *Lactobacillus plantarum* CMU995. This strain is manufactured as a medicament or health food for inhibiting pathogens, protecting

the gastrointestinal tract, and preventing or treating the infection of
the urinary tract.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：(無)。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：
(無)。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於乳酸桿菌菌株及其用途，尤其關於經分離之胚芽乳酸桿菌菌株 (*Lactobacillus plantarum*) CMU995 及其用途。

【先前技術】

乳酸桿菌為存在於人類和動物腸道中的主要細菌，由於其具有許多有益於人體及動物體的生理活性，故常應用於各種益生菌 (probiotic) 產品中。舉例言之，乳酸桿菌可抑制腸內病原菌 (例如沙門氏菌或大腸桿菌) 之生長，或抵抗病原菌之入侵，例如可防止沙門氏菌屬之傷寒桿菌 (*Salmonella typhimurium*) 侵入腸胃道上皮細胞。

目前已有許多乳酸桿菌於抑制病原菌之應用的相關專利，例如美國專利第 5,603,930 號中所揭露之約氏乳酸桿菌菌株 (*Lactobacillus johnsonii*)，可抑制腸毒素及腸侵入性病原菌；美國專利第 3,953,609 號中所揭露之雷特氏乳酸桿菌菌株 (*Lactobacillus lactis*)，可抑制消化系統中大腸桿菌之生長；以及美國專利第 6,491,956 號中所揭露之嗜酸乳酸桿菌菌株 (*Lactobacillus acidophilus*)，可預防及治療由幽門螺旋桿菌感染所造成的胃炎、十二指腸潰瘍及胃潰瘍。

乳酸桿菌若欲於動物體內有效地發揮功能，除須具備基本之生理/藥理活性外，尚須具有兩個重要特性。首先，該乳酸桿菌須對動物腸胃道所分泌之胃酸和膽鹼具有耐受性，始可存活於消化系統中而到達腸道，進而發揮作用。再者，該乳酸桿菌對動物宿主

之腸道上皮細胞須有牢固的吸附能力，始可於腸胃道中與病原菌競爭吸附，免於因遭病原菌排除，而無法發揮功能。此外，由於病原菌亦係藉由吸附腸道上皮細胞之方式來感染動物體，若乳酸桿菌對腸道上皮細胞具有相對牢固的吸附能力，亦可達到排除病原菌，保護腸胃道免受感染之效果。

本案發明人自新生兒的糞便中，篩選出一種新穎胚芽乳酸桿菌菌株，且經由活體內 (*in vivo*) 及活體外 (*in vitro*) 之相關實驗，發現其除具有抑制病原菌之功效外，尚具有優異之腸胃道及泌尿道細胞之附著性，故可持久且有效地保護腸胃道及泌尿道免受病原菌之感染。另發現，該菌株甚至可以直接抑制病原菌生長，積極預防及治療由該病原菌所致之疾病。

【發明內容】

本發明之一目的在於提供一種經分離之胚芽乳酸桿菌菌株 (*Lactobacillus plantarum*) CMU995，其寄存於財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC 910472，及寄存於德國國家菌種保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)，寄存編號為 DSM 23780。

本發明之另一目的在於提供一種組合物，其包含胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995。

本發明之又一目的在於使用胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 於製成抑制病原菌、保護腸胃道、及預防或治療泌尿道感染之藥物或保健食品等用途。

本發明之技術及較佳實施態樣，將描述於以下內容中，以供本發明所屬領域具通常知識者據以明瞭本發明之特徵。

【實施方式】

本案發明人自健康新生兒的糞便中，篩選並分離出一種新穎之乳酸桿菌菌株，經菌種鑑定為 *Lactobacillus plantarum*（中文名稱為胚芽乳酸桿菌或植物乳酸桿菌），且經命名為 *Lactobacillus plantarum* CMU995（以下稱為胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995）。

如上所述，乳酸桿菌對動物宿主之腸道上皮細胞須有牢固之附著能力，始可於腸胃道中與病原菌競爭吸附，進而排除病原菌，以達成所欲之生理效果。經發現，胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 可附著於腸胃道之上皮細胞，且相較於市面上常見之 *Lactobacillus rhamnosus* GG（LGG）乳酸菌，對腸胃道上皮細胞具有更強之吸附力。

胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 除可附著於腸胃道之上皮細胞外，亦可牢固地附著於泌尿道之上皮細胞，故可於泌尿道中與病原菌競爭吸附，進而排除病原菌，以達成保護泌尿道之功效。

由於胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 對腸胃道及泌尿道具良好附著性，其可用於預防或治療病原菌之感染。就預防之應用而言，可將胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 添加於如飼料、飲料、營養補充品、或保健食品中，使此菌株附著及保護食用者之腸胃道或泌尿道，而當病原菌入侵腸胃道或泌尿道時，由於無法與胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 競爭吸附，遂無法啟動感染機制，而進一步被排出體外。就治療應用方面，當人體或動物體之腸胃道或泌尿道遭病原菌感染時，舉例言之，可服用包含胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 之藥物，透過胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 對腸胃道及泌尿道之吸附特性，排除附著於腸胃道或泌尿道內之病原菌，達成治療效果。

因此，胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 可藉由其強烈吸附力來抑制病原菌對腸胃道或泌尿道細胞之附著，進而預防或治療病原菌之感染。

胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 除可拮抗病原菌對腸胃道或泌尿道之吸附，間接地抑制感染外，尚可直接地抑制病原菌之生長，經由此二種抑制機制之加乘作用來保護腸胃道及/或泌尿道。因此，於本文中，『抑制病原菌』乙詞，係包含抑制病原菌對腸胃道之附著、抑制病原菌對泌尿道之附著、以及抑制病原菌之生長。

胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 可用於抑制腸胃道及/或泌尿道中之各式病原菌；舉例言之，可抑制選自以下群組之病原菌：幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*)、空腸彎曲桿菌 (*Campylobacter jejuni*)、沙門氏菌屬 (*Salmonella* spp.)、大腸桿菌屬 (*Escherichia* spp.)、金黃色葡萄球菌屬 (*Staphylococcus* spp.)、志賀氏桿菌 (*Shigella flexneri*)、產氣莢膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、白色念珠球菌 (*Candida albicans*)、及前述之組合，尤其是用於抑制幽門螺旋桿菌。

幽門螺旋桿菌為革蘭氏陰性、微須氧之致病菌，可生存於胃部及十二指腸的各區域內。幽門螺旋桿菌的傳染途徑迄今仍不明確，其會引起胃黏膜的慢性發炎，造成胃潰瘍及十二指腸潰瘍，甚至導致胃癌，因此，世界衛生組織宣佈幽門螺旋桿菌為微生物型的致癌物質，也是第一個被發現可致癌的原核生物。全世界有超過五成的人口為幽門螺旋桿菌之帶原者，尤其於發展中國家更為盛行。目前主要係使用抗生素來治療由幽門螺旋桿菌所引起的疾病，然而，由於其抗藥性之產生，許多抗生素已無法達到令人

滿意的治療效果。由於胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 可明顯地抑制幽門螺旋桿菌之生長及其對腸道上皮細胞之附著，故可用於結合、甚或取代傳統之抗生素治療方法，以有效地預防或治療由幽門螺旋桿菌所引起的各種疾病。

此外，由於胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 可直接抑制病原菌之生長，故可運用於預防及治療由病原菌所引起之疾病，而不限於腸胃道相關疾病。舉例言之，已知金黃色葡萄球菌屬除可感染腸胃道外，亦可感染如呼吸道、尿道、靜脈及傷口等部位，故可利用胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 抑制金黃色葡萄球菌屬生長的特性，將其應用於上述感染部位之治療或感染預防。另一方面，白色念珠球菌除可感染腸胃道外，亦可感染如口腔及泌尿道之黏膜組織，故亦可利用胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 抑制白色念珠球菌生長的特性，將其應用於經感染之口腔或泌尿道之治療或感染預防。

由於胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 之抑制病原菌生長及附著的特性，其可廣泛地運用於各種醫療及保健產品中。因此，本發明亦提供一種組合物，其包含胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995。基於胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 之上述特性，本發明之組合物可用於抑制病原菌、保護腸胃道、保護泌尿道、或前述之組合。

本發明組合物可呈任何形式，舉例言之，其可呈一選自以下群組之形式：醫藥組合物、飼料、飲料、營養補充品、噴劑、食品、保健食品、乳製品及塞劑。於本發明之一實施態樣中，胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 可添加於食品中，例如製成包含此菌株之乳製品等。有關乳酸桿菌於醫藥組合物及食品之應用，可參考如台灣

專利公開第 200708622 號及台灣專利公開第 200611973 號，該文獻全文併於此處，以供參考。

可視需要於本發明組合物中添加任何適宜之添加物，進一步加強抑制病原菌生長及附著之效果，或者，添加其他營養或藥性成分，以增加組合物之運用靈活性與調配度。舉例言之，本發明組合物可另含有一或多種如制酸劑及其他益生菌等其他活性成分，只要該活性成分對胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 之效益沒有不利的影響即可。

本發明亦提供一種胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 於製造藥物或保健食品的用途，例如，其可用以製備成具任何合宜形式之用於抑制病原菌、保護腸胃道、及預防或治療泌尿道感染之藥物或保健食品。

茲以下列具體實施態樣以進一步例示說明本發明。其中該些實施態樣僅提供作為說明，而非用以限制本發明之範疇。

[實施例 1] 附著力分析

實驗 A、製備乳酸桿菌菌株

進行腸胃道細胞之附著力分析所使用之乳酸桿菌菌株包括：本發明之 *Lactobacillus plantarum* CMU995、*Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG，鼠李糖乳酸桿菌) 及本實驗室分離之 B7P3、A7G1、B1T4、IA5、HT5 菌株。以 MRS 培養液 (Difco，底特律，密西根州，美國) 活化所有受試乳酸桿菌兩次後，分別將其接種至 5 毫升之 MRS 培養液中進行培養。24 小時後，取 1 毫升菌液，並以 6000 轉/分鐘離心 10 分鐘，以 pH 7.2 之磷酸鹽緩衝溶液 (PBS，

phosphate buffer solution) 清洗兩次，再進行吸附試驗。以 *Lactobacillus rhamnosus* GG 作為對照組。

實驗 B、培養腸胃道/泌尿道之細胞株

本試驗使用之腸胃道細胞株為 Caco-2 人體腸癌細胞株 (human colon adenocarcinoma, 寄存編號: ATCC CRL 2102) 及 AGS 胃癌細胞株 (gastric adenocarcinoma, 寄存編號: ATCC CRL 1739); 使用之泌尿道細胞株為 Hela 人類子宮頸上皮細胞 (寄存編號: ATCC CCL-2), 皆購自台灣生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC), 且已通過細菌、黴菌及黴漿菌 (mycoplasma) 污染測試。取得細胞株後, 迅速將其移至 37°C 之恆溫水浴槽中使其回溫解凍, 並培養於 25 平方公分之培養皿中, 再靜置於 37°C、含有 5 體積%二氧化碳之細胞培養箱中進行培養。細胞活化後繼代數次, 待細胞株穩定後才進行後續實驗。Caco-2 細胞之培養基為 Dulbecco's Modified Eagle 培養基 (DMEM, 購自 Gibco 公司), AGS 細胞之培養基為 F-12 培養基 (購自 Gibco 公司), Hela 細胞之培養基為最低基礎培養基 (Minimum essential medium, MEM, 購自 Gibco 公司), 以上培養基皆須添加 10 體積%之胎小牛血清 (fetal bovine serum, FBS)。

實驗 C、乳酸桿菌附著性分析

將實驗 B 中製備之細胞株分別以 1 毫升之 0.05 體積%胰蛋白酶 (trypsin) 處理 5 分鐘後, 將其分裝於一 96 孔培養盤中, 每個孔中加入 1×10^4 個細胞, 每天置換 200 微升之新鮮培養基。接著, 添加 20 微升之實驗 A 中製備之乳酸桿菌菌液於細胞中, 並培養 1 小時, 使乳酸桿菌附著於細胞上。進行附著 1 小時後, 移除培養

基，使用磷酸鹽緩衝溶液清洗五次，以去除未附著之乳酸菌，再添加 100 微升之 10 體積%福馬林，以固定細胞及乳酸桿菌。30 分鐘後，再以磷酸鹽緩衝溶液清洗細胞 3 次，最後以 100 微升結晶紫 (crystal violet) 進行染色達 5 分鐘，並以少量 75 體積%酒精快速沖洗，以去除細胞上的染色劑。

利用相位差顯微鏡觀察各種乳酸桿菌對腸胃道或泌尿道上皮細胞的吸附性，並隨機在不同的顯微鏡視野 (randomized microscopic areas) 下，觀察並計算 50 個細胞的乳酸桿菌吸附情形，以及計算每個細胞之平均吸附乳酸桿菌數量。結果係如表 1 所示。

表 1

	乳酸桿菌附著數(菌落形成單位/細胞)(CFU/cell)		
菌株	Caco-2	AGS	Hela
CMU995	>30	>30	27± 2.3
LGG	7.5 ± 1.5	4.4± 0.8	5.1± 1.2
B7P3	>30	25.8± 2.4	26± 3.1
A7G1	>30	>30	22.5± 2.4
B1T4	18.4± 3.9	15.2± 2.3	16.7± 3.1
IA5	16.7± 2.6	18.9 ± 2.8	18.4± 4.0
HT5	17.4± 1.2	19.0 ± 0.8	15.4± 2.3
其他菌株 (約 3000 株)	<10	<10	<10

由表 1 結果可知，相較於其他已知乳酸桿菌 (包括國際知名且市面上常用之 *Lactobacillus rhamnosus* GG)，胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 具有更優異之腸胃道及泌尿道細胞之附著性，故可對腸胃道及泌尿道提供更持久的保護。

[實施例 2] 抑制病原菌生長試驗

實驗 D、細菌培養皿試驗

利用洞擴散法 (well-diffusion method) 進行乳酸桿菌之抑菌能力評估。將無菌之 Brucella 洋菜培養基 (Difco, 底特律, 密西根州, 美國) 倒入一細菌培養皿中, 使其凝固, 再將經隔夜培養之指標性腸胃道致病菌幽門螺旋桿菌 *Helicobacter pylori* (寄存編號: BCRC 17021) 及臨床分離之 *Helicobacter pylori* CMU83 均勻塗佈於洋菜培養基上, 待菌液稍微乾燥後, 在培養基上打出直徑為 7 毫米之孔洞, 並於孔洞中添加 70 微升之於實驗 A 中, 以 MRS 培養液培養 24 小時之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 的菌液。此外, 亦以相同方法對其他腸胃道致病菌進行分析, 包括空腸彎曲桿菌 (*Campylobacter jejuni* CMU20)、大腸桿菌、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、沙門氏菌 (*Salmonella* spp.)、志賀氏桿菌 (*Shigella flexneri*)、產氣莢膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 及白色念珠球菌 (*Candida albicans*)。重複分析每個樣品三次, 再將培養基置於一細菌培養箱中, 並於 16 至 18 小時後測量抑菌圈直徑。於此, 以 *Lactobacillus rhamnosus* GG 之發酵液作為正對照組, 以 pH6.3 之 MRS 培養液作為負控制組 (negative control)。結果係如表 2 所示。

表 2

致病菌	抑菌圈直徑(毫米)		
	CMU995	LGG	MRS 培養液
幽門螺旋桿菌 (<i>Helicobacter pylori</i> BCRC 17021)	10.7±0.5	10.3±0.5	—
幽門螺旋桿菌	9.0±0.0	9.0±0.5	—

(<i>Helicobacter pylori</i> CMU83)			
空腸彎曲桿菌 (<i>Campylobacter jejuni</i> CMU20)	9.7±0.5	9.0±0.0	—
腸毒素型大腸桿菌 (enterotoxigenic <i>E. coli</i> ; ETEC)	11.7±0.5	11.3±0.5	—
腸侵襲性大腸桿菌 (enteroinvasive <i>E. coli</i> ; EIEC)	13.0±0.0	12.3±0.5	—
腸病原性型大腸桿菌 (enteropathogenic <i>E. coli</i> ; EPEC)	12.3±0.5	12.3±0.5	—
腸內附著性大腸桿菌 (enteroadherent aggregative <i>E. coli</i> ; EAggEC)	12.0±0.8	11.7±0.5	—
金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	11.3±0.5	11.0±0.0	—
沙門氏菌 (<i>Salmonella enteritidis</i>)	13.0±0.0	12.7±0.5	—
沙門氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	13.0±0.8	12.3±0.5	—
志賀氏桿菌 (<i>Shigella flexneri</i>)	11.3±0.5	10.7±0.5	—
產氣莢膜梭菌 (<i>Clostridium perfringens</i>)	11.7±0.5	11.3±0.5	—
白色念珠球菌 (<i>Candida albicans</i>)	8.3±0.5	8.3±0.5	—

“—”表示無抑菌現象。

表 2 結果顯示，相較於 *Lactobacillus rhamnosus* GG，本發明之胚芽
乳酸桿菌菌株 CMU995 具有更優異之抑制致病菌生長之功效，故
其可用於預防及治療由病原菌所引起之疾病，例如用於保護腸胃
道免受病原菌之感染。

[實施例 3] 抑制病原菌感染及附著試驗

將 1 毫升之密度為 5×10^4 個細胞/毫升的 Caco-2 細胞、AGS 細胞

及 Hela 細胞分別培養於一 24 孔細胞培養盤中，並置於一 37°C、含有 5 體積%二氧化碳/95 體積%空氣之細胞培養箱中培養 2 天，再進行以下二種模式之試驗。

實驗 E、預防保護模式

取 100 微升之於實驗 A 中經培養 24 小時之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 的發酵液，加入至已培養 2 天的 Caco-2 細胞、AGS 細胞或 Hela 細胞中，混合均勻後，將細胞放入細胞培養箱中培養 0.5 小時。接著，以無菌生理食鹽水清洗細胞，以移除未附著之乳酸桿菌，再添加 1 毫升含有 1×10^7 菌落形成單位/毫升 (CFU/ml) 之幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori* CMU83)、腸內附著性大腸桿菌 (*enteroadherent aggregative E. coli*, EAggEC) 或沙門氏菌 (*Salmonella enteritidis*) 至細胞中，混合均勻後，將細胞放入細胞培養箱中培養 1 小時，使致病菌感染細胞。然後，移除培養基，以無菌生理食鹽水清洗細胞，以去除未感染細胞之致病菌，再加入 1 毫升的 0.1 體積% Triton-X-100 (Sigma, Louis, 密蘇里州, 美國)，使細胞破裂而釋放出感染之致病菌。最後，吸取細胞破碎液並置於 9 毫升之磷酸鹽緩衝溶液中，經適當稀釋後，以傾注平板計數法計算菌數。於此，以不加乳酸桿菌者為控制組，將計算結果帶入下列公式，計算胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 之感染抑制率。結果如表 3 所示。

感染抑制率 = (控制組之致病菌數 - 添加乳酸桿菌組之致病菌數) / 控制組之致病菌數 $\times 100\%$

實驗 F、治療排除模式

培養 Caco-2 細胞、AGS 細胞或 Hela 細胞 2 天後，分別添加 1 毫升之含有 1×10^7 菌落形成單位 / 毫升之幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori* CMU83)、腸內附著性大腸桿菌 (*enteroadherent aggregative E. coli*, EAggEC) 或沙門氏菌 (*Salmonella enteritidis*) 至細胞中，培養 0.5 小時使致病菌感染細胞。接著，以無菌生理食鹽水清洗細胞，以去除未侵入細胞之致病菌，再加入 100 微升之於實驗 A 中經培養 24 小時之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 的發酵液，培養 1 小時，使乳酸桿菌進行排除致病菌之作用。最後，再以無菌生理食鹽水清洗細胞，以移除未附著之乳酸桿菌與經排除之致病菌，再加入 1 毫升 0.1 體積 % Triton-X-100，使細胞破裂而釋放出感染之致病菌。細胞破碎液經適當稀釋後，以傾注平板計數法計算菌數。於此，以不加乳酸桿菌者為控制組，將計算結果帶入上述公式，計算乳酸桿菌之感染抑制率。結果如表 4 所示。

表 3、預防保護模式之感染抑制率(%)

	Caco-2	AGS	Hela
<i>Helicobacter pylori</i> CMU83	21.74	20.53	ND
EAggEC	86.35	ND	87.50
<i>Salmonella enteritidis</i>	85.10	ND	78.24

“ND”表示未進行該細胞之測試。

表 4、治療排除模式之感染抑制率(%)

	Caco-2	AGS	Hela
<i>Helicobacter pylori</i> CMU83	32.02	30.80	ND
EAggEC	99.21	ND	96.61
<i>Salmonella enteritidis</i>	99.05	ND	98.87

“ND”表示未進行該細胞之測試。

由表 3 及表 4 結果可知，胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 具有優異之抑制致病菌感染之效果，尤其治療排除模式之試驗結果，更顯示胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 可有效地降低致病菌對腸胃道及泌尿道細胞之附著作用，進而將其排出細胞外，達成抑制感染的功效。此外，胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 對於大腸桿菌或沙門氏菌亦有相當優異的抑制效果。

[實施例 4] 動物試驗

實驗 G、試驗動物分組

本實驗使用 6 週大之雄性 C57BL/6 小鼠（購自樂斯科公司，台灣），體重為 20 至 26 公克，飼養於一獨立 IVC 小鼠飼育系統，室溫維持於 22°C，並定時 12 小時光照與黑暗。餵食小鼠經過滅菌的飼料及逆滲透水，供小鼠自由取食，飼養 2 週使小鼠適應環境後才開始進行實驗。隨機將小鼠分為 4 組，每組皆 8 隻。於進行幽門螺旋桿菌感染前，各組小鼠於每日固定時間經口投餵食 200 微升不同濃度之新鮮製備的胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 的菌液，連續 7 日，每日餵食一次。各組實驗情形如下：

A 組：生理食鹽水（saline）組/負控制組（negative control）。餵食小鼠經無菌過濾之生理食鹽水。

B 組： 1×10^{10} 菌落形成單位/毫升之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 組。

以 MRS 培養液培養胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 達 24 小時後，離心菌液，再以生理食鹽水回溶，並調整細菌濃度至

[S]

1×10^{10} 菌落形成單位/毫升，並將其餵食小鼠。

C 組： 1×10^9 菌落形成單位/毫升之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 組。

以 MRS 培養液培養胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 達 24 小時後，離心菌液，再以生理食鹽水回溶，並調整濃度至 1×10^9 菌落形成單位/毫升，並將其餵食小鼠。

D 組： 1×10^8 菌落形成單位/毫升之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 組。

以 MRS 培養液培養胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 達 24 小時後，離心菌液，再以生理食鹽水回溶，並調整濃度至 1×10^8 菌落形成單位/毫升，並將其餵食小鼠。

實驗 H、幽門螺旋桿菌感染試驗

餵食小鼠乳酸桿菌菌株 CMU995 之菌液達 7 日後，於隔日經口餵食 2×10^7 菌落形成單位的幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori* CMU83) 菌液，連續餵食 3 日使小鼠感染，再於次日使小鼠禁食 1 日後，以二氧化碳及頸椎分離術犧牲小鼠。摘取小鼠的胃及十二指腸段 (約 0.5 公克)，將其放入含有 9.5 毫升無菌磷酸鹽緩衝溶液的離心管中，以均質機攪拌 3 分鐘後，取出 1 毫升組織破碎液，再以無菌磷酸鹽緩衝溶液做 10 倍連續稀釋，在不同稀釋倍數下，取出 100 微升稀釋液，以平板塗抹計數法將稀釋液塗抹於 Brucella 洋菜培養基，並添加 2.5 體積%胎小牛血清及用於篩選幽門螺旋桿菌之選擇性輔助劑 Selective Supplements SR147E (Oxoid, Hampshire, 英格蘭)，此培養基係經測試可用於篩選本實驗中所使用之幽門螺旋桿菌 *Helicobacter pylori* CMU83。於 37 °C、微好氧條件下進行培養 48 小時後，計算菌落數。每個實驗分析皆進行

三次重複，以 SPSS 10.0 套裝軟體統計分析實驗結果，先經單向變方分析（one way ANOVA，analysis of variance）測定各組間之顯著性差異，判斷標準為 $p<0.05$ 。分析結果如表 5 所示。

表 5

組別	A	B	C	D
	生理食鹽水	1×10^{10} 菌落形成單位/毫升	1×10^9 菌落形成單位/毫升	1×10^8 菌落形成單位/毫升
感染菌數平均值 (Log 菌落形成單位/組織)	3.71 ± 0.79	$1.91\pm 0.90 *$	$2.65\pm 1.29 *$	2.91 ± 0.74

“*”：表示相較於生理食鹽水組具有顯著性差異($P<0.05$)。

表 5 結果顯示，餵食小鼠 1×10^9 菌落形成單位/毫升或 1×10^{10} 菌落形成單位/毫升之濃度的胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 後，可明顯抑制幽門螺旋桿菌於小鼠腸胃道之感染，因此可達到保護腸胃道免於病原菌感染之效果。

[實施例 5]

實驗 I、菌株鑑定

[乳酸桿菌鑑定套組分析]

將本發明之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 以 MRS 培養基活化培養 16 小時後，使用鑑定乳酸桿菌專用之 API 50 CHL 鑑定套組（Biomerieux，Marcy l’Etoile，法國）進行分析，以確認此菌株之種類。

[基因序列分析]

使用乳酸菌之特異性引子進行胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 之 16S-23S rRNA 片段的聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，並將反應產物進行序列分析。所得之聚合酵素鏈鎖反應產物進行序列分析後，部分序列之結果係如 SEQ ID NO: 1 所示。

SEQ ID NO: 1

ACATTGCAACAGCGCGTGCCGTATTTTAATTATCGGCTAGCCACAGAGAT
CTATCCGTAAACAAACAATTTACTGAGAAATACGGGAATAAGTATGGGA
AATATCCCTAGCGAACCCTAAATAATGGCCCCCCTGTCTTGAACAGATAG
ACTGGCCAAACTCCTACGGGAGAGAAAACGTTGGGAAATTTTGCTCAATGG
GCCCAACCCTGAGGCGCCCCTGCCACATATATGAGGAAAGCCTTCGGGTT
ATAAAATTTTTTTTCAGCGAGGAGTGAAGTGAGGATAAGAACCTTCTACA

本分析所使用之引子序列為 LU-5 及 Lac-2，序列如下所示：

LU-5: 5'-CTAGCGGGTGCGACTTTGTT-3' SEQ ID NO:2

Lac-2: 5'-CCTCTTCGCTCGCCGCTACT-3' SEQ ID NO:3

[脈衝電場膠體電泳分析]

利用脈衝電場膠體電泳法 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 分析胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 的基因組 DNA (genomic DNA)，使用之限制酵素 (restriction enzyme) 為 SgsI (Promega Corporation, Madison, 美國)，藉此獲得胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 之基因指紋圖譜，結果係如第 1 圖所示。第 1 圖之基因指紋圖譜僅係提供作為基因指紋辨識胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 之參考，而非

用於限制該菌株之基因鑑定。

根據 API 50 CHL 鑑定套組之鑑定結果，顯示胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 屬於 *Lactobacillus plantarum*。聚合酵素鏈鎖反應之基因片段產物之基因序列比對結果，進一步證實此菌株為新穎之 *Lactobacillus plantarum* 菌株。

胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 係經寄存於財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC 910472，及寄存於德國國家菌種保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)，寄存編號為 DSM 23780。

以上實施例顯示，胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 可拮抗病原菌對腸胃道及泌尿道之附著，以保護胃腸道細胞而降低病原菌感染，亦可直接地抑制病原菌之生長，經由此二種抑菌機制之加乘作用來保護腸胃道及泌尿道。

上述實施例僅係用以例示說明本發明及其功效，而非用於限制本發明。任何熟於此項技藝之人士均可在不違背本發明之技術原理及精神的情況下，對上述實施例進行修改及變化。因此，本發明之權利保護範圍應如後述之申請專利範圍所列者。

【圖式簡單說明】

第 1 圖所示為胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 之基因指紋圖譜。

【主要元件符號說明】

無。

序列表

102 年 5 月 24 日修正替換頁

<110> 中國醫藥大學
<120> 胚芽乳酸桿菌及其用途
<130> 無
<160> 3
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 299
<212> DNA
<213> 胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995

<400> 1
acattgcaac agcgcggtgcc gtattttaat tatcggctag ccacagagat ctatccgtta 60
aacaacaat ttactgagaa atacgggaat aagtatggga aatatcccta gcgaacccta 120
aataatggcc cccctgtctt gaacagatag actggccaaa ctctacggg agaaaacgtt 180
gggaaatatt gctcaatggg cccaaccctg aggcgcccct gccacatata tgaggaaagc 240
cttcgggtta taaaattttt tticagcgag gagtgaagtg aggataagaa ctttctaca 299

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工合成

<220>
<223> 引子

<400> 2
ctagcgggtg cgactttgtt 20

<210> 3

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工合成

102 年 5 月 24 日修正替換頁

<220>
<223> 引子

<400> 3
cctcttcgct cgccgctact

20



公告本

第 099123851 號專利申請案

申請專利範圍替換本 (102 年 5 月)

102 年 5 月 24 日修正本

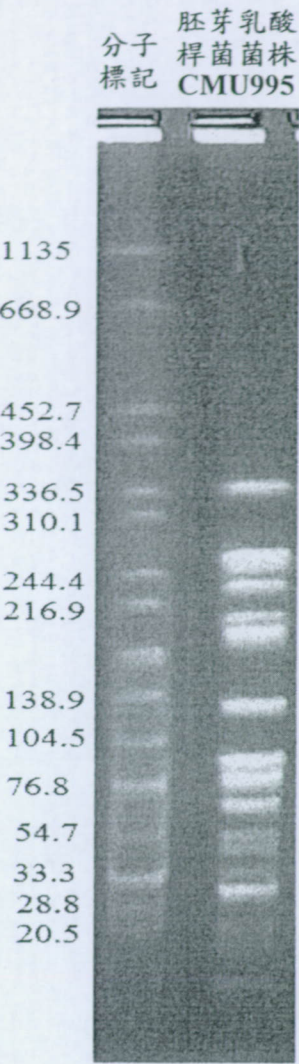
七、申請專利範圍：

1. 一種經分離之胚芽乳酸桿菌菌株 (*Lactobacillus plantarum*) CMU995，其寄存於財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC 910472，及寄存於德國國家菌種保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)，寄存編號為 DSM 23780。
2. 如請求項 1 之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995，其具有腸胃道及/或泌尿道附著性。
3. 如請求項 1 之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995，其具有抑制病原菌生長之功效。
4. 如請求項 1 之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995，其具有抑制病原菌對腸胃道及/或泌尿道附著之功效。
5. 如請求項 3 或 4 之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995，其中該病原菌係選自以下群組：幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*)、空腸彎曲桿菌 (*Campylobacter jejuni*)、沙門氏菌屬 (*Salmonella* spp.)、大腸桿菌屬 (*Escherichia* spp.)、金黃色葡萄球菌屬 (*Staphylococcus* spp.)、志賀氏桿菌 (*Shigella flexneri*)、產氣英膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、白色念珠球菌 (*Candida albicans*)、及前述之組合。
6. 如請求項 5 之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995，其中該病原菌係幽門螺旋桿菌。
7. 一種組合物，包含如請求項 1 之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995。
8. 如請求項 7 之組合物，其係用於抑制病原菌、保護腸胃道、保護泌尿道、或前述之組合。

9. 如請求項 8 之組合物，其中該病原菌係選自以下群組：幽門螺旋桿菌、空腸彎曲桿菌、沙門氏菌屬、大腸桿菌屬、金黃色葡萄球菌屬、志賀氏桿菌、產氣莢膜梭菌、白色念珠球菌、及前述之組合。
10. 如請求項 7 之組合物，其係呈一選自以下群組之形式：醫藥組合物、飼料、飲料、營養補充品、乳製品、食品、保健食品及噴劑、塞劑等。
11. 一種如請求項 1 之胚芽乳酸桿菌菌株 CMU995 於製造抑制病原菌、保護腸胃道、及/或保護泌尿道之藥物的用途。
12. 如請求項 11 之用途，其中該病原菌係選自以下群組：幽門螺旋桿菌、空腸彎曲桿菌、沙門氏菌屬、大腸桿菌屬、金黃色葡萄球菌屬、志賀氏桿菌、產氣莢膜梭菌、白色念珠球菌、及前述之組合。

八、圖式：

102 年 5 月 24 日修正本



第 1 圖