



(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 I639389 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：106102613

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 01 月 24 日

(51)Int. Cl. : A23L33/135 (2016.01)

A61K35/744 (2015.01)

(71)申請人：豐華生物科技股份有限公司 (中華民國) GLAC BIOTECH CO., LTD (TW)

臺南市新市區國際路 17 號 3 樓之 2

(72)發明人：謝佩珊 HSIEH, PEI-SHAN (TW)；郭仲偉 KUO, CHUNG-WEI (TW)；蔡宜鈞 TSAI, YI-CHUN (TW)；何協勳 HO, HSIEH-HSUN (TW)；郭易緯 KUO, YI-WEI (TW)

(74)代理人：蔡朝安；鄭淑芬

(83)生物材料寄存：

BCRC910469 2010 年 04 月 08 日

BCRC910437 2009 年 07 月 30 日

BCRC910404 2008 年 10 月 29 日

BCRC910646 2014 年 08 月 21 日

BCRC910537 2011 年 12 月 27 日

BCRC910468 2010 年 04 月 08 日

BCRC910753 2016 年 11 月 03 日

(56)參考文獻：

劉虹等人，口腔益生菌在口腔疾病防治上的研究及應用，藥學研究，Vol 34 (6)，2015，
page 357-360。

審查人員：林秀芸

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：7 共 28 頁

(54)名稱

用於抑制口腔病原菌之乳酸菌菌株之食品、口腔清潔以及醫藥組合物

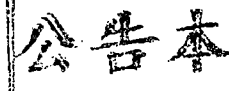
FOOD, ORAL CLEANING AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION WITH STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA FOR INHIBITING OF ORAL PATHOGENS

(57)摘要

一種選自以下群組中之至少一經分離的乳酸菌菌株：嗜酸乳酸桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)F-1 菌株、唾液乳酸桿菌(*Lactobacillus salivarius*)AP-32 菌株、路乳酸桿菌(*Lactobacillus reuteri*)GL-104 菌株、副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)GL-156 菌株、瑞士乳酸桿菌(*Lactobacillus helveticus*)RE-78 菌株、鼠李糖乳酸桿菌(*Lactobacillus rhamnosus*)CT-53 菌株及副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)ET-66 菌株。上述乳酸菌菌株具有抑制口腔病原菌之作用，且以食品、口腔清潔或醫藥組合物的形式存在。

At least one isolated lactic acid bacteria strains selected from the following group: F-1 (*Lactobacillus acidophilus*), AP-32 (*Lactobacillus salivarius*), GL-104 (*Lactobacillus reuteri*), GL-156 (*Lactobacillus paracasei*), RE-78 (*Lactobacillus helveticus*), CT-53 (*Lactobacillus rhamnosus*) and ET-66 (*Lactobacillus paracasei*) are provided. The above-mentioned lactic acid bacteria strains have a function of inhibiting of oral pathogens and is used in a form of food, oral cleaning or pharmaceutical compositions.

【發明摘要】



【中文發明名稱】用於抑制口腔病原菌之乳酸菌菌株之食品、口腔清潔以及醫藥組合物

【英文發明名稱】FOOD, ORAL CLEANING AND PHARMACEUTICAL
COMPOSITION WITH STRAINS OF LACTIC ACID
BACTERIA FOR INHIBITING OF ORAL PATHOGENS

【中文】

一種選自以下群組中之至少一經分離的乳酸菌菌株：嗜酸乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*) F-1菌株、唾液乳酸桿菌 (*Lactobacillus salivarius*) AP-32菌株、路乳酸桿菌 (*Lactobacillus reuteri*) GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌 (*Lactobacillus helveticus*) RE-78菌株、鼠李糖乳酸桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) CT-53菌株及副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) ET-66菌株。上述乳酸菌菌株具有抑制口腔病原菌之作用，且以食品、口腔清潔或醫藥組合物的形式存在。

【英文】

At least one isolated lactic acid bacteria strains selected from the following group: F-1 (*Lactobacillus acidophilus*), AP-32 (*Lactobacillus salivarius*), GL-104 (*Lactobacillus reuteri*), GL-156 (*Lactobacillus paracasei*), RE-78 (*Lactobacillus helveticus*), CT-53 (*Lactobacillus rhamnosus*) and ET-66 (*Lactobacillus paracasei*) are provided. The above-mentioned lactic acid bacteria strains have a function of

inhibiting of oral pathogens and is used in a form of food, oral cleaning or pharmaceutical compositions.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】用於抑制口腔病原菌之乳酸菌菌株之食品、口腔清潔以及醫藥組合物

【英文發明名稱】FOOD, ORAL CLEANING AND PHARMACEUTICAL
COMPOSITION WITH STRAINS OF LACTIC ACID
BACTERIA FOR INHIBITING OF ORAL PATHOGENS

【技術領域】

【0001】 本發明是有關一種食品組合物、口腔清潔組合物以及醫藥組合物，特別是一種包含抑制口腔病原菌之乳酸菌菌株之食品組合物、口腔清潔組合物以及醫藥組合物。

【先前技術】

【0002】 幼兒之乳齒保健將會影響到未來的恆久齒，因此，從嬰兒時期開始，口腔清潔即十分重要。若口腔有細菌滋生，細菌容易附著於牙齦表面，待乳齒長出後會直接附著於嬰兒的乳齒上造成齲齒。乳齒是一切牙齒的基礎，乳齒可維繫適當的空間及距離以提供未來恆久齒的生長。若乳齒沒有照顧好，放任乳齒產生齲齒，齲齒會導致空間嚴重喪失，且將來恆久齒在發育時，恆久齒的周圍都是細菌與膿包，導致新長出來的牙齒也比較容易形成齲齒，甚至影響成年及老年後的牙周病發生率。

【0003】 因此，台灣從西元1991年投入大量經費推動幼兒免費塗氟策略，政策的實施略有改善齲齒盛行率，下降約15個百分比，齲齒顆數減少約2顆。但台灣的齲齒防禦率，依舊排名在亞洲地區的末位(倒數第二)。世界衛生組織

(WHO)預計在2010年時，所有會員國家將達到「90%五歲以下幼童全口無齲齒、12歲兒童之齲齒數不超過2顆」的目標。台灣目前為20%左右沒有齲齒，12歲兒童之齲齒數超過3顆，距離WHO的定義差距甚遠，值得我們加強重視。

【0004】 一般食用含乳酸菌(LAB)之產品僅具有調整腸道健康的效果。雖然有數以萬計的乳酸菌菌株存在自然界，但目前僅發現少數乳酸菌菌株可能具有維護口腔健康及美白牙齒的潛在性附屬特質。這些菌株所具有的抑制口腔病原菌的能力、吸附口腔黏膜表皮細胞的能力、在潔牙產品中是否尚能維持抑制病原菌及產生過氧化氫的能力等特性，是激發菌株在口腔展現功能，控制口腔中的微生態平衡、篩選有維護口腔健康及美白牙齒功能性菌株時的重要依據。

【0005】 文獻指出益生菌可以與病原菌競爭貼附的生存區域及營養需求，促進病原菌產生聚集特性，並分泌抑菌物質使得病原菌較虛弱或甚至殺死病原菌，來達到減少口腔病原菌數量並維持口腔健康之功效，以及分泌過氧化氫去除口腔氣味及美白牙齒之目的。

【0006】 時至今日，僅有少數菌株經實驗過程發現具備有維持口腔健康及美白牙齒之活性效果的乳酸菌菌株被確認。而乳酸菌對身體健康的功能在於菌株(strain)的特異性而非菌種(species)，此種對於人之身體健康有特殊功效之菌株稱為功能性益生菌(Guidelines for the evaluation of probiotics in food ; Report of joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food ; London Ontario, Canada April 30 and May 1, 2002 : 1-7)。

【0007】 綜上所述，開發具有抑制口腔病原菌之活性效果的功能性益生菌是目前需努力的目標。

【發明內容】

【0008】 本發明提供一種含乳酸菌菌株之食品組合物、口腔清潔組合物以及醫藥組合物，其可抑制口腔病原菌之生長，以維持口腔健康。

【0009】 本發明一實施例之含乳酸菌菌株之食品組合物包含具有抑制口腔病原菌之活性效果之乳酸菌菌株，該乳酸菌菌株選自以下群組中之至少一經分離的乳酸菌菌株：嗜酸乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*) F-1菌株，寄存編號BCRC 910469、唾液乳酸桿菌 (*Lactobacillus salivarius*) AP-32菌株，寄存編號BCRC 910437、路乳酸桿菌 (*Lactobacillus reuteri*) GL-104菌株，寄存編號BCRC 910404、副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) GL-156菌株，寄存編號BCRC 910646、瑞士乳酸桿菌 (*Lactobacillus helveticus*) RE-78菌株，寄存編號BCRC 910537、鼠李糖乳酸桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) CT-53菌株，寄存編號BCRC 910468、以及副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) ET-66菌株，寄存編號BCRC 910753，上述菌株均寄存於台灣新竹食品工業發展研究所；以及生理上可接受之賦形劑或稀釋劑。

【0010】 本發明另一實施例之含乳酸菌菌株之醫藥組合物包含具有抑制口腔病原菌之活性效果之乳酸菌菌株，該乳酸菌菌株選自以下群組中之至少一經分離的乳酸菌菌株：嗜酸乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*) F-1菌株，寄存編號BCRC 910469、唾液乳酸桿菌 (*Lactobacillus salivarius*) AP-32菌株，寄存編號BCRC 910437、路乳酸桿菌 (*Lactobacillus reuteri*) GL-104菌株，寄存編號BCRC 910404、副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) GL-156菌株，寄存編號BCRC 910646、瑞士乳酸桿菌 (*Lactobacillus helveticus*) RE-78菌株，寄存編號BCRC 910537、鼠李糖乳酸桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) CT-53菌株，寄存編號BCRC 910468、以及副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) ET-66菌株，寄存編號

BCRC 910753，上述菌株均寄存於台灣新竹食品工業發展研究所；以及醫藥上可接受之賦形劑或稀釋劑。

【0011】 本發明再一實施例之含乳酸菌菌株之口腔清潔組合物包含具有抑制口腔病原菌之活性效果之乳酸菌菌株，該乳酸菌菌株選自以下群組中之至少一經分離的乳酸菌菌株：嗜酸乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*) F-1菌株，寄存編號BCRC 910469、唾液乳酸桿菌 (*Lactobacillus salivarius*) AP-32菌株，寄存編號BCRC 910437、路乳酸桿菌 (*Lactobacillus reuteri*) GL-104菌株，寄存編號BCRC 910404、副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) GL-156菌株，寄存編號BCRC 910646、瑞士乳酸桿菌 (*Lactobacillus helveticus*) RE-78菌株，寄存編號BCRC 910537、鼠李糖乳酸桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) CT-53菌株，寄存編號BCRC 910468、以及副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) ET-66菌株，寄存編號BCRC 910753，上述菌株均寄存於台灣新竹食品工業發展研究所；以及生理上可接受之賦形劑或稀釋劑。

【0012】 以下藉由具體實施例配合所附的圖式詳加說明，當更容易瞭解本發明之目的、技術內容、特點及其所達成之功效。

【圖式簡單說明】

【0013】

本專利或申請案含至少一彩圖。依據請求和支付必要費用後，承辦單位應提供附有彩圖的專利或專利申請公開本的副本。

圖1為本發明之乳酸菌菌株抑制變形鏈球菌(*Streptococcus mutans*)之試驗結果。

圖2為本發明之乳酸菌菌株抑制具核梭桿菌多型亞種(*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*)之試驗結果。

圖3為本發明之乳酸菌菌株抑制放線共生放線桿菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)之試驗結果。

圖4為本發明之乳酸菌菌株抑制牙齦卟啉單孢菌(*Porphyromonas gingivalis* 17)之試驗結果。

圖5為本發明之乳酸菌菌株抑制牙齦卟啉單孢菌(*Porphyromonas gingivalis* 18)之試驗結果。

圖6為本發明之乳酸菌菌株分泌過氧化氫之平板試驗結果。

圖7為本發明之乳酸菌菌株分泌過氧化氫之試紙試驗結果。

【實施方式】

【0014】 以下將詳述本發明之各實施例，並配合圖式作為例示。除了這些詳細說明之外，本發明亦可廣泛地施行於其它的實施例中，任何所述實施例的輕易替代、修改、等效變化都包含在本發明之範圍內，並以申請專利範圍為準。在說明書的描述中，為了使讀者對本發明有較完整的瞭解，提供了許多特定細節；然而，本發明可能在省略部分或全部特定細節的前提下，仍可實施。此外，眾所周知的步驟或元件並未描述於細節中，以避免對本發明形成不必要之限制。圖式中相同或類似之元件將以相同或類似符號來表示。特別注意的是，圖式僅為示意之用，並非代表元件實際之尺寸或數量，有些細節可能未完全繪出，以求圖式之簡潔。

【0015】 本發明所述之乳酸菌菌株之冷凍乾燥培養物已寄存於台灣食品工業發展研究所，地址為中華民國新竹市食品路331號。寄存之詳細資料如表1所示：

表 1 乳酸菌菌株之寄存資料

| 菌株名 | 分類 | 寄存編號 | 寄存日期 |
|--------|---------|------------|------------------|
| F-1 | 嗜酸乳酸桿菌 | BCRC910469 | 2010 年 04 月 08 日 |
| AP-32 | 唾液乳酸桿菌 | BCRC910437 | 2009 年 07 月 30 日 |
| GL-104 | 路乳酸桿菌 | BCRC910404 | 2008 年 10 月 29 日 |
| GL-156 | 副乾酪乳酸桿菌 | BCRC910646 | 2014 年 08 月 21 日 |
| RE-78 | 瑞士乳酸桿菌 | BCRC910537 | 2011 年 12 月 27 日 |
| CT-53 | 鼠李糖乳酸桿菌 | BCRC910468 | 2010 年 04 月 08 日 |
| ET-66 | 副乾酪乳酸桿菌 | BCRC910753 | 2016 年 11 月 03 日 |

【0016】 如表1所列已寄存的七株乳酸菌中，嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株被發現具有抑制口腔病原菌的能力，例如齲齒菌、牙齦菌及口腔氣味菌等。此外，唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株及鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株可以分泌過氧化氫，除了抑制口腔病原菌之外，還可以達到美白牙齒的功效。

【0017】 本發明包含具有抑制口腔病原菌之活性效果之乳酸菌菌株，該乳酸菌菌株選自以下群組中之至少一經分離的乳酸菌菌株：嗜酸乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*) F-1 菌株(寄存編號BCRC 910469)、唾液乳酸桿菌

(*Lactobacillus salivarius*) AP-32 菌株(寄存編號BCRC 910437)、路乳酸桿菌(*Lactobacillus reuteri*) GL-104 菌株(寄存編號BCRC 910404)、副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*) GL-156 菌株(寄存編號BCRC 910646)、瑞士乳酸桿菌(*Lactobacillus helveticus*) RE-78 菌株(寄存編號BCRC 910537)、鼠李糖乳酸桿菌(*Lactobacillus rhamnosus*) CT-53 菌株(寄存編號BCRC 910468)、以及副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*) ET-66 菌株(寄存編號BCRC 910753)，上述菌株均寄存於台灣新竹食品工業發展研究所；以及生理上可接受之賦形劑、稀釋劑或載體所組成之食品組合物或口腔清潔組合物，或醫藥上可接受之賦形劑或稀釋劑所組成之醫藥組合物。其中乳酸菌菌株可為具有活性或去活性(inactivated)的菌株。

【0018】 於食品組合物之實施例中，生理上可接受之賦形劑或稀釋劑可為一食品，舉例而言，食品可包含但不限於乳製飲品、茶、咖啡、口香糖及潔牙糖(例如口含片、咀嚼錠、軟糖等)、寵物用肉乾或以上之組合，其中乳製飲品可包含醃酵乳、優格、乳酪或乳粉。於口腔清潔組合物之實施例中，賦形劑或稀釋劑可為牙膏、潔牙粉、漱口水、口氣清新噴霧、塗氟劑(例如塗抹於幼兒牙齒之氟劑)、假牙清潔劑、寵物用潔牙膠或寵物用化毛膏等；載體可為牙刷、牙間刷、牙線、口腔棉棒或寵物用潔牙骨等。醫藥組合物可包含口服劑型或外用劑型。舉例而言，口服劑型可為錠劑、膠囊、溶液劑及粉劑等。

【0019】 食品組合物或醫藥組合物中，乳酸菌菌株之數量為 10^6 CFU以上；較佳者，乳酸菌菌株之數量為 10^{10} CFU以上。

【0020】 目前已知部份菌株對於抑制齲齒菌及牙周菌是有功效的，但文獻指出，多數的研究都是針對個別菌株在口腔內的功效進行試驗，且不是所有的試驗結果皆證明乳酸菌對於口腔健康是有幫助的，還是有菌株功效上之個體差異(Anna Haukioja, European Journal of Dentistry 2010(4):348-355)。舉例而言，Vuotto

第 7 頁，共 17 頁(發明說明書)

C等人(International Journal of Oral Science 2014(6): 189-194)針對益生菌對於病原菌的抑制能力分析，提到任何一株益生菌都不會是相同的，即便是同種不同株的益生菌，試驗的結果有時都會是相反的。這樣的結果更加強調益生菌對於口腔病原菌的抑制及美白牙齒等功效確實是有菌株特異性的現象。

【0021】 事實上，由本發明之下列試驗結果可知，多數乳酸桿菌菌株並不具有抑制口腔病原菌及美白牙齒之作用。國內外目前針對益生菌在維護口腔健康相關功能研究之文獻報導在近期才有陸續增加的趨勢。早期認為益生菌之中的乳酸菌各屬，由於產酸的特性有可能與口腔病原菌共存之外，還有可能促成腐蝕琺瑯質，而造成齲齒。但實際上，由實驗顯示乳酸菌不但可以抑制齲齒菌及牙周菌之外，還能與之競爭口腔黏膜的生存空間及營養來源，並且造成口腔病原菌的凝集而易排除。但這些特性都必須透過實驗才能確認，並非所有的菌株皆有相同的特性及實驗結果。應說明的是，本發明所請求保護之菌株僅包含寄存於新竹食品工業發展研究所之嗜酸乳酸桿菌F-1菌株(寄存編號BCRC 910469)、唾液乳酸桿菌AP-32菌株(寄存編號BCRC 910437)、路乳酸桿菌GL-104菌株(寄存編號BCRC 910404)、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株(寄存編號BCRC 910646)、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株(寄存編號BCRC 910537)、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株(寄存編號BCRC 910468)以及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株(寄存編號BCRC 910753)，並非廣泛地包含以上所有相同菌種的乳酸菌。

實例1：維持口腔健康之乳酸菌之形態學以及一般性質

【0022】 根據16S rDNA序列分析以及API細菌鑑定系統分析結果來確認菌株在分類學上的特徵。上述菌株在形態學及一般性質上的特徵詳細列於表2：

表 2 乳酸菌菌株之形態學及一般性質特徵

| 菌株名 | 形態特徵 |
|----------------------|---|
| 嗜酸乳酸桿菌 F-1 菌株 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 於 MRS 培養液培養時，菌體呈短或稍長之桿狀，二端呈方形，通常單獨出現、成對或成短鏈狀。 2. 革蘭氏染色陽性桿菌，不生成孢子，不具觸酶、氧化酶及運動性，在好氧及厭氧環境均能生長，最適宜的生長溫度為 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$，屬於兼性異質發酵性菌株，葡萄糖代謝時不產生氣體。 |
| 唾液乳酸桿菌 AP-32 菌株 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 於 MRS 培養液培養時，菌體呈短桿狀，二端呈圓形，通常單獨出現、成對或成短鏈狀。 2. 革蘭氏染色陽性桿菌，不生成孢子，不具觸酶、氧化酶及運動性，在好氧及厭氧環境均能生長，最適宜的生長溫度為 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$，屬於兼性異質發酵性菌株，葡萄糖代謝時不產生氣體。 |
| 路乳酸桿菌 GL-104 菌株 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 於 MRS 培養液培養時，菌體呈短桿狀，二端呈圓形，通常單獨出現、成對或成短鏈狀。 2. 革蘭氏染色陽性桿菌，不生成孢子，不具觸酶、氧化酶及運動性，在好氧及厭氧環境均能生長，最適宜的生長溫度為 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$，屬於兼性異質發酵性菌株，葡萄糖代謝時不產生氣體。 |
| 副乾酪乳酸桿菌 GL-156 菌株 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 於 MRS 培養液培養時，菌體呈短桿狀，二端呈圓形，通常成鏈狀，偶爾單獨出現或成對。 2. 革蘭氏染色陽性桿菌，不生成孢子，不具觸酶、氧化酶及運動性，在好氧及厭氧環境均能生長，最適宜的生長溫度為 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$，屬於兼性異質發酵性菌株，葡萄糖代謝時不產生氣體。 |

| | |
|-----------------------------|---|
| <p>瑞士乳酸桿菌 RE-78 菌株</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 於 MRS 培養液培養時，菌體呈較長之桿狀，二端呈圓形，通常單獨出現、成對，鮮少成短鏈狀。 2. 革蘭氏染色陽性桿菌，不生成孢子，不具觸酶、氧化酶及運動性，在好氧及厭氧環境均能生長，最適宜的生長溫度為 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$，屬於兼性異質發酵性菌株，葡萄糖代謝時不產生氣體。 |
| <p>鼠李糖乳酸桿菌 CT-53 菌株</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 於 MRS 培養液培養時，菌體呈短或稍長之桿狀，二端呈方形，通常單獨出現、成對或成短鏈狀。 2. 革蘭氏染色陽性桿菌，不生成孢子，不具觸酶、氧化酶及運動性，在好氧及厭氧環境均能生長，最適宜的生長溫度為 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$，屬於兼性異質發酵性菌株，葡萄糖代謝時不產生氣體。 |
| <p>副乾酪乳酸桿菌 ET-66 菌株</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 於 MRS 培養液培養時，菌體呈短或稍長之桿狀，二端呈圓形，通常成對出現，偶而單獨或成短鏈狀。 2. 革蘭氏染色陽性桿菌，不生成孢子，不具觸酶、氧化酶及運動性，在好氧及厭氧環境均能生長，最適宜的生長溫度為 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$，屬於兼性異質發酵性菌株，葡萄糖代謝時不產生氣體。 |

實例2：分析菌株產生過氧化氫之特性，以確認對於牙齒美白之功能

【0023】 檢視本發明之乳酸菌菌株—嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株以及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株產生

過氧化氫的能力，藉此來驗證本發明之乳酸菌菌株之美白牙齒的能力。實驗步驟如下：

1. 製備益生菌產過氧化氫篩選平板。
2. 在平板內加入三甲基硼 (Trimethyl borane TMB) 0.25mg/ml與辣根過氧化物酶 (Horseradish Peroxidase HRP) 0.01mg/ml。
3. 在平板上以畫四區方式培養目標菌株。
4. 培養兩天後，有產生過氧化氫之乳酸菌菌株，會呈現藍色在菌落周圍。
5. 利用過氧化氫感測試紙，偵測乳酸菌菌體及二次代謝物含過氧化氫的濃度。
6. 培養乳酸菌菌液並以4500 rpm離心5分鐘。
7. 取菌體的部分溶於4.9毫升100mM之哌嗪-1,4-二乙磺酸 (Piperazine-1,4-bisethanesulfonicacid PIPES)。
8. 以37°C 220 rpm培養5小時，將菌體離心後取10 微升(μ L)上清液或沉降的菌體滴於過氧化氫檢測試紙(Merck)反應10秒鐘，觀察顏色變化並與比色卡比對記錄濃度。

【0024】 實驗結果如圖6及圖7所示。圖6為嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株以及鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株在過氧化氫檢測平板上培養後，在平板上顯示分泌過氧化氫能力的結果。圖7為嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株以及鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株的代謝產物或菌體在過氧化氫檢測試紙上呈現過氧化氫分泌濃度的結果。

【0025】 由圖6之試驗結果可知，培養兩天後，菌株的生長過程中，本發明之嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株以及鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株皆能夠分泌過氧化氫。另須說明的是，非本發明之相同菌種之乳酸菌菌株，例如嗜酸乳酸桿菌6菌株、唾液乳酸桿菌28菌株、路乳酸桿菌23菌株、副乾酪乳酸桿菌9菌株、瑞士乳酸桿菌76菌株、鼠李糖乳酸桿菌134菌株，則沒有分泌過氧化氫的能力，如圖6所示。

【0026】 由圖7之試驗結果可知，嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株以及鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株之代謝產物中，以唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株能將分泌的過氧化氫擴散至液體中。而嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株將過氧化氫存留在菌體內，使菌體本身帶有過氧化氫。無論是上清液或是菌體，副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株並未偵測到過氧化氫，顯示副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株產生過氧化氫的代謝速度比其他菌株來得較為緩慢，而需要較長時間(因本實施例只進行5小時的代謝時間)。另外，嗜酸乳酸桿菌F-1菌株之菌體有偵測到微量過氧化氫，而在上清液尚未偵測到，顯示5小時代謝時間對於嗜酸乳酸桿菌F-1菌株而言，才開始分泌過氧化氫，也是屬於需要較長時間的菌株。

實例3：維持口腔健康之乳酸菌對於口腔病原菌之抑制能力

【0027】 乳酸菌要發揮口腔保健功能，首重口腔病原菌的抵抗能力是否強大。口腔病原菌不僅僅只是大眾比較熟知的變形鏈球菌(*Streptococcus mutans*)，還包含具核梭桿菌多型亞種(*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*)、放線

第 12 頁，共 17 頁(發明說明書)

共生放線桿菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、牙齦卟啉單孢菌 (*Porphyromonas gingivalis*)。各菌株所引起的症狀分別是變形鏈球菌造成齲齒；具核梭桿菌多型亞種主要造成牙周病、口臭及結腸癌等問題；放線共生放線桿菌則是引起牙周炎、口腔發炎及肺炎的主要菌種；牙齦卟啉單孢菌則是成人型牙周炎致病菌及口臭的主因。此外，具核梭桿菌多型亞種、放線共生放線桿菌以及牙齦卟啉單孢菌皆會產生硫化物，因此對於口腔氣味，除了牙齦卟啉單孢菌是引起口臭的主要菌種外，具核梭桿菌多型亞種以及放線共生放線桿菌也是影響口腔氣味的菌種之一。

【0028】 因此，本發明進行病原菌抑制試驗，評估本發明之嗜酸乳酸桿菌 F-1 菌株、唾液乳酸桿菌 AP-32 菌株、路乳酸桿菌 GL-104 菌株、副乾酪乳酸桿菌 GL-156 菌株、瑞士乳酸桿菌 RE-78 菌株、鼠李糖乳酸桿菌 CT-53 菌株以及副乾酪乳酸桿菌 ET-66 菌株抑制口腔病原菌的能力，進而達成維持口腔健康的效果。使用如下之實驗步驟：

1. 活化口腔病原菌。
2. 將熱致死乳酸菌調整菌數，依每毫升十億菌體之比例與病原菌共同培養。
3. 以厭氧方式、150 rpm 轉速培養在 37°C 環境中 2-4 天。
4. 計數病原菌的數量。

【0029】 數據之統計分析如表 3 及圖 1 至圖 5 所示，圖 1 為本發明之乳酸菌菌株抑制變形鏈球菌 (*Streptococcus mutans*) 的能力分析；圖 2 為本發明之乳酸菌菌株抑制具核梭桿菌多型亞種 (*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*)、圖 3 為本發明之乳酸菌菌株抑制放線共生放線桿菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、圖 4 及圖 5 為本發明之乳酸菌菌株抑制牙齦卟啉單孢菌

(*Porphyromonas gingivalis*)的能力分析，數據皆以Mean \pm SD表示之，並與控制組比較。

【0030】 如圖1所示為本發明之嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株以及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株抑制變形鏈球菌(*Streptococcus mutans*)生存之結果，其中以鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株的抑制效果最為顯著。

【0031】 如圖2所示為本發明之嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株以及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株抑制具核梭桿菌多型亞種(*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*)生存之結果。由圖2之試驗結果可知，本發明之嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株以及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株皆具有顯著的抑制效果。

【0032】 如圖3所示為本發明之嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株以及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株抑制放線共生放線桿菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)生存之結果，其中以鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株以及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株的抑制效果較為顯著。

【0033】 如圖4所示為本發明之嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株以及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株抑制牙齦卟啉單孢菌(*Porphyromonas gingivalis* 17)生存之結果。由圖4之試驗結果可知，本

第 14 頁，共 17 頁(發明說明書)

發明之嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株以及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株皆具有顯著的抑制效果。

【0034】 如圖5所示為本發明之嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、瑞士乳酸桿菌RE-78菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株以及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株抑制牙齦卟啉單孢菌(*Porphyromonas gingivalis* 18)生存之結果。除了瑞士乳酸桿菌RE-78菌株以外，本發明之嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、唾液乳酸桿菌AP-32菌株、路乳酸桿菌GL-104菌株、副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株以及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株皆具有顯著的抑制效果。

【0035】 表3所示為本發明之乳酸菌菌株對於口腔病原菌抑制率百分比分析。對於五株病原菌皆有抑制能力之菌株為嗜酸乳酸桿菌F-1菌株、鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株以及副乾酪乳酸桿菌ET-66菌株，其中，鼠李糖乳酸桿菌CT-53菌株對於變形鏈球菌(*Streptococcus mutans*)抑制效果最好；而路乳酸桿菌GL-104菌株以及副乾酪乳酸桿菌GL-156菌株則可以抑制四株口腔病原菌，對於變形鏈球菌(*Streptococcus mutans*)並無抑制能力；唾液乳酸桿菌AP-32菌株以及瑞士乳酸桿菌RE-78菌株則能抑制三株口腔病原菌，對於變形鏈球菌(*Streptococcus mutans*)以及放線共生放線桿菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)並無抑制能力，其中唾液乳酸桿菌AP-32菌株對於能夠抑制的三株病原菌，抑制能力皆高達90%以上，且這三株口腔病原菌皆與產生口臭之原因息息相關，因此唾液乳酸桿菌AP-32菌株擁有在口氣清新相關產品應用上的能力。

表3 七株乳酸菌菌株抑制口腔病原菌之抑制率

| 組別 | 口腔致病菌株抑制率(%) | | | | |
|----------------------|--------------|---------------|--------------|-------------|-------------|
| | 變形鏈球菌 | 具核梭桿菌 多型亞種 | 放線共生 放線桿菌 | 牙齦卟啉 單孢菌 | 牙齦卟啉單 孢菌 |
| 嗜酸乳酸桿菌 F-1 菌株 | 6.81±8.95 | 78.53±1.05 | 21.35±0.88 | 94.83±0.96 | 85.14±0.79 |
| 唾液乳酸桿菌 AP-32 菌株 | -16.07±26.03 | 93.77±0.23 | -34.96±5.57 | 99.1±0.18 | 99.9±0.01 |
| 路乳酸桿菌 GL-104 菌株 | -25.02±12.13 | 96.31±0.42 | 9.5±16.65 | 53.56±5.93 | 73.36±1.21 |
| 副乾酪乳酸桿菌 GL-156 菌株 | -8.8±19.77 | 96.93±0.19 | 4.05±0.49 | 66.90±5.99 | 56.44±1.91 |
| 瑞士乳酸桿菌 RE-78 菌株 | -6.38±11.05 | 100.00±0.00 | -17.05±6.73 | 98.77±0.18 | 19.57±7.94 |
| 鼠李糖乳酸桿菌 CT-53 菌株 | 38.83±10.25 | 60.85±6.08 | 25.16±11.06 | 77.37±3.21 | 78.78±3.1 |
| 副乾酪乳酸桿菌 ET-66 菌株 | 14.18±2.25 | 96.84±0.05 | 52.92±1.15 | 73.64±2.62 | 99.72±0.02 |

【0036】 綜合以上試驗結果，本發明之含乳酸菌菌株之食品組合物以及醫藥組合物可抑制口腔病原菌之生長，可作為降低人體齲齒、牙周病及口氣異味等應用。較佳者，可分泌過氧化氫之乳酸菌菌株對於牙齒的美白亦有作用能力。本發明找出對人體無副作用且有益健康的維持口腔健康乳酸菌作為維持口腔健康的新選擇。

【0037】 以上所述之實施例僅是為說明本發明之技術思想及特點，其目的在使熟習此項技藝之人士能夠瞭解本發明之內容並據以實施，當不能以之限定本發明之專利範圍，即大凡依本發明所揭示之精神所作之均等變化或修飾，仍應涵蓋在本發明之專利範圍內。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

- 【0038】 食品工業發展研究所、2010年04月08日、BCRC910469
- 【0039】 食品工業發展研究所、2009年07月30日、BCRC910437
- 【0040】 食品工業發展研究所、2008年10月29日、BCRC910404
- 【0041】 食品工業發展研究所、2014年08月21日、BCRC910646
- 【0042】 食品工業發展研究所、2011年12月27日、BCRC910537
- 【0043】 食品工業發展研究所、2010年04月08日、BCRC910468
- 【0044】 食品工業發展研究所、2016年11月03日、BCRC 910753

109年5月28日修訂

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種含乳酸菌菌株之食品組合物，包含：

具有抑制口腔病原菌之活性效果之乳酸菌菌株，該乳酸菌菌株選自以下群組中之至少一經分離的乳酸菌菌株：嗜酸乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*) F-1 菌株，寄存編號 BCRC 910469、唾液乳酸桿菌 (*Lactobacillus salivarius*) AP-32 菌株，寄存編號 BCRC 910437、路乳酸桿菌 (*Lactobacillus reuteri*) GL-104 菌株，寄存編號 BCRC 910404、副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) GL-156 菌株，寄存編號 BCRC 910646、瑞士乳酸桿菌 (*Lactobacillus helveticus*) RE-78 菌株，寄存編號 BCRC 910537、鼠李糖乳酸桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) CT-53 菌株，寄存編號 BCRC 910468、以及副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) ET-66 菌株，寄存編號 BCRC 910753，上述菌株均寄存於台灣新竹食品工業發展研究所；以及

生理上可接受之賦形劑或稀釋劑。

【第2項】如請求項1所述之含乳酸菌菌株之食品組合物，其中該乳酸菌菌株為具有活性的菌株。

【第3項】如請求項1所述之含乳酸菌菌株之食品組合物，其中該乳酸菌菌株為去活性的菌株。

【第4項】如請求項1所述之含乳酸菌菌株之食品組合物，其中該賦形劑或稀釋劑為一食品。

【第5項】如請求項4所述之含乳酸菌菌株之食品組合物，其中該食品包含乳製飲品、茶、咖啡、口香糖及潔牙糖、寵物用肉乾或以上的組合。

【第6項】一種含乳酸菌菌株之醫藥組合物，包含：

具有抑制口腔病原菌之活性效果之乳酸菌菌株，該乳酸菌菌株選自以下群組中之至少一經分離的乳酸菌菌株：嗜酸乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*) F-1 菌株，寄存編號 BCRC 910469、唾液乳酸桿菌 (*Lactobacillus salivarius*) AP-32 菌株，寄存編號 BCRC 910437、路乳酸桿菌 (*Lactobacillus reuteri*) GL-104 菌株，寄存編號 BCRC 910404、副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) GL-156 菌株，寄存編號 BCRC 910646、瑞士乳酸桿菌 (*Lactobacillus helveticus*) RE-78 菌株，寄存編號 BCRC 910537、鼠李糖乳酸桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) CT-53 菌株，寄存編號 BCRC 910468、以及副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) ET-66 菌株，寄存編號 BCRC 910753，上述菌株均寄存於台灣新竹食品工業發展研究所；以及

醫藥上可接受之賦形劑或稀釋劑。

【第7項】如請求項6所述之含乳酸菌菌株之醫藥組合物，其中該乳酸菌菌株為具有活性的菌株。

【第8項】如請求項6所述之含乳酸菌菌株之醫藥組合物，其中該乳酸菌菌株為去活性的菌株。

【第9項】如請求項6所述之含乳酸菌菌株之醫藥組合物，其為口服劑型或外用劑型。

【第10項】一種含乳酸菌菌株之口腔清潔組合物，包含：

具有抑制口腔病原菌之活性效果之乳酸菌菌株，該乳酸菌菌株選自以下群組中之至少一經分離的乳酸菌菌株：嗜酸乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*) F-1 菌株，寄存編號 BCRC 910469、唾液

第 2 頁，共 3 頁(發明申請專利範圍)

乳酸桿菌 (*Lactobacillus salivarius*) AP-32 菌株，寄存編號 BCRC 910437、路乳酸桿菌 (*Lactobacillus reuteri*) GL-104 菌株，寄存編號 BCRC 910404、副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) GL-156 菌株，寄存編號 BCRC 910646、瑞士乳酸桿菌 (*Lactobacillus helveticus*) RE-78 菌株，寄存編號 BCRC 910537、鼠李糖乳酸桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) CT-53 菌株，寄存編號 BCRC 910468、以及副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) ET-66 菌株，寄存編號 BCRC 910753，上述菌株均寄存於台灣新竹食品工業發展研究所；以及

生理上可接受之賦形劑、稀釋劑或載體。

【第11項】如請求項10所述之含乳酸菌菌株之口腔清潔組合物，其中該乳酸菌菌株為具有活性的菌株。

【第12項】如請求項10所述之含乳酸菌菌株之口腔清潔組合物，其中該乳酸菌菌株為去活性的菌株。

【第13項】如請求項10所述之含乳酸菌菌株之口腔清潔組合物，其中該賦形劑或稀釋劑為牙膏、潔牙粉、漱口水、口氣清新噴霧、塗氟劑、假牙清潔劑、寵物用潔牙膠或寵物用化毛膏。

【第14項】如請求項10所述之含乳酸菌菌株之口腔清潔組合物，其中該載體為牙刷、牙間刷、牙線、口腔棉棒或寵物用潔牙骨。

【發明圖式】

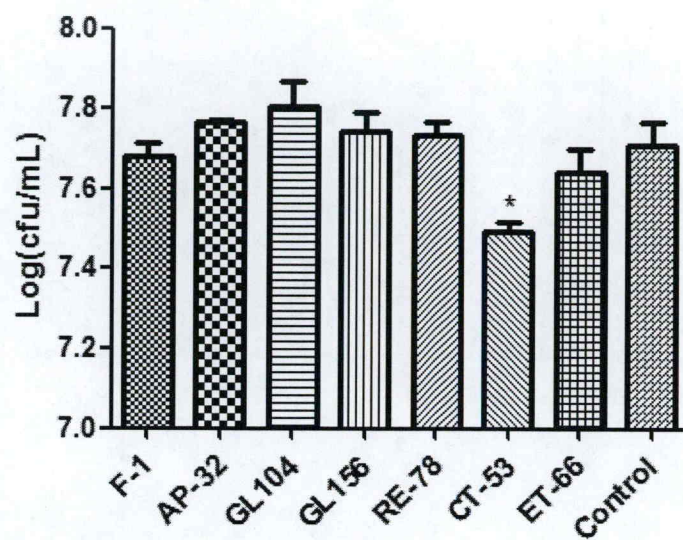


圖 1

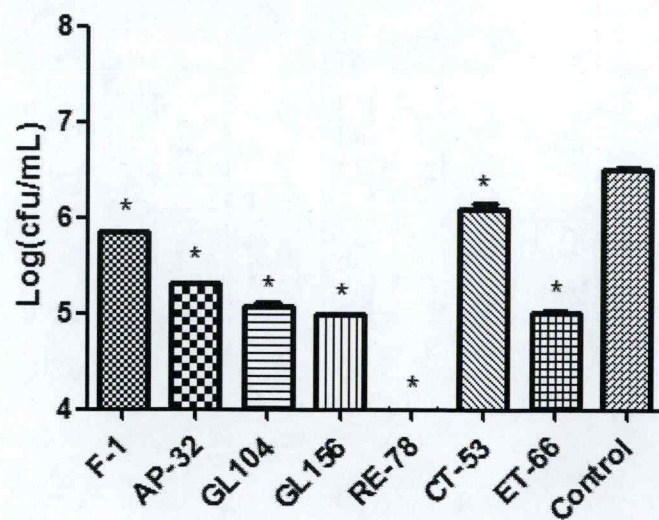


圖 2

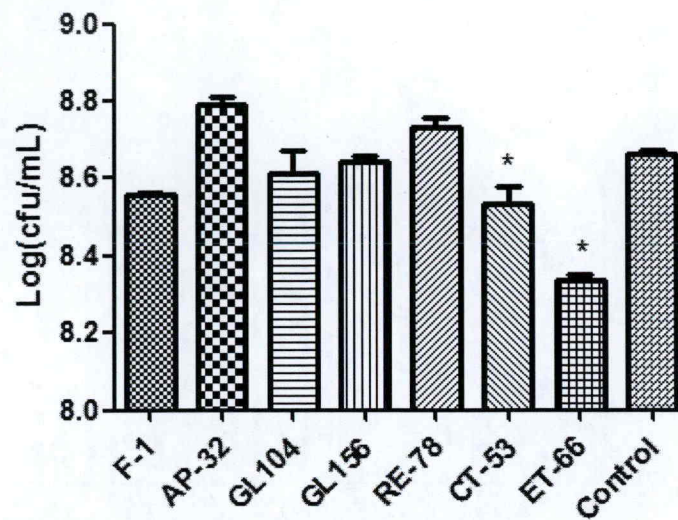


圖 3

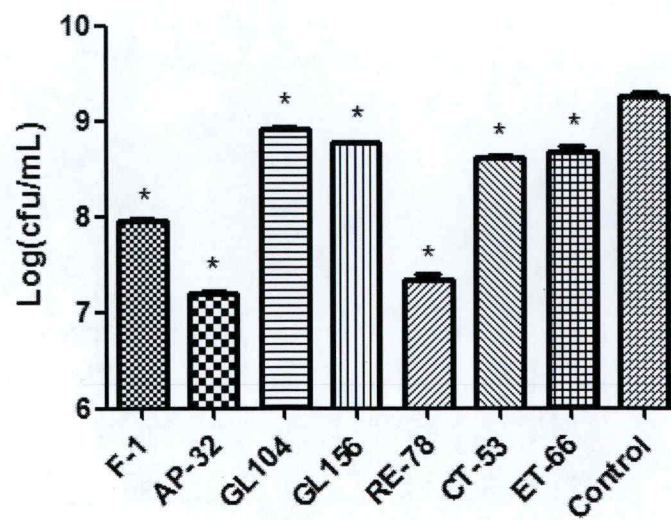


圖 4

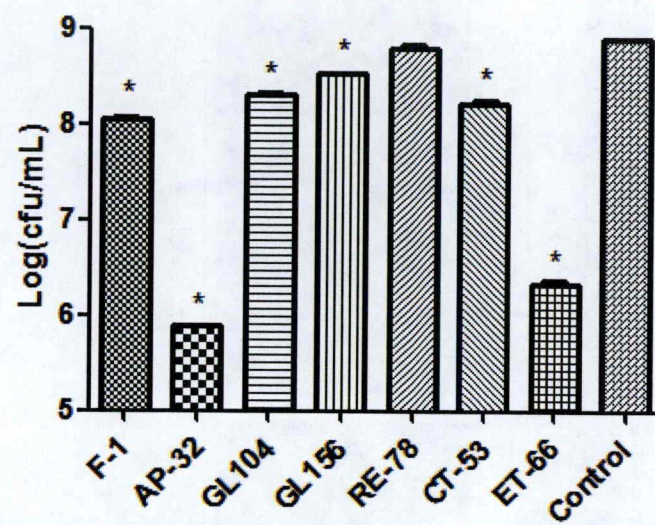







圖 5

| | | | | | | | | | | | |
|---|---------------|---|-----------------|---|-----------------|--|-------------------|---|-----------------|---|------------------|
|  | 嗜酸乳酸桿菌 F-1 |  | 唾液乳酸桿菌 AP-32 |  | 路乳酸桿菌 GL-104 |  | 副乾酪乳酸桿菌 GL-156 |  | 瑞士乳酸桿菌 RE-78 |  | 鼠李糖乳酸桿菌 CT-53 |
|  | 嗜酸乳酸桿菌 6 |  | 唾液乳酸桿菌 28 |  | 路乳酸桿菌 23 |  | 副乾酪乳酸桿菌 9 |  | 瑞士乳酸桿菌 76 |  | 鼠李糖乳酸桿菌 134 |

圖 6

| PIPES 上清液 | | | | | | | | | | | |
|---|--------|---|--------|---|---------|---|--------|---|--------|---|-----------|
|  | 0 mg/L |  | 5 mg/L |  | 10 mg/L |  | 0 mg/L |  | 5 mg/L |  | 1.75 mg/L |
| 嗜酸乳酸桿菌 F-1 | | 唾液乳酸桿菌 AP-32 | | 路乳酸桿菌 GL-104 | | 副乾酪乳酸桿菌 GL-156 | | 瑞士乳酸桿菌 RE-78 | | 鼠李糖乳酸桿菌 CT-53 | |

| 沉降菌體 | | | | | | | | | | | |
|---|----------|---|--------|---|--------|---|--------|---|--------|---|----------|
|  | 0.5 mg/L |  | 2 mg/L |  | 5 mg/L |  | 0 mg/L |  | 5 mg/L |  | 0.5 mg/L |
| 嗜酸乳酸桿菌 F-1 | | 唾液乳酸桿菌 AP-32 | | 路乳酸桿菌 GL-104 | | 副乾酪乳酸桿菌 GL-156 | | 瑞士乳酸桿菌 RE-78 | | 鼠李糖乳酸桿菌 CT-53 | |

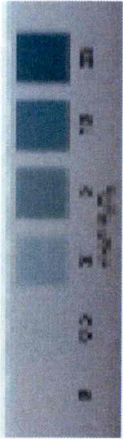


圖 7