



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108048347 A

(43)申请公布日 2018.05.18

(21)申请号 201711276356.8 *A61K 35/747*(2015.01)

(22)申请日 2017.12.06 *A61P 1/02*(2006.01)

(83)生物保藏信息 *A23L 33/135*(2016.01)

CGMCC No.14410 2017.07.12 *C12R 1/225*(2006.01)

(71)申请人 河北一然生物科技有限公司
地址 050000 河北省石家庄市高新技术产
业开发区北区邦秀东路16号

(72)发明人 赵林森 杨玉红 鄢梦洁 马新颖
齐世华 李华文 路江浩 崔文静
李玲

(74)专利代理机构 石家庄开言知识产权代理事
务所(普通合伙) 13127
代理人 赵俊娇

(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

鼠李糖乳杆菌、鼠李糖乳杆菌制剂及其用途

(57)摘要

本发明公开了一种鼠李糖乳杆菌,菌株(Lactobacillus rhamnosus)LR863,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.14410。本发明的鼠李糖乳杆菌具有对变异链球菌、戈登链球菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、伴放线放线杆菌等口腔病原微生物显著的抑菌、杀菌作用,减少牙菌斑形成和降低龋齿、牙周炎等口腔疾病发生、发展的功效。本发明的鼠李糖乳杆菌制剂可包括鼠李糖乳杆菌活菌菌体、鼠李糖乳杆菌死菌菌体、鼠李糖乳杆菌的代谢产物及胞内提取物,是一款应用广泛、效果显著的口腔益生菌制剂,可用作广泛液态食品、固态食品、胶状食品、口腔清洁用品和口腔治疗药品的添加剂。

1. 一种鼠李糖乳杆菌，其特征在于：所述鼠李糖乳杆菌菌株(Lactobacillus rhamnosus) LR863，保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为CGMCC No.14410。

2. 根据权利要求1所述的鼠李糖乳杆菌，其特征在于：所述鼠李糖乳杆菌具有对口腔病原微生物抑菌、杀菌的用途。

3. 根据权利要求2所述的鼠李糖乳杆菌，其特征在于：所述口腔病原微生物包括变异链球菌、戈登链球菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、伴放线放线杆菌。

4. 根据权利要求1所述的鼠李糖乳杆菌，其特征在于：所述鼠李糖乳杆菌具有防治牙周炎的用途。

5. 根据权利要求1所述的鼠李糖乳杆菌，其特征在于：所述鼠李糖乳杆菌具有防治龋齿的用途。

6. 一种鼠李糖乳杆菌制剂，其特征在于：包括如权利要求1所述的鼠李糖乳杆菌活菌菌体、鼠李糖乳杆菌死菌菌体、鼠李糖乳杆菌的代谢产物及胞内提取物中的至少一种。

7. 根据权利要求6所述的鼠李糖乳杆菌制剂，其特征在于：所述鼠李糖乳杆菌制剂包括鼠李糖乳杆菌活菌冷冻干燥菌粉、鼠李糖乳杆菌死菌冷冻干燥菌粉、鼠李糖乳杆菌代谢产物冷冻干燥粉末、鼠李糖乳杆菌活菌及代谢产物冷冻干燥菌粉、鼠李糖乳杆菌死菌及代谢产物冷冻干燥菌粉。

8. 一种如权利要求6所述的鼠李糖乳杆菌制剂的用途，其特征在于：用作液态食品、固态食品、胶状食品、口腔清洁用品和口腔治疗药品的添加剂。

鼠李糖乳杆菌、鼠李糖乳杆菌制剂及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物领域,尤其涉及一种鼠李糖乳杆菌,以及鼠李糖乳杆菌制剂,还涉及该制剂的用途。

背景技术

[0002] 口腔内微生物群由700种微生物构成,存在多种病原微生物,临床常见的口腔疾病如龋齿、牙周炎和口臭等,都与致病菌或对口腔健康不利的微生物在口腔中的过量生长有关。目前预防和治疗口腔疾病多从减少变异链球菌发挥作用的角度出发,如通过使用漱口水、减少糖摄入等方式减少变异链球菌的数量,或通过机械去除牙菌斑等手段。益生菌(Probiotics)是一类对宿主有益的活性微生物的总称,能产生确切的健康功效从而改善宿主微生态平衡、发挥有益作用,因此,人们尝试使用益生菌来改善口腔环境达到防治口腔疾病的效果。

[0003] 益生菌有许多令人惊奇的功效,但这些不同的功效高度依赖于“菌株的特定性”,通过大量和长期的临床研究证实,某个特定的益生菌株具有某种明确的功能但并不意味着其他同种益生菌的不同菌株也必定有同样或相似的功能,如瑞卡福抑菌喷剂能帮助修复因致病菌感染造成的生殖系统疾病,但并不能说明任何其他的同类菌株产品也有同样的功效。而且国际上对益生菌的定义通常是活的、有足够数量并对宿主有益的微生物菌种才能称之为益生菌,因此使用益生菌达到防治口腔疾病的目的,需使益生菌在口腔环境下能维持活性并具有足够数量,否则无法达到有益效果。

发明内容

[0004] 为解决现有技术存在的不足,本发明提供了一种鼠李糖乳杆菌,该鼠李糖乳杆菌的活菌和死菌都具有抑制口腔致病微生物生长、杀灭口腔致病微生物的用途,能够防治牙周炎、龋齿等口腔疾病。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供的鼠李糖乳杆菌,菌株(Lactobacillus rhamnosus) LR863,已于2017年7月12日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.14410。

[0006] 根据菌株的菌落、菌体形态特征、16SrRNA序列分析及API细菌鉴定系统分析结果来确认菌株在分类学地位,发现LR863菌株为鼠李糖乳杆菌。该菌株在形态学及一般性质上的特征如下:

[0007] 1、菌体或菌落形态:

[0008] 菌体形态:菌体在显微镜下呈杆状。菌体成单、成对或成链,不形成芽孢,革兰氏染色阳性,无运动性,无鞭毛。

[0009] 菌落形态:固体培养基上形成明显菌落,直径在0.5-1mm之间,圆形,边缘整齐,白色不透明,表面光滑湿润。

[0010] 2、生理生化特征:

[0011] 氧化酶阴性,接触酶阴性。

[0012] 利用API 50CH试剂验证此乳酸菌种的碳水化合物代谢性能。API 50CH 试剂可用于鉴定菌株在属或种上的差异。经由分析结果确认此乳酸菌种与鼠李糖乳杆菌的碳水化合物代谢活性相同。

[0013] 最适生长温度为37℃,兼性厌氧。不具有致病性,不产毒素。

[0014] 作为对上述技术方案的限定,所述鼠李糖乳杆菌具有对口腔病原微生物抑菌、杀菌的用途。

[0015] 作为对上述技术方案的限定,所述口腔病原微生物包括变异链球菌、戈登链球菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、伴放线放线杆菌等。

[0016] 作为对上述技术方案的限定,所述鼠李糖乳杆菌具有防治牙周炎的用途。

[0017] 作为对上述技术方案的限定,所述鼠李糖乳杆菌具有防治龋齿的用途。

[0018] 本发明的鼠李糖乳杆菌,从健康口腔志愿者的口腔中分离得到,具有产细菌素、过氧化氢的特性,能够起到广谱抗菌、杀菌作用;其菌体具有较强的凝集能力,为乳酸菌在口腔环境中与其他微生物,尤其致病微生物共凝集提供了必要的条件;还具有较强的疏水性,为口腔中粘附和定植提供了有利条件;因此该鼠李糖乳杆菌对浮游状态的变异链球菌、牙龈卟啉单胞菌等口腔致病微生物的生长有抑制作用,能有效降低戈登链球菌的数量,进而减少牙菌斑的形成,减少牙周致病菌滋生的温床,避免细菌产生的毒素对造成牙龈发炎,及牙龈下齿槽骨骨质的流失,减低牙周病发生率,在预防、减少或治疗龋齿、牙周炎的用途方面具有应用价值,还能帮助维持正常的口腔微生态菌群,保障口腔健康。

[0019] 同时,本发明还提供了一种鼠李糖乳杆菌制剂,该制剂包括如上所述的鼠李糖乳杆菌活菌菌体、鼠李糖乳杆菌死菌菌体、鼠李糖乳杆菌的代谢产物及胞内提取物中的至少一种。

[0020] 作为对上述技术方案的限定,所述鼠李糖乳杆菌制剂包括鼠李糖乳杆菌活菌冷冻干燥菌粉、鼠李糖乳杆菌死菌冷冻干燥菌粉、鼠李糖乳杆菌代谢产物冷冻干燥粉末、鼠李糖乳杆菌活菌及代谢产物冷冻干燥菌粉、鼠李糖乳杆菌死菌及代谢产物冷冻干燥菌粉。

[0021] 通常益生菌制剂需为活菌并在足够数量前提下才能发挥有益效果,本发明的鼠李糖乳杆菌,不仅其活菌具有对口腔病原微生物抑菌、杀菌作用,减少牙菌斑形成和降低龋齿、牙周炎等口腔疾病发生、发展的功效,其死菌同样具有抑菌、杀菌作用和防治口腔疾病的功效。分别由鼠李糖乳杆菌活菌菌体、鼠李糖乳杆菌死菌菌体、鼠李糖乳杆菌的代谢产物及胞内提取物中任一种或混合物形成的益生菌制剂,不受活菌数量及活性的限制,更利于在宿主体内发挥作用,是一款应用广泛、效果显著的口腔益生菌制剂。

[0022] 同时,本发明提供了上述鼠李糖乳杆菌制剂的用途,可用作液态食品、固态食品、胶状食品、口腔清洁用品和口腔治疗药品的添加剂。

[0023] 基于本发明鼠李糖乳杆菌的活菌、死菌均具有抑菌、杀菌作用和防治口腔疾病功效的优势,其使用形式广泛,可广泛应用于液态食品,如果汁、酸奶、茶饮料等;固态食品,如口含片、固体饮料、糖果、巧克力、饼干等;胶状食品,如果冻、口香糖、优格、布丁等;口腔清洁用品,如牙膏、漱口水等;和口腔治疗药品,如口含片、软膏等。

[0024] 综上所述,本发明的鼠李糖乳杆菌,菌株(*Lactobacillus rhamnosus*) LR863,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.14410,具有对

变异链球菌、戈登链球菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、伴放线放线杆菌等口腔病原微生物显著的抑菌、杀菌作用,和减少牙菌斑形成,降低龋齿、牙周炎等口腔疾病发生、发展的功效。本发明的鼠李糖乳杆菌制剂由活菌菌体、死菌菌体、代谢产物及胞内提取物中的至少一种制成,不受活菌数量及活性的限制,更利于在宿主体内发挥作用,是一款应用广泛、效果显著的口腔益生菌制剂,可用作广泛液态食品、固态食品、胶状食品、口腔清洁用品和口腔治疗药品的添加剂。

附图说明

[0025] 图1:本发明实施例所述鼠李糖乳杆菌LR863活菌对五种口腔致病菌的共凝集能力;

[0026] 图2:本发明实施例所述鼠李糖乳杆菌LR863死菌对五种口腔致病菌的共凝集能力。

具体实施方式

[0027] 下面将结合实施例,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0028] 实施例一

[0029] 本实施例涉及本发明鼠李糖乳杆菌菌株的分离、纯培养和鉴定。

[0030] 添加碳酸钙的MRS固体培养基:葡萄糖20.0g;蛋白胨10.0g;牛肉浸粉 10.0g;酵母浸粉5.0g;柠檬酸氢二铵2.0g;乙酸钠5.0g;磷酸氢二钾2.0g;硫酸镁0.58g;硫酸锰0.25g;吐温80 1.0mL;蒸馏水1000mL;调节pH6.2-6.4;再添加琼脂15.0g;碳酸钙5.0g,115℃灭菌20min。

[0031] 采集健康口腔志愿者的唾液和牙菌斑样本,加入无菌生理盐水制成1:10 的样品匀液,充分震荡均匀,8000rpm离心5min,收集沉淀,加入适量生理盐水将沉淀充分混匀,将混匀后的悬浮液涂布于添加碳酸钙的MRS固体培养基中,37℃厌氧培养48h,挑选周围形成溶钙圈的典型菌落,进一步划线纯化,挑选革兰氏染色镜检为阳性、接触酶实验阴性的菌株。采用琼脂扩散法进一步筛选出能够抑制变异链球菌和戈登链球菌的乳酸菌。

[0032] 将分离得到的一株抑菌活性最佳的乳酸菌命名为LR863。通过生理生化鉴定,同时采用PCR扩增该菌16S rRNA序列,进行比对分析,结果显示该序列与NCBI数据库中鼠李糖乳杆菌的同源性达99%,因此将该菌鉴定为鼠李糖乳杆菌,命名为鼠李糖乳杆菌LR863 (*Lactobacillus rhamnosus* LR863),并于2017年7月12日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏中心地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏编号为CGMCC No.14410。

[0033] 实施例二

[0034] 本实施例涉及本发明鼠李糖乳杆菌菌株的功能性鉴定。

[0035] 实施例2.1

[0036] 菌株 (*Lactobacillus rhamnosus*) LR863产过氧化氢能力检测。

[0037] 检测方法:将该菌株接种到MRS培养基中37℃静置培养,将发酵液4℃, 8000rpm离心20min收集上清液,用过氧化氢试剂盒检测上清液中过氧化氢的含量。

[0038] 检测结果:菌株LR863培养18h、24h、30h产过氧化氢量分别为0.161g/L、0.104g/L和0.073g/L,证明该菌株具有产过氧化氢的能力。

[0039] 实施例2.2

[0040] 菌株 (*Lactobacillus rhamnosus*) LR863的代谢产物对口腔致病菌抑菌能力检测。

[0041] (一) 检测方法:

[0042] 本实例中所用的口腔致病菌包括:

[0043] 变异链球菌作为龋齿致病菌使用BHI培养基,37℃厌氧培养18h;

[0044] 戈登链球菌作为牙菌斑生物膜基础菌株使用BHI培养基,37℃厌氧培养 18h;

[0045] 牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、伴放线放线杆菌作为牙周致病菌,使用 TSA培养基添加有5%脱纤维养血、0.1%维生素K1,37℃厌氧培养5-7天。

[0046] 将鼠李糖乳杆菌LR863按3%接种量接于MRS培养基中,37℃静置培养 24h,发酵液经4℃,8000rpm离心20min,收集上清液并用0.22μm微孔滤膜过滤得到LR863无细胞发酵上清液。

[0047] 分别调节变异链球菌和戈登链球菌的每种菌液浓度约为 1×10^8 cfu/mL,取 100μL致病菌菌液与10mL固体BHI培养基混匀,倒入无菌培养皿中,采用打孔法,每孔加入100μL乳酸菌发酵上清液,37℃静置培养20-24h,测量抑菌圈大小。

[0048] 分别调节牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、伴放线放线杆菌的每种菌液浓度约为 1×10^8 cfu/mL,取100μL致病菌菌液均匀涂布于20mL固体TSA培养基上,采用牛津杯法,每个牛津杯中加入100μL乳酸菌发酵上清液,37℃静置培养5-7天,测量抑菌圈大小。

[0049] 检测结果:如表1所示;

[0050] 表1鼠李糖乳杆菌LR863对5株口腔致病菌的抑菌能力

[0051]

| 致病菌 | 抑菌圈直径/mm |
|---------|------------|
| 变异链球菌 | 15.35±0.06 |
| 戈登链球菌 | 16.08±0.15 |
| 牙龈卟啉单胞菌 | 15.12±0.29 |
| 具核梭杆菌 | 16.56±0.36 |
| 伴放线放线杆菌 | 15.82±0.17 |

[0052] 由上表可见,鼠李糖乳杆菌LR863及其代谢产物对5株口腔致病菌具有较强的抑制作用。

[0053] (二)、检测方法:对鼠李糖乳杆菌LR863抑菌物质的初步探究实验。

[0054] 将鼠李糖乳杆菌LR863发酵上清液用1.0mol/L的氢氧化钠调节pH值至 pH5.5过滤除菌,并以pH5.5的MRS培养基和没有调节pH值的发酵上清液过滤除菌作为对照,将变异链球菌作为指示菌检测抑菌活性,以此来排除酸性物质对抑菌活性的影响。取四份鼠李糖乳杆菌LR863发酵上清液,分别调至各蛋白酶最适pH值,即调节pH值分别为pH7.0, pH7.0, pH2.0, pH7.0,然后分别添加过氧化氢酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶和蛋白酶K,使四种蛋白酶终

浓度均为1mg/mL, 37℃水浴3h, 将上清液pH值调制pH5.5, 过滤除菌。并以相同酶处理的MRS培养基作为空白对照, 同时将未经过酶处理的pH5.5 发酵上清液作为对照。以此来探究蛋白酶对抑菌物质活性的影响。

[0055] 检测结果: 如表2所示;

[0056] 表2不同处理对鼠李糖乳杆菌LR863代谢产物中有效抑菌物质的影响

[0057]

| 待测样品 | 抑菌圈直径/mm |
|--------------|------------|
| 未经处理的上清液 | 15.58±0.21 |
| pH5.5 上清液 | 13.67±0.15 |
| [0058] | |
| 过氧化氢酶处理的上清液 | 11.96±0.23 |
| 胰蛋白酶处理的上清液 | 10.06±0.04 |
| 胃蛋白酶处理的上清液 | 10.23±0.52 |
| 蛋白酶 K 处理的上清液 | 9.5±0.11 |

[0059] 从表2可以看出抑菌物质的抑菌活性具有pH依赖性, 将发酵上清液的 pH调至pH5.5后其抑菌活性下降, 通过调节发酵上清液pH值排除酸类物质后仍具有抑菌活性表明上清液中还含有其他的抑菌活性成分。发酵上清液经过氧化氢酶处理后的抑菌结果可以看出, 鼠李糖乳杆菌LR863代谢产物中含有过氧化氢。经胰蛋白酶、胃蛋白酶和蛋白酶K处理后的发酵上清液抑菌活性下降, 表明鼠李糖乳杆菌LR863代谢产物中可能含有蛋白类或多肽类的细菌素。

[0060] 实施例2.3

[0061] 菌株 (*Lactobacillus rhamnosus*) LR863的与致病菌共凝集能力检测。

[0062] 检测方法: 将鼠李糖乳杆菌LR863和致病菌分别5000rpm离心15min, 收集菌体用pH7.0的PBS洗涤菌体, 调节两种菌液浓度为 $OD_{600}=0.6\pm 0.05$, 将两种菌液等体积混合, 充分震荡2min, 37℃静置, 每隔1h于相同液面高度贴壁缓慢吸取上清1mL, 测定不同时间的 OD_{600} 吸光值, 并按以下公式计算交互凝集率:

$$[(A_x + A_y) - 2A_{mix}]$$

$$[0063] \text{交互凝集率} = \frac{[(A_x + A_y) - 2A_{mix}]}{A_x + A_y} \times 100\%$$

[0064] 其中 $A_x=0h$ 鼠李糖乳杆菌的吸光值, $A_y=0h$ 致病菌的吸光值, $A_{mix}=t h$ 后混合的吸光值。

[0065] 检测结果: 见图1的LR863活菌对五种口腔致病菌的共凝集能力趋势图, 及图2的LR863死菌对五种口腔致病菌的共凝集能力趋势图所示。

[0066] 实施例2.4

[0067] 菌株 (*Lactobacillus rhamnosus*) LR863的对溶菌酶耐受性检测。

[0068] 检测方法: 取1mL鼠李糖乳杆菌菌液 (10^7 cfu/mL), 加至20mL冷却至 50℃的固体MRS培养基中混合均匀, 倒入灭菌培养皿中, 待培养基凝固后放置牛津杯, 将浓度分别为

0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.4mg/mL、0.6mg/mL、0.8mg/mL、1.0mg/mL、2.0mg/mL溶菌酶溶液100 μ L加入牛津杯中,37 $^{\circ}$ C培养24h,根据抑菌圈的情况分析鼠李糖乳杆菌对溶菌酶的耐受性,从而判断溶菌酶对鼠李糖乳杆菌存活率的影响,结果见表3所示;

[0069] 表3溶菌酶对鼠李糖乳杆菌LR863的影响

[0070]

| 溶菌酶浓度 (mg/mL) | 0 | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 2.0 |
|------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 鼠李糖乳杆菌 存活率% | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

[0071] 由表3可以看出,浓度为0-2.0mg/mL溶菌酶不影响鼠李糖乳杆菌LR863 的生长,表明其对溶菌酶具有较强的耐受性,口腔中溶菌酶浓度约为 1-57 μ g/mL,所以鼠李糖乳杆菌LR863在口腔中的存活不受溶菌酶影响。

[0072] 实施例2.5

[0073] 菌株(Lactobacillus rhamnosus)LR863的粘附性检测

[0074] 检测方法:菌株LR863发酵液离心5000r/min,10min,收集菌体,用PBS (pH6.8)洗涤离心一遍,用PBS (pH6.8)重悬菌体,调整菌液浓度在560nm 波长下,吸光值约为1.000,记为A₀。取4mL菌悬液分别与0.8mL二甲苯、乙酸乙酯、氯仿混合,振荡30s、静置10s、振荡30s、静置20min,待两相分层后,吸取水相测定在560nm波长下的吸光值,记为A,并按以下公式计算疏水率:

[0075] 疏水率(CSH%) = $(1-A/A_0) \times 100\%$

[0076] 每组实验做3个平行,取平均值。

[0077] 检测结果:如表4所示;

[0078] 表4鼠李糖乳杆菌LR863的粘附性结果

[0079]

| 有机溶剂 \ 菌株 | 疏水率% | |
|-----------|------------------|------------------|
| | LR863 活菌 | LR863 死菌 |
| 二甲苯 | 76.91 \pm 4.14 | 61.04 \pm 0.31 |
| 氯仿 | 87.46 \pm 1.97 | 78.82 \pm 2.62 |
| 乙酸乙酯 | 41.88 \pm 2.35 | 29.81 \pm 1.39 |

[0080] 根据疏水率标准:疏水率大于50%为高疏水性,介于20%和50%为中度疏水,小于20%为非疏水。由表4结果可见,鼠李糖乳杆菌LR863具有良好的疏水性,表面疏水性与粘附作用呈正相关,因而其在口腔中具有相对较高的粘附能力。

[0081] 实施例三

[0082] 本实施例涉及菌株(Lactobacillus rhamnosus)LR863的临床应用。

[0083] 菌株(Lactobacillus rhamnosus)LR863的应用形式广泛,可用作液态食品、固态食品、胶状食品、口腔清洁用品和口腔治疗药品等的添加剂。

[0084] 以菌株(Lactobacillus rhamnosus)LR863的口含片临床试验为例。

[0085] 口含片的制备:由鼠李糖乳杆菌LR863冻干菌粉、山梨糖醇、全脂奶粉、硬脂酸镁等组分制成口含片,活菌口含片中鼠李糖乳杆菌LR863的活菌数达到 1×10^8 cfu/g;死菌口含片中鼠李糖乳杆菌LR863的死菌数达到 1×10^8 个/g。对照组口含片将鼠李糖乳杆菌LR863冻干菌粉用等量全脂奶粉代替。

[0086] 鼠李糖乳杆菌LR863冻干菌粉的制备,按常规微生物培养方法于37℃静置培养20~30h,采用补碱工艺培养过程保持pH值一定,保证鼠李糖乳杆菌生长的最适环境。通过离心方式收集鼠李糖乳杆菌活菌菌体;其代谢产物和培养浓缩液通过离心鼠李糖乳杆菌发酵液的方式收集;鼠李糖乳杆菌的胞内产物通过物理方法破壁后进行收集;死菌菌体由活菌菌体以物理热灭活方式制成。

[0087] 检测方法:采用双盲试验将25名20-50岁的受试者随机分成三组,第一组和第二组每日三餐后30min,分别食用LR863活菌口含片、LR863死菌口含片,第三组食用未添加LR863的空白对照口含片,连续食用两周,监测受试者口腔内变异链球菌和牙龈卟啉单胞菌的数量变化。

[0088] 其中,口腔内变异链球菌和牙龈卟啉单胞菌采用荧光定量PCR进行定量分析。受试者的口腔样品采集方法为,在试吃开始前用牙线采集受试者牙菌斑样本,作为上述实验的前值,试吃2周后,同样用牙线收集相同位置的牙菌斑样本,并通过荧光定量PCR进行定量分析评价上述实验效果。受试者服用口含片后口腔中变异链球菌和牙龈卟啉单胞菌数量较试吃前显著性下降即判定为有效,受试者在服用口含片后口腔中变异链球菌和牙龈卟啉单胞菌数量维持不变或致病菌数量增加则判定为无效。

[0089] 每组有效率% = 该组有效受试者人数 / 该组总人数 \times 100%

[0090] 检测结果:如表5所示;

[0091] 表5服用2周后每组受试人群有效率

[0092]

| 实验分组 | 有效率% |
|-----------|-------|
| LR863 活菌组 | 73.3% |
| LR863 死菌组 | 61.1% |
| 空白对照组 | 20% |

[0093] 由表5结果可见,本发明的鼠李糖乳杆菌LR863,其活菌制剂、死菌制剂的临床应用有效率都十分显著,具有推广应用价值。

[0094] 综上所述,本发明的鼠李糖乳杆菌,菌株 (*Lactobacillus rhamnosus*) LR863,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.14410,具有产细菌素、过氧化氢的特性,能够起到广谱抗菌、杀菌作用;其菌体具有较强的凝集能力,为乳酸菌在口腔环境中与其他微生物,尤其致病微生物共凝集提供了必要的条件;还具有较强的疏水性,为口腔中粘附和定植提供了有利条件;因此该鼠李糖乳杆菌对浮游状态的变异链球菌、戈登链球菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、伴放线放线杆菌等口腔致病微生物的生长有抑制作用,能有效降低变异链球菌的数量,进而减少牙菌斑的形成,减少牙周致病菌

滋生的温床,避免细菌产生的毒素对造成牙龈发炎,及牙龈下齿槽骨骨质的流失,减低牙周病发生率,在预防、减少或治疗龋齿、牙周炎的用途方面具有应用价值,还能帮助维持正常的口腔微生物菌群,保障口腔健康。本发明的鼠李糖乳杆菌制剂由活菌菌体、死菌菌体、代谢产物及胞内提取物中的至少一种制成,不受活菌数量及活性的限制,更利于在宿主体内发挥作用,是一款应用广泛、效果显著的口腔益生菌制剂,可广泛用作液态食品、固态食品、胶状食品、口腔清洁用品和口腔治疗药品的添加剂。

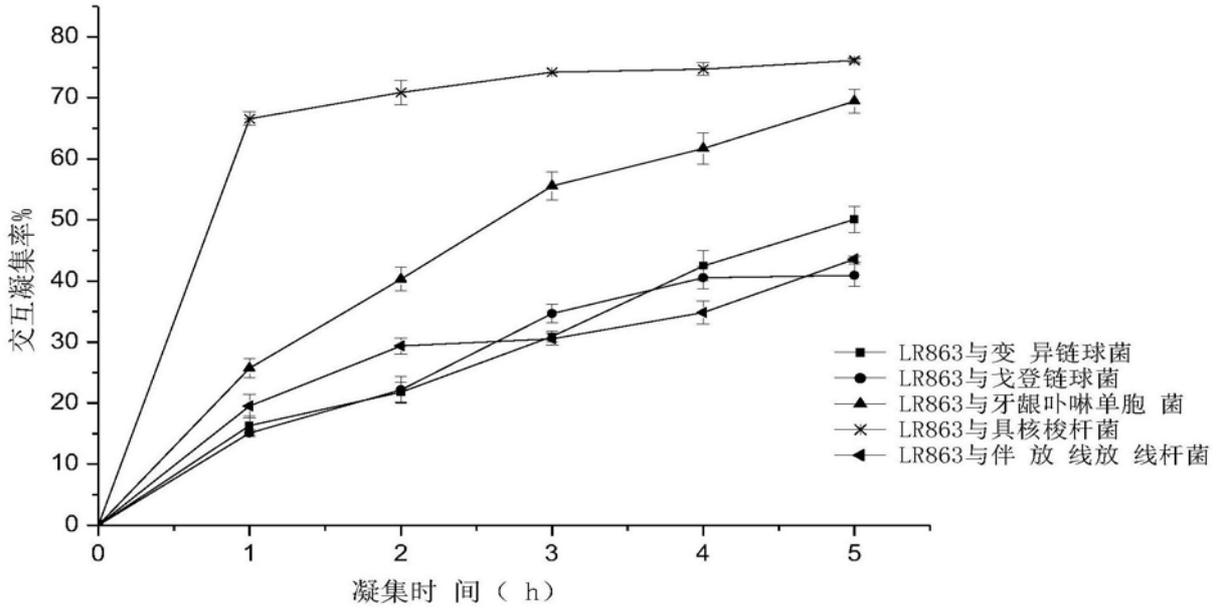


图1

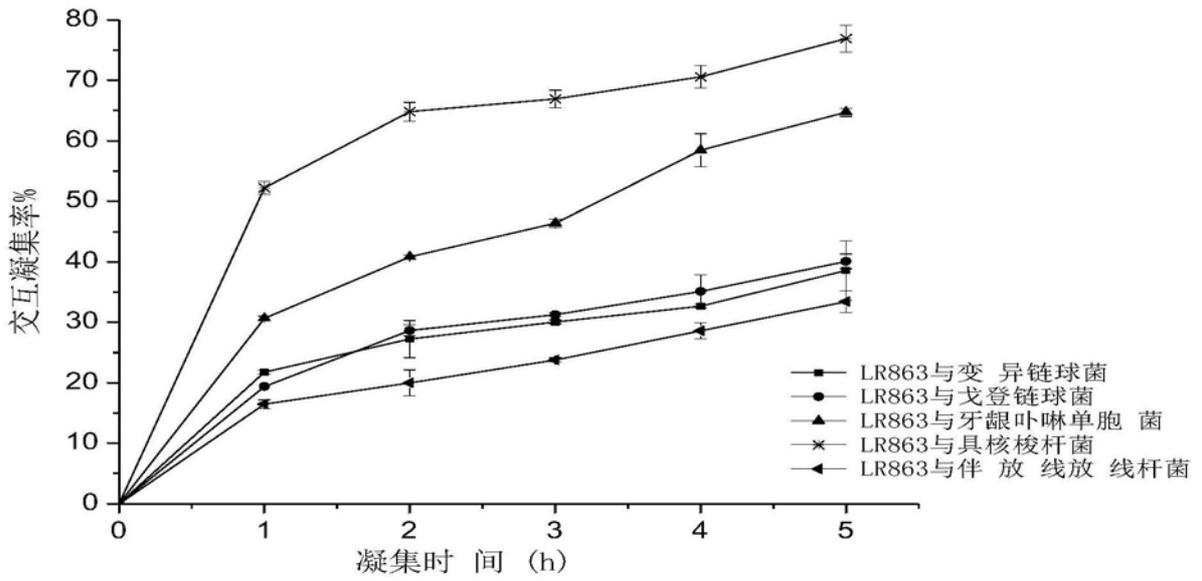


图2