



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102123715 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 13

(21) 申请号 200980131512. 9 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2009. 06. 12 *A61K 31/702* (2006. 01)
A61K 31/733 (2006. 01)
(30) 优先权数据 *A23L 1/30* (2006. 01)
08168054. 8 2008. 10. 31 EP *A61K 35/74* (2006. 01)
PCT/NL2008/050375 2008. 06. 13 NL *A61P 37/00* (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日
2011. 02. 12
(86) PCT申请的申请数据
PCT/NL2009/050333 2009. 06. 12
(87) PCT申请的公布数据
W02009/151331 EN 2009. 12. 17
(71) 申请人 N. V. 努特里奇亚
地址 荷兰祖特梅尔
(72) 发明人 B·鲍特派尔-范特兰德
L·M·J·尼普斯 A·J·纳奥塔
J·加森
(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
代理人 张广育 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 19 页

(54) 发明名称
刺激免疫系统的营养物

(57) 摘要

本发明公开了一种营养组合物,其包含非消化性寡糖与一种通过用双歧杆菌孵育一种水性底物获得的产物以及任选的一种通过用嗜热链球菌孵育一种水性底物获得的产物的结合物。所述结合物通过刺激 Th1 反应,和 / 或减弱 Th2 反应,改善免疫接种反应,改善对感染的抗性和 / 或减轻变应反应而协同地改善免疫系统。

1. 用于制造一种制品的方法,包括以下步骤:
 - a:将一种水性底物——其中所述底物包含选自乳、乳蛋白、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白水解物和乳糖中的至少一种——与双歧杆菌孵育以获得一种孵育混合物;
 - b:通过加热所述孵育混合物灭活所述双歧杆菌和/或通过离心和/或过滤从所述孵育混合物中除去双歧杆菌细胞;
 - c:将一种包含步骤 a 中获得的或步骤 b 中获得的混合物、优选步骤 b 中获得的混合物的组合物与至少两种不同的非消化性碳水化合物结合,其中所述非消化性碳水化合物的至少一种、优选两种选自低聚果糖、半乳寡糖、低聚葡萄糖、低聚阿拉伯糖、甘露寡糖、低聚木糖、低聚岩藻糖、阿拉伯半乳寡糖、葡甘露寡糖、半乳甘露寡糖、棉子糖、低聚乳果糖、含唾液酸的寡糖和糖醛酸寡糖。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述双歧杆菌属于短双歧杆菌 (*B. breve*) 种,优选短双歧杆菌菌株系 CNCM I-2219。
3. 前述权利要求任一项的方法,还包括以下步骤:
 - d:将一种底物与嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)——优选嗜热链球菌菌株系 CNCM I-1620——孵育以获得一种孵育混合物,其中所述底物选自乳、乳蛋白、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物和乳糖,和
 - e:通过加热步骤 d 的孵育混合物来灭活所述嗜热链球菌和/或通过离心和/或过滤从步骤 d 的孵育混合物中除去嗜热链球菌细胞,
 - f:将步骤 d 或 e——优选步骤 d——中获得的孵育混合物与步骤 a、b 或 c——优选步骤 a——中获得的孵育混合物结合起来。
4. 前述权利要求任一项的方法,其中所述非消化性碳水化合物为选自半乳寡糖和低聚果糖中的至少一种,优选至少两种。
5. 前述权利要求任一项的方法,其中步骤 b 后的制品包含少于 10^3 cfu 的活双歧杆菌/克所述制品干重。
6. 前述权利要求任一项的方法,其中在步骤 a 中,将所述底物用双歧杆菌接种和/或其中,如果存在,在步骤 d 中,将所述底物用链球菌以 1×10^2 至 1×10^{11} cfu/毫升底物的量接种,其中所述底物的 pH 为 4-8,且其中孵育在 20°C - 50°C 的温度下进行至少 2 小时。
7. 前述权利要求任一项的方法,其中步骤 b 和/或,如果存在,步骤 e 包括通过离心和/或过滤除去双歧杆菌和/或链球菌细胞。
8. 前述权利要求任一项的方法,其中步骤 b 和/或,如果存在,步骤 e 包括通过在高于 50°C 的温度下加热处理至少 5 分钟的灭活。
9. 前述权利要求任一项的方法,还包括一个干燥步骤。
10. 前述权利要求任一项的方法,其中在步骤 c 中仅加入一种非消化性碳水化合物,所述非消化性碳水化合物为低聚果糖。
11. 通过前述权利要求任一项的方法可获得的制品。
12. 包含权利要求 11 的制品或由其构成的营养组合物。
13. 权利要求 12 的组合物,所述组合物包含 0.5-10g 非消化性碳水化合物/100g 所述组合物干重。
14. 权利要求 12 和 13 任一项的组合物,在 20°C 和 100s^{-1} 的剪切速率下粘度为 1-60mPa.

S。

15. 婴幼儿营养物,以所述婴幼儿营养物的干重计,包含:
 - a. 总和为 0.5 至 10 重量%的半乳寡糖和低聚果糖,和
 - b. 5 至 99.5 重量%的权利要求 1-8 任一项的步骤 b 后获得的制品,其中步骤 a 中的双歧杆菌属于短双歧杆菌种,优选短双歧杆菌株系 CNCM I-2219
 - c. 以及任选的 2-94.5 重量%的权利要求 3-9 任一项的步骤 e 后获得的制品。
16. 权利要求 12-15 的组合物,用于为婴幼儿提供营养。
17. 权利要求 12-15 的组合物,用于治疗 and / 或预防疾病。
18. 权利要求 17 的组合物,用于治疗 and / 或预防婴幼儿疾病。
19. 权利要求 17 或 18 的组合物,用于治疗 and / 或预防选自哮喘、变态反应、特应性皮炎、变应性结膜炎、尘螨变态反应、荨麻疹和变应性鼻炎的免疫疾病。
20. 权利要求 17 或 18 的组合物,用于治疗 and / 或预防感染, and / 或用于增强疫苗接种反应。
21. 权利要求 17 或 18 的组合物,用于
 - 改善免疫系统,所述改善选自增强 Th1 反应,增加 Th1/Th2 平衡,以及减弱 Th2 反应,
 - 治疗和 / 或预防老年人的免疫衰老,
 - HIV 和 / 或 AIDS 患者,
 - 癌症患者,特别是正在或已经进行了化疗 and / 或放疗的癌症患者以及恶病质癌症患者,
 - 患有慢性肺阻塞疾病的患者, and / 或
 - 患有糖尿病的患者。

刺激免疫系统的营养物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于改善免疫系统反应的营养物及其制备方法。

背景技术

[0002] 免疫系统具有不同的可能的反应方式。免疫反应类型的一个决定性步骤是对不同 T 细胞亚群的刺激。所谓的 Th1 细胞主要产生刺激——例如对病原体和疫苗的——细胞免疫反应的细胞因子 (IFN- γ 、IL-12、IL-2)。相比之下, Th2 细胞主要产生 IL-4、IL-5 和 IL-10。这些细胞因子放大 IgE 介导的变态反应和炎症。Th1 和 Th2 相关细胞因子对抗性地作用, 并且 Th1 和 Th2 反应在正常生理环境中处于良好控制的平衡之下。Th1 和 Th2 反应都不是占优势的。如果这些反应不平衡, 那么 Th1 或 Th2 免疫反应的优势性在数种病理病症中起作用。

[0003] WO 2005/039319 和 WO 2006/091103 涉及一种用于非母乳喂养或部分母乳喂养的婴幼儿的包含短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) 和非消化性碳水化合物混合物的制品, 及其用于治疗或预防非母乳喂养或部分母乳喂养的婴幼儿中免疫疾病的应用。WO 2005/039597 涉及酸性寡糖和中性寡糖用于增强免疫系统以及治疗和 / 或预防免疫系统相关疾病的应用。WO 01/642255 涉及一种包含用于增强免疫反应的益生菌的营养组合物。WO 2004/0938998 和 WO 2004/0938999 涉及一种得自双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 培养物的免疫调节产品。

[0004] 已进行了大量努力以找到用于平衡和刺激免疫系统的其他方案。

发明内容

[0005] 令人惊奇地, 本发明人发现以下成分的结合物协同地刺激免疫系统: i) 一种通过如下方式获得的产物: 将一种水性底物——其中所述底物是选自乳、乳蛋白、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白水解物和乳糖中的至少一种——与双歧杆菌孵育, 然后通过加热所述孵育混合物灭活所述双歧杆菌并且 / 或者通过离心和 / 或过滤从所述孵育混合物中除去所述双歧杆菌细胞; 以及 ii) 至少两种不同的非消化性碳水化合物, 其中至少一种、优选两种选自低聚果糖 (fructo-oligosaccharide)、半乳寡糖 (galacto-oligosaccharide)、低聚葡萄糖 (gluco-oligosaccharide)、低聚阿拉伯糖 (arabino-oligosaccharide)、甘露寡糖 (mannan-oligosaccharide)、低聚木糖 (xylo-oligosaccharide)、低聚岩藻糖 (fuco-oligosaccharide)、阿拉伯半乳寡糖 (arabinogalacto-oligosaccharide)、葡甘露寡糖 (glucomanno-oligosaccharide)、半乳甘露寡糖 (glactomanno-oligosaccharide)、棉子糖 (raffinose)、低聚乳果糖 (lactosucrose)、含唾液酸的寡糖和糖醛酸寡糖。已经发现, 本发明制品即包含上述结合物的制品减弱了 Th2 反应和 / 或增强了 Th1 反应。所观察到的效果意料不到地高于单一组分的效果的总和。

[0006] 在两种不同实验动物模型中均发现了意料不到的更高效果。与摄入单一组分的动物相比, 在摄入本发明制品的动物中, 接种流感疫苗后观察到迟发型超敏反应中的反应增

强,这指示了 Th1 反应增强。通过将一种底物与双歧杆菌孵育获得的产物以及通过将一种底物与孵育链球菌加两种非消化性碳水化合物获得的产物的结合物导致迟发型超敏反应中的反应增强。

[0007] 与摄入单一组分的动物相比,在摄入本发明制品的动物中,使肺接触变应原后观察到速发型超敏反应中的反应下降,这指示了 Th2 反应减弱。

[0008] 上面定义的成分 i) 和 ii) 的结合物之间的协同效应是令人惊讶的。其不能通过共生效应——其中所述非消化性碳水化合物 (ii) 特异性地刺激同一制品中存在的有益微生物的生长——解释,因为在本发明制品中无活的双歧杆菌细胞存在。除去和 / 或灭活活的双歧杆菌细胞具有如下优点:所述制品可用巴氏法灭菌和 / 或消毒,从而降低有害微生物污染的可能性。这在婴幼儿中特别有利,因为婴幼儿的肠道通透性较高。此外,由于双歧杆菌被除去或灭活,因此它们自身不能导致感染。

[0009] 另一优点是可更好地控制每个人类受试者接受的生物活性组分的剂量。同样有利的是产品的保存更容易且成本降低。此外,有利的是在保存的产品中无后酸化发生,从而避免与蛋白凝固有关的副作用和不良口味。另一优点是灭活和 / 或除去的双歧杆菌不再能够分解和消耗所述非消化性碳水化合物。

[0010] 本发明制品对于以下人群特别有利:与健康成年人相比 Th1 反应下降的人类受试者,特别是新生婴儿、患有免疫衰老的老年人、患有 AIDS 或被人免疫缺陷病毒感染的人以及正在或已经进行了化疗、放疗的癌症患者和恶病质癌症患者。

[0011] 本发明制品特别适合用于治疗 and / 或预防可通过降低 Th2 反应来预防和 / 或治疗的疾病,特别是变态反应、特应性皮炎、哮喘、食物变态反应、变应性鼻炎(例如花粉变态反应)、尘螨变态反应以及其他形式的超敏如全身过敏和急性荨麻疹。

[0012] 本发明制品适合用于治疗 and / 或预防感染,并且 / 或者适合用于在接种之前、之中和 / 或之后支持接种反应。

具体实施方式

[0013] 本发明涉及一种用于制造一种制品的方法,包含以下步骤:

[0014] a:将一种水性底物——其中所述底物包含选自乳、乳蛋白、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白水解物和乳糖中的至少一种——与双歧杆菌孵育以获得一种孵育混合物;

[0015] b:通过加热所述孵育混合物灭活所述双歧杆菌和 / 或通过离心和 / 或过滤从所述孵育混合物中除去所述双歧杆菌细胞;以及

[0016] c:将一种包含步骤 a 中获得的或步骤 b 中获得的——优选步骤 b 中获得的——混合物的组合物与至少两种不同的非消化性碳水化合物结合,其中所述非消化性碳水化合物的至少一种、优选两种选自低聚果糖、半乳寡糖、低聚葡萄糖、低聚阿拉伯糖、甘露寡糖、低聚木糖、低聚岩藻糖、阿拉伯半乳寡糖、葡甘露寡糖、半乳甘露寡糖、棉子糖、低聚乳果糖、含唾液酸的寡糖和糖醛酸寡糖。

[0017] 在一个方面,本发明涉及一种可通过本发明方法获得的制品。在一个实施方案中,本发明涉及一种包含可通过本发明方法获得的制品或由其构成的营养组合物。

[0018] 本发明还涉及一种用于治疗 and / 或预防哺乳动物中的疾病的方法,所述方法包括

对所述哺乳动物给予本发明制品。

[0019] 本发明还涉及一种用于向婴幼儿提供营养的方法,所述方法包括对所述婴幼儿给予本发明制品或包含本发明制品的营养组合物。

[0020] 包括将一种底物与双歧杆菌孵育的方法

[0021] 本发明涉及一种通过将一种水性底物与双歧杆菌孵育(以下称为步骤(a))可获得的或获得的制品,其中所述水性底物包含选自乳、乳蛋白、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白水解物和乳糖中的至少一种。对步骤(a)中获得的或可获得的孵育混合物进行步骤(b),所述步骤(b)包括通过加热处理的灭活步骤和/或通过离心和/或过滤除去双歧杆菌细胞的步骤。进行步骤(b)以减少所述制品中活双歧杆菌的量,优选地减少至少90%,更优选地减少至少99%。

[0022] 在一个实施方案中,所述孵育步骤包括一个发酵步骤和/或生物转化步骤。在发酵过程中,所述水性底物被所述双歧杆菌发酵。在生物转化过程中,所述水性底物被所述双歧杆菌生物转化。

[0023] 通过本发明方法获得的或可获得的(以下只提及“获得的”之处也指“可获得的”)制品优选地包含细菌细胞碎片如糖蛋白、糖脂、肽聚糖、脂磷壁酸(LTA)、脂蛋白、DNA和/或荚膜多糖。这些碎片引起一种免疫反应。有利的是使用通过将一种水性底物——所述水性底物包含选自乳、乳蛋白、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白水解物和乳糖中的至少一种——与双歧杆菌孵育,然后灭活和/或除去所述双歧杆菌,因为这会导致更高浓度的细菌细胞碎片。将所述水性底物与所述双歧杆菌孵育时,可形成其他生物活性化合物,如有机酸、生物活性肽和/或寡糖,其会刺激免疫系统。当使用商业化益生菌制品时,通常要对益生菌细胞进行洗涤并将其从含有细菌细胞碎片的水性生长培养基中分离出来,从而强烈地减少甚或消除含有所述细菌细胞碎片的孵育底物上清液。在本发明中不是这样的。完整细胞(活细胞或死细胞)的存在对于免疫反应不是必需的;在本发明的与双歧杆菌孵育的步骤后,所述水性底物本身对免疫系统已经具有有益的效果。

[0024] 双歧杆菌

[0025] 用于本发明方法的双歧杆菌优选地作为单一或混合培养物提供。双歧杆菌是革兰氏阳性、厌氧、杆状的产乳酸细菌。在与各种双歧杆菌种的典型株系对比时,本发明的双歧杆菌种优选地具有至少95%的16S rRNA序列的同一性,更优选至少97%的同一性,同一性如关于此主题的手册例如 Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor (N. Y.) Laboratory Press 中所定义。优选使用的双歧杆菌也记载在 Scardovi, V. *Genus Bifidobacterium*. p. 1418-p. 1434. In: *Bergey's manual of systematic Bacteriology*. Vol. 2. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (ed.). Baltimore: Williams & Wilkins. 1986. 635 p. 中。优选地,用于生产本发明制品的双歧杆菌为至少一种选自以下的双歧杆菌:短双歧杆菌 (*B. breve*)、婴儿双歧杆菌 (*B. infantis*)、双歧双歧杆菌 (*B. bifidum*)、链状双歧杆菌 (*B. catenulatum*)、青春双歧杆菌 (*B. adolescentis*)、嗜热双歧杆菌 (*B. thermophilum*)、高卢双歧杆菌 (*B. gallicum*)、动物双歧杆菌 (*B. animalis*) 或乳双歧杆菌 (*B. lactis*)、角双歧杆菌 (*B. angulatum*)、假链状双歧杆菌 (*B. pseudocatenulatum*)、热嗜酸双歧杆菌 (*B. thermacidophilum*) 和长双歧杆菌

(*B. longum*), 更优选短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、双歧双歧杆菌、链状双歧杆菌、长双歧杆菌, 更优选长双歧杆菌和短双歧杆菌, 甚至更优选短双歧杆菌, 最优选保藏于法国巴黎的 CNCM 的短双歧杆菌 CNCM I-2219。短双歧杆菌 CNCM I-2219 是由 Compagnie Gervais Danone 于 1999 年 5 月 31 日依据《布达佩斯条约》保藏于法国巴黎的 Collection Nationale de Cultures de Microorganisms van Institute Pasteur。此株系在 WO 2004/093899 中被公开。

[0026] 优选地, 所述组合物还包含一种通过如下方式获得的产物: 将一种水性底物——所述水性底物包含选自乳、乳蛋白、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物和乳糖的至少一种、优选选自乳清和乳糖中的至少一种——与链球菌孵育, 并优选地随后灭活和 / 或除去所述链球菌。链球菌是革兰氏阳性、厌氧、球状的产乳酸细菌。在与各种链球菌种的典型菌株对比时, 本发明的链球菌种优选地具有至少 95% 的 16S rRNA 序列的同一性, 更优选至少 97% 的同一性, 同一性如关于此主题的手册例如 Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor (N.Y.) Laboratory Press 中所定义。优选地, 通过将一种水性底物与链球菌孵育, 随后灭活所述链球菌所获得的产物的生产过程用选自以下的链球菌属种进行: 唾液链球菌 (*S. salivarius*) 和嗜热链球菌 (*S. thermophilus*)、更优选嗜热链球菌、甚至更优选嗜热链球菌株系 CNCM I-1620 或株系 CNCM I-1470、最优选株系 CNCM I-1620。嗜热链球菌株系 CNCM I-1620 和 I-1470 有利地产生大量的 β -半乳糖苷酶。嗜热链球菌 CNCM I-1620 是由 Compagnie Gervais Danone 根据《布达佩斯条约》于 1995 年 8 月 23 日保藏于法国巴黎的 Collection Nationale de Cultures de Microorganisms van Institute Pasteur。嗜热链球菌 CNCM I-1470 是由 Compagnie Gervais Danone 根据《布达佩斯条约》于 1994 年 8 月 25 日保藏于法国巴黎的 Collection Nationale de Cultures de Microorganisms van Institute Pasteur。这些株系在 EP 778885 中被公开。

[0027] 方法步骤 a) 水性底物的孵育

[0028] 步骤 (a) 优选通过如下方式进行:

[0029] a1 将双歧杆菌以 1×10^2 至 1×10^{11} cfu 双歧杆菌 / ml 的量接种于水性底物中, 所述水性底物的 pH 为 4 至 8, 并包含选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白水解物和乳糖中的至少一种,

[0030] a2 在好氧或厌氧条件下并且于 20°C 至 50°C 的温度下将所述双歧杆菌在所述水性培养基中孵育至少 2h。

[0031] 待与双歧杆菌孵育的水性底物包含选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白水解物和乳糖中的至少一种, 更优选至少两种。底物优选地不包含完整的酪蛋白。已发现, 当水性底物含有大量完整的酪蛋白时会形成较少的免疫刺激物质。因此, 所述水性底物优选包含少于 25g/l 酪蛋白, 更优选少于 15g/l, 甚至更优选少于 5g/l, 最优选少于 1g/l 的完整酪蛋白。所述水性底物因此甚至更优选包含乳清和 / 或乳清蛋白和 / 或乳清蛋白水解物。

[0032] 乳可以是全脂乳、半脱脂乳和 / 或脱脂乳。优选使用脱脂乳。乳清可以是甜乳清 (sweet whey)、酸乳清 (acid whey) 或通过例如过滤除去酪蛋白的乳清或乳清渗透物 (whey permeate)。乳清优选地以 3 至 80g 干重 / 升 (l) 水性底物、更优选 40 至 60g/l 的浓度存

在。优选地,使用乳清蛋白浓缩物。优选地,使用乳清蛋白水解物并以 2 至 80g 干重 / 升 (1) 水性底物、更优选 5 至 15g/1 的量存在。乳糖优选以 5 至 50g 干重 / 升 (1) 水性底物、更优选 1 至 30g/1 的量存在。所述水性底物优选包含缓冲盐以使 pH 保持在需要的范围内。优选地,将磷酸二氢钠或磷酸二氢钾用作缓冲盐,优选的量为 0.5 至 5g/1,更优选 1.5 至 3g/1。所述水性底物优选含有其量为 0.1 至 0.5g/ 升水性底物、更优选 0.2 至 0.4g/1 的半胱氨酸。半胱氨酸的存在使得底物的氧化还原势较低,这有利于产乳酸细菌的活性,特别有利于双歧杆菌的活性。所述水性底物优选包含其量为 0.5 至 5g/ 升水性底物、更优选 1.5 至 3g/1 的酵母提取物。酵母提取物对产乳酸细菌来说是酶辅助因子和生长因子的丰富来源。酵母提取物的存在将增强双歧杆菌进行的生物转化和 / 或发酵。

[0033] 所述待孵育的水性底物优选包含高浓度的固体,优选以体积计超过 20 重量%的固体,更优选超过 40 重量%的固体。在进行后续处理步骤——例如喷雾干燥、离心或过滤时,高浓度是有利的。

[0034] 为了除去不需要的活细菌,可适当地在孵育步骤前将所述水性底物用巴氏法灭菌。为了灭活酶,可适当地在孵育后将所述产物用巴氏法灭菌。合适的酶灭活在 75°C 下进行 1 分钟。合适的酶灭活在 75°C 下进行 3 分钟。在孵育步骤之前和 / 或之后可以适当地将所述水性底物匀浆化。匀浆化形成更稳定的产物,特别是在脂肪 (脂质) 存在的情况下。

[0035] 孵育密度优选地为 1×10^2 至 1×10^{11} cfu 双歧杆菌 / ml 水性底物,优选 1×10^4 至 1×10^{10} cfu 双歧杆菌 / ml 水性底物,更优选 1×10^7 至 1×10^9 cfu 双歧杆菌 / ml 水性底物。本领域中已知用于获得待孵育于水性底物中的浓缩双歧杆菌起始培养物的方法。孵育后双歧杆菌的终细菌密度优选为 1×10^3 至 1×10^{11} cfu/ml 水性底物,更优选 1×10^4 至 1×10^9 cfu/ml 水性底物。

[0036] 与双歧杆菌的孵育优选在约 20°C 至 50°C、更优选 30°C 至 45°C、甚至更优选约 37°C 至 42°C 的温度下进行。对于双歧杆菌的生长和 / 或活性来说,最适温度是 37°C 至 42°C。

[0037] 与双歧杆菌的孵育优选在厌氧条件下进行,因为双歧杆菌的生长和许多双歧杆菌酶的酶活性在好氧条件下受抑制。但是,并不总是需要进行酸化。因此,在一个实施方案中,所述孵育步骤合适地在好氧条件下进行。

[0038] 与双歧杆菌的孵育优选于 pH 4 至 8、更优选 pH 5.6 至 7.5、甚至更优选 pH 6 至 7.5 下进行。这样的 pH 不会诱发蛋白质沉淀和 / 或不良口味,而同时双歧杆菌能够和所述水性底物相互作用。

[0039] 孵育时间优选是至少 2 小时,优选 4 至 48 小时,更优选 6 至 24 小时,甚至更优选 6 至 15 小时。足够长的时间可使得在双歧杆菌和所述底物之间发生较大程度的相互作用并且 / 或者可较大程度地产生细胞碎片例如糖蛋白、糖脂、肽聚糖、脂磷壁酸 (LTA)、脂蛋白、DNA 和 / 或荚膜多糖,而由于经济原因孵育时间不必过长。

[0040] 灭活和 / 或以物理方法除去活的双歧杆菌细胞的方法

[0041] 在本发明方法的步骤 (b) 中,在步骤 a) 中的孵育后,优选将活的双歧杆菌细胞基本上全部除去,例如通过加热处理进行灭活和 / 或物理除去。所述细胞优选通过加热处理进行灭活。所述双歧杆菌优选在孵育步骤 a) 后被加热杀死。优选的加热杀死方式是巴氏灭菌法、消毒 (sterilization)、超高温处理、在双歧杆菌无法存活温度下进行喷雾蒸煮 (spray cooking) 和 / 或喷雾干燥。所述加热处理优选在至少 50°C、更优选至少 65°C 下进

行。所述加热处理优选进行至少 5 分钟,更优选至少 10 分钟。所述加热处理优选在至少 50°C 下进行至少 5 分钟,更优选在至少 65°C 下进行至少 10 分钟。所述加热处理优选在至少 75°C 下进行至少 1 分钟,更优选在至少 75°C 下进行至少 3 分钟。

[0042] 优选通过物理除去法例如过滤和 / 或离心 (例如在 3000g 下离心 1 小时) 从所述孵育产物中除去双歧杆菌的完整细胞,完整细胞保留在片状沉淀物或渗留物 (retentate) 中,而通过将乳和 / 或乳源底物与双歧杆菌孵育并随后灭活双歧杆菌细胞碎片而获得的产物保留在上清液和 / 或滤出液中。

[0043] 对活细胞的加热灭活和 / 或物理除去使得在所述处理后活双歧杆菌的量低于本领域已知的常规平皿培养技术使用的检出限 (detection limit)。以每克组合物的干重计,所述检出限少于 10^4 cfu 双歧杆菌活细胞,更优选少于 10^3 cfu/g。所述加热灭活和 / 或除去步骤优选使得至少 90%、更优选至少 99% 存在于所述步骤 a) 后的孵育混合物中的细胞被除去。

[0044] 对活细胞进行灭活的要求具有这样的优点,即最终的营养组合物在产生后可用巴氏法灭菌和 / 或消毒,从而减少有害微生物污染的机会。因此,本发明使得即用型的液体配方物能在室温下制备并保存。此外,可以更容易地控制每位人类受试者所接受的生物活性组分的剂量,这是因为在液体产品中不会出现更进一步的生长,在人类受试者肠道内也不会出现更进一步的生长。后者是一种取决于个体肠道环境的可变因子,因此可导致各个受试者中的有益效果的程度差异。还有一个优点是灭活的和 / 或除去的双歧杆菌和链球菌不再能够降解和消耗所述非消化性碳水化合物。

[0045] 另外的优点是所述营养组合物可以更易于保存,并且费用降低,因为不需要采取专门的预防措施来使双歧杆菌的生存能力保持在一个可接受的水平。对于水活度高于 0.3 的产品尤其如此。在保存的高水活度产品中和 / 或在将粉末状营养组合物以水复溶后且食用前的阶段中也不会发生后酸化。与蛋白凝固相关的副作用和不良口味也以该方式被避免。

[0046] 其他组分的添加以及其他任选的方法步骤

[0047] 上述方法步骤 b) 之后任选地可以是以下一个或多个步骤:

[0048] i) 将孵育后的产物通过截留限值 (cut-off threshold) 为 100 到 300kDa 的滤膜超滤,目的是获得浓缩的渗留物。所述膜优选聚醚砜膜,并且过滤优选在低于 60°C 的温度下进行。

[0049] ii) 用水洗涤所述浓缩的渗留物。

[0050] iii) 将所述浓缩的渗留物脱水,优选通过冷冻干燥进行。

[0051] iv) 将所述脱水的渗留物溶解到缓冲液、优选 pH 6-8 的 Tris 缓冲液中。

[0052] v) 在排阻限值 (exclusion threshold) 为 600kDa 的柱——优选 Dextran 或琼脂糖柱例如 Superdex[®] 200 上,对所述渗留物溶液进行凝胶排阻色谱。

[0053] vi) 在色谱结束时回收过滤级分或排阻级分。

[0054] vii) 用截留限值为 10kDa 的膜将所述产物脱盐。在色谱结束后回收排阻级分。

[0055] 这些步骤优选在无菌条件下进行。在方法步骤 a) 之后,优选在临进行方法步骤 b) 之前或在方法步骤 b) 之后,可加入有利于获得所需最终营养组合物的其他成分。这些成分优选在步骤 b) 之后加入。对一种婴幼儿乳配方而言,可加入一些本领域公知的成分例如脱

脂乳、乳清、乳糖、植物脂肪、矿物质、维生素。

[0056] 优选将一种含有乳清、乳清蛋白和 / 或乳清蛋白水解物的水性底物用巴氏法灭菌、冷却并且与一种或多种双歧杆菌株系孵育,所述双歧杆菌株系优选短双歧杆菌株系 CNCM I-2219,之后将孵育产物进行加热处理并保存。任选地将所述孵育产物与组成所述营养组合物的其他组分混合。可包含或不包含脂肪组分,但优选在这个阶段不加入脂肪组分。优选将所述混合物预热,随后按顺序 (in-line) 加入脂肪 (在本文中也可以使用术语“脂质”)、匀浆、加热处理并干燥。

[0057] 另一种用于制备本发明的孵育产物的优选方法公开于 WO 01/01785 中,更具体是在实施例 1 和 2 中。另一种用于制备本发明的孵育产物的优选方法记载于 WO 2004/093899 中,更具体是在实施例 1 中。

[0058] 以干重计,所述终营养组合物优选包含 5 至 100 重量%的通过步骤 b 获得的制品,更优选 5 至 99.5 重量%,更优选 5 至 95 重量%,甚至更优选 5 至 80 重量%,甚至更优选 5 至 40 重量%,最优选 10 至 40 重量%。所述终营养组合物优选每 100ml 中包含 0.5 至 20 重量%的通过步骤 b 获得的产物,更优选每 100ml 中包含 0.5 至 14 重量%,更优选 1 至 10 重量%,甚至更有选 1 至 5 重量%。

[0059] 以所述终组合物的干重计,本发明的终营养组合物优选包含从每 g 多于 1×10^3 cfu、更优选多于 1×10^4 cfu、甚至更优选多于 1×10^5 cfu 的双歧杆菌中获得的灭活双歧杆菌和 / 或源自双歧杆菌的细菌碎片。以所述终组合物的干重计,所述灭活双歧杆菌和 / 或源自双歧杆菌的碎片优选从每 g 少于 1×10^{11} cfu、更优选少于 1×10^{10} cfu、甚至更优选少于 1×10^9 cfu 的双歧杆菌中获得。这些数值可通过如下方式计算:测定步骤 a) 的孵育之后和步骤 b) 之前的混合物中的双歧杆菌的量,并且随后确定有多少克本发明的制品存在于所述最终组合物中 (以干重计)。

[0060] 对获得所需终营养组合物可能有利的其他成分可在方法步骤 a) 或 b) 之后加入。这些成分优选在步骤 b) 之后加入。对一种婴幼儿乳配方而言,可加入一些本领域公知的成分例如脱脂乳、乳清、乳糖、植物脂肪、矿物质、维生素。

[0061] 所述方法优选包括如下的其他步骤:

[0062] d:将一种底物与嗜热链球菌、优选嗜热链球菌株系 CNCM I-1620 或株系 CNCM I-1470 孵育以获得一种孵育混合物,其中所述底物选自乳、乳蛋白、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物和乳糖,和

[0063] e:通过加热步骤 e 的孵育混合物灭活所述嗜热链球菌和 / 或通过离心和 / 或过滤从步骤 e 的孵育混合物中除去嗜热链球菌细胞。步骤 e 和 b 优选同时进行。优选地通过物理除去法例如过滤和 / 或离心 (例如在 3000g 下离心 1 小时) 从所述孵育产物中除去链球菌的完整细胞,完整细胞保留在片状沉淀物或渗留物中,而通过将乳和 / 或乳源底物与链球菌孵育并随后灭活链球菌细胞碎片获得的产物保留在上清液和 / 或滤出液中。

[0064] 对活细胞的加热灭活和 / 或物理除去使得在所述处理之后活链球菌的量低于本领域已知的常规平皿培养技术使用的检出限。以每克组合物的干重计,所述检出限少于 10^4 cfu 链球菌活细胞,更优选少于 10^3 cfu/g。因此,在本发明的一个实施方案中,步骤 e) 后的制品优选含有少于 10^3 cfu 的活链球菌 /g 所述制品干重。加热灭活和 / 或除去步骤优选地使得存在于步骤 d) 后的孵育混合物中至少 90%、更优选至少 99% 的细胞被除去。

[0065] 用于以本发明的嗜热链球菌株系制备孵育产物的另一种优选方法公开于 EP 0778885 中,更具体是在实施例 5 和 6 中。用于以本发明的嗜热链球菌株系制备孵育产物的另一种优选方法公开于 FR2723960 的实施例 2 至 6 中。

[0066] 优选地,将一种含有乳清、乳清蛋白和 / 或乳清蛋白水解物的水性底物用巴氏法灭菌、冷却并且与一种或多种双歧杆菌株系孵育,所述双歧杆菌株系优选短双歧杆菌株系 CNCM I-2219,之后将孵育产物进行加热处理并保存。优选将含有乳清和 / 或乳糖的第二种水性底物与嗜热链球菌孵育,所述嗜热链球菌优选株系 CNCM I-1620 或株系 CNCM I-1470。随后,优选将所述两种孵育产物混合在一起并且与其他构成所述营养组合物的组分混合。可包含或不包含脂肪组分,但优选在这个阶段不加入脂肪组分。优选将所述混合物预热,随后按顺序 (in-line) 加入脂肪 (在本文中也使用术语“脂质”)、匀浆、加热处理并干燥。

[0067] 孵育步骤 d 可与步骤 a 中与双歧杆菌的孵育步骤同时进行。优选地将与嗜热链球菌的孵育和与双歧杆菌的孵育在分开的方法步骤中进行。分开孵育可实现针对每种不同细菌的最佳条件并且 / 或者防止不同细菌的不利干扰并释放免疫刺激组分。优选地将所述底物与链球菌孵育后获得的孵育混合物加入在步骤 a、步骤 b 或步骤 c 中获得的混合物中,更优选在步骤 a) 之后加入。当本发明的组合物还包含与嗜热链球菌孵育后获得的混合物时,观察到对迟发型超敏反应的改善效应。因此,在一个实施方案中,本发明的方法包括另一步骤:

[0068] f:将在步骤 d 或 e——优选步骤 d——中获得的孵育混合物与在步骤 a、b 或 c——优选步骤 a——中获得的孵育混合物结合起来。在一个实施方案中,将在步骤 d 中获得的孵育混合物与步骤 a 中获得的孵育混合物结合起来,并且步骤 b 和步骤 e 同时进行。

[0069] 以干重计,所述终营养组合物优选包含 2 至 94.5% 的通过步骤 d 获得的制品,更优选 5 至 80 重量%,甚至更优选 5 至 40 重量%。所述终营养组合物优选地每 100ml 包含 0.2 至 20 重量%的通过步骤 d 获得的产物,更优选每 100ml 包含 0.5 至 14 重量%,更优选每 100ml 包含 1 至 10 重量%,甚至更优选每 100ml 包含 1 至 5 重量%。

[0070] 非消化性碳水化合物

[0071] 通过本发明方法获得的制品包含至少两种不同的非消化性碳水化合物。所述非消化性碳水化合物在方法步骤 c) 中加入。所述非消化性碳水化合物可有利地刺激免疫系统。这种刺激作用可通过以下方式实现:肠道微生物群 (intestinal microbiota) 的改善和 / 或对免疫系统的直接作用。两种不同的非消化性碳水化合物的存在协同地改善肠道菌群和 / 或协同地刺激免疫系统。

[0072] 两种非消化性碳水化合物和通过如下方式获得的产物两者的存在可协同地作用于免疫反应:将一种水性底物与双歧杆菌孵育,并随后灭活和 / 或除去所述双歧杆菌。所述结合物意料不到地协同地导致更高的 Th1 反应、更低的 Th2 反应和 / 或更高的 Th1/Th2 反应比率。所述结合物协同地增强接种反应,协同地改善变态反应和 / 或增强对感染的抗性。这两种化合物之间的协同效应是意料不到的并且不能通过共生效应——其中所述非消化性碳水化合物特异性地刺激同一制品中存在的有益微生物的生长——解释,因为在所述孵育的乳和 / 或乳源产物中无活的双歧杆菌存在。

[0073] 本文所用的术语“寡糖”是指聚合度 (DP) 为 2-250、优选 DP 为 2-100、更优选 2-60、甚至更优选 2-10 的碳水化合物。如果本发明制品中包括 DP 为 2-100 的寡糖,那么这包括

含有 DP 为 2-5、DP 为 50-70 和 DP 为 7-60 的寡糖的组合物。本发明所用的术语“非消化性碳水化合物”是指不是在人上消化道（小肠和胃）中的酸或消化酶的作用下在肠道内被消化，而是优选地被人肠道微生物群发酵的碳水化合物。例如，蔗糖、乳糖、麦芽糖和麦芽糊精被认为是消化性的。

[0074] 优选地，本发明的非消化性碳水化合物是可溶的。当谈及碳水化合物时，本文所用的术语“可溶的”是指所述碳水化合物根据 L. Prosky et al., J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 1017-1023 (1988) 所述的方法是可溶的。

[0075] 本发明中不同的非消化性碳水化合物涉及单糖单位组成不同或者聚合度 (DP) 不同或者两者皆不同的非消化性碳水化合物。当以总摩尔单糖单位计，单糖组成有至少 30mol% 差异、更优选至少 50mol% 差异时，两种非消化性碳水化合物在单糖组成上不同。例如，平均组成为 Glu-Gal₃ 的半乳寡糖和平均组成为 Glu-Fru₃ 的低聚果糖差异 75mol%。如果两种非消化性碳水化合物的平均 DP 的差异超过 5 个单糖单位，优选超过 10 个单位，甚至更优选超过 15 个单位，则所述两种碳水化合物的 DP 不同。例如，平均 DP 为 4 的水解菊粉和平均 DP 为 25 的长链菊粉的 DP 差异 21 单位。

[0076] 所述非消化性碳水化合物为选自以下的至少一种、更优选至少两种：低聚果糖、半乳寡糖、低聚葡萄糖、低聚阿拉伯糖、甘露寡糖、低聚木糖、低聚岩藻糖、阿拉伯半乳寡糖、葡甘露寡糖、半乳甘露寡糖、含唾液酸的寡糖和糖醛酸寡糖中。优选地，本发明制品包含低聚果糖、半乳寡糖和 / 或半乳糖醛酸寡糖，更优选半乳寡糖，最优选地包含 β 半乳寡糖。低聚果糖类包括菊粉，半乳寡糖类包括反式半乳寡糖或 β 半乳寡糖，低聚葡萄糖类包括龙胆寡糖 (gentio-oligosaccharide)、黑曲霉寡糖 (nigero-oligosaccharide)、环糊精寡糖 (cyclodextrin-oligosaccharide) 和聚葡萄糖 (polydextrose)，阿拉伯半乳寡糖类包括阿拉伯树胶，半乳甘露寡糖类包括部分水解的瓜尔豆胶。

[0077] 为进一步提高，本发明的非消化性碳水化合物优选地具有较高含量的短链寡糖，因为这些短链寡糖强烈促进双歧杆菌的生长。因此，优选地，在本发明制品中至少 10 重量%的非消化性碳水化合物具有 2 至 5 (即，2、3、4 和 / 或 5) 的 DP，并且至少 5 重量%的非消化性碳水化合物具有 10 至 60 的 DP。优选至少 50 重量%、更优选至少 75 重量%的非消化性碳水化合物具有 2-9 (即 2、3、4、5、6、7、8 和 / 或 9) 的 DP。

[0078] 通过本发明方法获得的制品更优选包含半乳寡糖。优选地，半乳寡糖选自 β 半乳寡糖、乳-N-四糖 (LNT)、乳-N-新四糖 (neo-LNT)、岩藻糖基乳糖、岩藻糖基化 LNT 和岩藻糖基化 neo-LNT。在一个特别优选的实施方案中，本发明制品包含 β 半乳寡糖。本发明所用的 β 半乳寡糖是指聚合度 (DP) 为 2-20 的并且由基于单体亚单位计多于 50%、优选多于 65% 的半乳糖单元构成的寡糖，其中至少 50%、更优选至少 75%、更优选至少 90% 的半乳糖单元通过 β 糖苷键 (优选 β -1,4-糖苷键) 连接在一起。 β 键在人乳寡糖中也是占优势的。平均 DP 优选在 3 至 6 的范围内。半乳糖单元链的还原端可存在一个葡萄糖单元。 β 半乳寡糖有时也称作反式半乳寡糖 (TOS)。 β 半乳寡糖的一个合适来源为 Vivinal® GOS (可从 Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Netherlands 商业购得)。其他合适的来源为 Oligomate (Yakult)、Cupoligo (Nissin) 和 Bi2muno (Classado)。 β 半乳寡糖被发现可促进产乳酸细菌尤其是双歧杆菌的生长。

[0079] 通过本发明方法获得的制品更优选包含低聚果糖。本发明所用的低聚果糖是指由

多于 50%、优选多于 65% 的果糖单元（以单体亚单位计）所构成的碳水化合物，其中至少 50%、更优选地至少 75%、甚至更优选地至少 90% 的果糖单元通过 β 糖苷键（优选 β -2, 1-糖苷键）连接在一起。果糖单元链的还原端可存在一个葡萄糖单元。所述低聚果糖优选具有 2 至 250、更优选 2 至 100、甚至更优选 10 至 60 的 DP 或平均 DP。低聚果糖包含果聚糖、水解果聚糖、菊粉、水解菊粉和合成低聚果糖。优选地，所述制品包含平均聚合度 (DP) 为 3-6 的短链低聚果糖，更优选水解菊粉或合成低聚果糖。所述制品优选包含平均 DP 大于 20 的长链低聚果糖。优选地，所述制品同时包含短链和长链低聚果糖。适用于本发明方法的低聚果糖也容易购得，如 Raftiline® HP (Orafti)。

[0080] 通过本发明方法获得的制品更优选包含半乳寡糖和低聚果糖（更优选长链低聚果糖）的结合物。这样的混合物协同地刺激健康肠道微生物群、特别是双歧杆菌的生长。

[0081] 通过本发明方法获得的制品优选包含糖醛酸寡糖，更优选甘露糖醛酸 (mannonic acid) 寡糖和 / 或半乳糖醛酸寡糖，甚至更优选半乳糖醛酸。本发明所用的术语糖醛酸寡糖是指这样的寡糖，即其中至少 50% 的存在于该寡糖中的单糖单元为糖醛酸。本发明所用的术语半乳糖醛酸寡糖是指这样的寡糖，即其中至少 50% 的存在于该寡糖中的单糖单元为半乳糖醛酸。在本发明中使用的半乳糖醛酸寡糖优选通过降解果胶、果胶酸盐 (pectate) 和 / 或聚半乳糖醛酸来制备。优选地，降解的果胶通过对水果和 / 或蔬菜果胶、更优选苹果、柑桔和 / 或甜菜果胶、甚至更优选由至少一种裂解酶降解的苹果、柑桔和 / 或甜菜果胶的水解和 / 或 β 消除而制备。在一个优选实施方案中，所述半乳糖醛酸寡糖的至少一个末端半乳糖醛酸单元具有一个双键。该双键有效地保护肠道上皮细胞免于被病原性细菌附着。优选地，末端半乳糖醛酸单元之一包含一个 C₄-C₅ 双键。所述半乳糖醛酸寡糖可被衍生化。所述半乳糖醛酸寡糖可被甲氧基化和 / 或酰胺化。优选地，所述半乳糖醛酸寡糖的特征在于甲氧基化程度大于 20%，优选大于 50%，更优选大于 70%。糖醛酸寡糖可有利地降低病原性微生物对肠道上皮细胞的粘附。此外，糖醛酸寡糖可通过增强 Th1 反应刺激免疫系统。

[0082] 因此，在一个实施方案中，通过本发明方法获得的并用于本发明的制品优选至少包含 β -半乳寡糖。在一个实施方案中，通过本发明方法获得的并用于本发明的制品优选地至少包含短链低聚果糖和 / 或长链低聚果糖，优选长链低聚果糖。在一个实施方案中，通过本发明方法获得的并用于本发明的制品优选至少包含糖醛酸寡糖。在一个实施方案中，用于本发明的制品优选地至少包含 β 半乳寡糖并至少包含短链低聚果糖和 / 或长链低聚果糖。在一个实施方案中，用于本发明的制品优选地至少包含 β 半乳寡糖并至少包含糖醛酸寡糖。在一个实施方案中，用于本发明的制品优选地至少包含短链低聚果糖和糖醛酸寡糖，或者至少包含长链低聚果糖和糖醛酸寡糖。在一个实施方案中，根据本发明的制品优选地至少包含 β 半乳寡糖、短链低聚果糖和糖醛酸寡糖，或者至少包含 β 半乳寡糖、长链低聚果糖和糖醛酸寡糖。糖醛酸寡糖与半乳寡糖和 / 或低聚果糖的结合物的结合物与单独的糖醛酸寡糖或者半乳糖和 / 或低聚果糖相比导致更高的 Th1 反应。

[0083] 优选地，两种不同的非消化性碳水化合物（优选 β 半乳寡糖和低聚果糖）的混合物之间的重量比为 0.05-20，更优选 1-20。 β 半乳寡糖更类似于人乳寡糖。优选地，本发明制品包含 DP 为 2-10 的 β 半乳寡糖和 / 或 DP 为 2-60 的低聚果糖。此结合物被发现协同地增加双歧杆菌和乳酸杆菌。这三种非消化性寡糖的存在更进一步地刺激了双歧杆菌。

反式半乳寡糖：低聚果糖：糖醛酸寡糖的重量比优选地为 (20-2) : 1 : (1-20), 更优选 (12-7) : 1 : (1-3)。

[0084] 优选地, 由通过本发明方法获得的制品组成或包含所述制品的终营养组合物每 100ml 包含 80mg 至 2g、更优选 150mg 至 1.50g、甚至更优选 300mg 至 1g 的非消化性碳水化合物。基于干重计, 所述营养组合物优选地包含 0.25-20 重量%、更优选地包含 0.5-10 重量%、甚至更优选地包含 1.5-7.5 重量%的非消化性碳水化合物。较少量的非消化性碳水化合物对免疫系统和 / 或微生物群中的有益细菌的刺激不太有效, 而过高量的非消化性碳水化合物会造成腹胀和腹部不适的副作用。

[0085] 所述两种不同的非消化性碳水化合物在步骤 a) 之后、优选在临进行步骤 b) 之前或在步骤 b) 之后加入 (即步骤 c), 优选在步骤 b) 之后进行步骤 c), 优选在步骤 e) 之后进行步骤 c), 即在通过加热处理灭活之后和 / 或在除去双歧杆菌和任选的嗜热链球菌之后。

[0086] 通过本发明方法获得的制品优选包含一种与短双歧杆菌、更优选株系 CNCM I-2219 孵育过的水性底物和至少一种、优选两种非消化性碳水化合物, 所述水性底物包含选自乳、乳蛋白、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物和乳糖中的至少一种, 所述非消化性碳水化合物选自半乳寡糖和低聚果糖。

[0087] 在一方面, 本发明涉及本发明的方法, 其中在步骤 c 中仅加入一种非消化性碳水化合物。所述的仅一种非消化性碳水化合物是低聚果糖时特别有利。

[0088] 在一个方面, 本发明涉及一种可通过上述的本发明方法获得的制品。在一个实施方案中, 由通过本发明方法获得的制品组成或包含通过本发明方法获得的制品的终营养组合物包含 0.5 至 10g 上文定义的非消化性碳水化合物 / 100g 所述组合物的干重。在一个实施方案中, 由通过本发明方法获得的制品组成或包含通过本发明方法获得的制品的终营养组合物在 20°C 下和在 100s^{-1} 剪切速率下粘度为 1 至 60mPa. s。

[0089] 上述方法优选包括一个干燥步骤。干燥步骤是本领域公知的。一个合适的干燥步骤是喷雾干燥。所述干燥步骤优选以这样的方式进行, 即干燥的产物是含有少于 10 重量% 水、更优选少于 5 重量% 水的粉末。所述干燥步骤优选在步骤 c 后进行。或者, 所述干燥步骤可在步骤 b 之后和 / 或步骤 e 之后进行, 之后将所述非消化性寡糖干混入所述产物。

[0090] 营养物

[0091] 已发现本发明的制品可有利地应用于食品, 例如婴幼儿食品和病人食品 (clinical food)。本发明的制品或含有本发明制品的组合物优选地经肠给予, 更优选口服给予。所述组合物优选是完全营养物。

[0092] 所述营养物优选地适合给予婴幼儿。本发明的营养组合物更优选是一种婴幼儿配方物或后续配方物 (follow on formula)。本发明组合物可有益地用作一种婴幼儿完全营养物。

[0093] 本发明的组合物优选是一种婴幼儿营养物, 以所述婴幼儿营养物的干重计, 包含:

[0094] i) 总和为 0.5 至 10 重量% 的半乳寡糖和低聚果糖, 和

[0095] ii) 5 至 99.5 重量% 的根据本发明的方法步骤 b 后获得的制品, 其中在步骤 a 中的双歧杆菌属于短双歧杆菌种, 优选短双歧杆菌株系 CNCM I-2219

[0096] iii) 和任选的 2 至 94.5 重量% 的步骤 e 后获得的制品。

[0097] 这样的营养物优选包含脂质、蛋白和碳水化合物，并且优选地以液体形式给药。本发明所用的术语“液体食物”包括干食品（如粉末），其附有关于将所述干食品混合物与一种合适的液体（如水）混合的说明书。

[0098] 因此，本发明的营养组合物优选地包含以总卡路里计 5% 至 60% 的脂质，以总卡路里计 5% 至 60% 的蛋白质，以总卡路里计 15% 至 90% 的可消化性碳水化合物。当意欲提供给成人受试者时，本发明的营养组合物优选包含以总卡路里计 5% 至 30% 的脂质，以总卡路里计 15% 至 40% 的蛋白质和以总卡路里计 25% 至 75% 的可消化性碳水化合物。当意欲提供给婴幼儿时，本发明的营养组合物优选包含以总卡路里计 30% 至 60% 的脂质，以总卡路里计 5% 至 15% 的蛋白质和以总卡路里计 25% 至 75% 的可消化性碳水化合物；更优选以总卡路里计 35% 至 50% 的脂质，以总卡路里计 7.5% 至 12.5% 的蛋白质和以总卡路里计 40% 至 55% 的可消化性碳水化合物。为基于总卡路里计算蛋白百分比，需要考虑由蛋白、肽和氨基酸提供的总卡路里。

[0099] 所述脂质优选包含植物油。所述植物脂质优选是至少一种选自如下的油：大豆油、棕榈油、椰子油、红花油、葵花籽油、玉米油、菜籽油和卵磷脂。优选使用植物脂质与至少一种选自鱼油以及含 ω -3 的植物油、藻油或细菌油的油的结合物。在一个优选的实施方案中，本发明的方法还包括给予长链多不饱和酸 (LC-PUFA)。由于人们认为这些以一种不同于非消化性碳水化合物和不同于通过将乳和 / 或乳源底物与双歧杆菌孵育并随后灭活所述双歧杆菌而获得的产物的机制作用于免疫系统，本发明的制品与 LC-PUFA 的结合物被认为可协同地作用。

[0100] 当意欲提供给成人时，本发明的营养组合物优选包含以总卡路里计 5% 至 60% 的脂质，优选以总卡路里计 5% 至 30% 的脂质；当意欲提供给婴幼儿时，本发明的营养组合物优选包含以总卡路里计 30% 至 60% 的脂质，更优选以总卡路里计 35% 至 50% 的脂质。

[0101] 所述营养制品使用的蛋白质优选地选自非人动物蛋白（例如乳蛋白、肉蛋白和卵蛋白）、植物蛋白（例如大豆蛋白、小麦蛋白、稻蛋白和豌豆蛋白），上述蛋白质的水解物、游离氨基酸以及蛋白质、水解物和游离氨基酸的混合物。特别优选牛乳蛋白，例如酪蛋白和乳清蛋白。由于本发明组合物适合用于减少变态反应，特别婴幼儿的变态反应，因此所述蛋白优选地选自水解的乳蛋白。优选地，本发明组合物包含水解的酪蛋白和 / 或水解的乳清蛋白、水解的植物蛋白和 / 或游离氨基酸，最优选水解的乳清蛋白。这些蛋白的使用进一步减少了变态反应。这些水解的蛋白质的使用可有利地改善对饮食蛋白质组分的吸收。这对于婴幼儿和患病受试者尤其有利。

[0102] 当意欲提供给成人受试者时，本发明的营养组合物优选包含以总卡路里计 5% 至 60% 的蛋白质，优选以总卡路里计 15% 至 40% 的蛋白质；并且当意欲提供给婴幼儿时，本发明的营养组合物优选包含以总卡路里计 5% 至 15% 的蛋白质，更优选以总卡路里计 7.5% 至 12.5% 的蛋白质。为基于总卡路里计算蛋白的百分比，需要考虑由蛋白、肽和氨基酸提供的总卡路里。

[0103] 可以将可消化性碳水化合物源加入到所述营养配方物中。可使用任何合适的可消化性碳水化合物（源），例如蔗糖、乳糖、葡萄糖、果糖、固态玉米糖浆和麦芽糊精，以及上述物质的混合物。因此，本发明的营养组合物优选包含以总卡路里计 15% 至 90% 的碳水化合物，更优选以总卡路里计 25% 至 75% 的碳水化合物，更优选以总卡路里计 40% 至 55% 的碳

水化合物。

[0104] 本发明的营养组合物优选为液体形式。它优选地具有限定的粘度。已经发现本发明的方法可提供粘度足够低的液体营养物,这样它可被用作例如液体婴幼儿食品和液体病人食品,所述食品可通过奶嘴、管或吸管来喂食,同时能保持低粘度。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物在 20°C 下并且在 100s^{-1} 剪切速率下的粘度低于 600mPa. s, 优选低于 250mPa.s, 更优选低于 60mPa. s, 甚至更优选低于 35mPa. s, 最优选低于 6mPa. s。在本文中使用时,是指通过下述方法确定的物理参数:所述粘度可使用 Carri-Med CSL 流变仪 (Carri-Med CSL rheometer) 测定。所使用的几何结构为圆锥形 (6cm 2 度丙烯酸树脂锥 (6cm 2deg acrylic cone)), 且将板和几何结构之间的空隙设定为 55 μm 。将 0 至 150s^{-1} 的线性连续斜剪切速率 (ramp shear rate) 应用 20 秒。应注意,本发明还涵盖粉末形式的组合物,带有用于制备水溶液——例如通过以某一比例加入水,然后获得指定的粘度——的说明书。

[0105] 大便不规律 (例如大便硬、大便量不足、腹泻) 在很多婴幼儿和接受液体食品的患病受试者中是一个主要问题。已发现大便问题可通过给予摩尔渗透压浓度为 50-500mOsm/kg、更优选 100-400mOsm/kg 的液体食品形式的本发明制品而减轻。

[0106] 由于上述原因,因此同样重要的是,液体食品不具有过高的卡路里密度,但仍能提供足够的卡路里来供给受试者。因此,所述液体食品优选具有 0.1-2.5kcal/ml 的卡路里密度,甚至更优选具有 0.5-1.5kcal/ml 的卡路里密度。当用作婴幼儿配方物时,所述卡路里密度最优选 0.6-0.8kcal/ml。

[0107] 应用

[0108] 已经发现通过本发明方法获得的本发明制品可协同地刺激免疫系统。具体而言,减弱了 Th2 反应,和 / 或增强了 Th1 反应。这两种组分的结合物的效果高于单一组分的效果之和。

[0109] 本发明的制品可有利地用于治疗 and / 或预防疾病,因而本发明涉及一种用于治疗 and / 或预防哺乳动物疾病的方法,所述方法包括将本发明制品给予所述哺乳动物。换言之,本发明还涉及本发明制品用于制备一种用于治疗 and / 或预防疾病的组合物、优选营养组合物的用途。换言之,本发明涉及一种制品或含有本发明制品的营养组合物,用于治疗 and / 或预防疾病。所述哺乳动物优选是人,甚至更优选为人类婴幼儿。因此本发明还涉及本发明制品用于制备一种用于治疗 and / 或预防婴幼儿疾病的组合物、优选营养制品的用途。或换言之,本发明涉及一种制品或含有本发明制品的营养组合物,用于治疗 and / 或预防婴幼儿疾病。

[0110] 在本发明的上下文中,婴幼儿年龄为 0 至 6 岁,优选年龄为 0 至 4 岁,优选年龄 0 至 2 岁,优选年龄 0 至 1 岁。

[0111] 本发明还涉及一种用于为婴幼儿提供营养的方法,所述方法包括对所述婴幼儿给予本发明制品或营养组合物。换言之,本发明还涉及本发明制品用于制备一种用于为婴幼儿提供营养的营养组合物的用途。换言之,本发明涉及一种制品或含有本发明制品的营养组合物,用于为婴幼儿提供营养。

[0112] 本发明制品可有利地用于增强所述 Th1 反应,减弱 Th2 反应,修复 Th1/Th2 反应的不平衡,维持有利的 Th1/Th2 平衡和 / 或用于治疗 and 预防与 Th1/Th2 不平衡有关的疾病。因

此,建议用于例如促进免疫系统成熟、通过加强免疫系统而增强对病原体的抗性和 / 或支持免疫系统的组合物是本发明的一部分。在另一方面,本发明提供了一种用于治疗 and / 或预防免疫系统相关疾病的方法,所述方法包括对所述哺乳动物给予一种包含治疗有效量的本发明制品的组合物。在另一方面,本发明提供了一种增强哺乳动物的免疫反应的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物本发明制品。

[0113] 人类新生婴儿的免疫系统以过度的 Th2 反应为特征。在免疫系统成熟期间, Th1 反应增强且 Th1/Th2 平衡向成年健康人的实测值变化。因此,本发明制品尤其有利于人类婴幼儿。本发明支持婴幼儿免疫系统的成熟。在另一个实施方案中,本发明的方法涉及对 0-6 岁、优选 0-4 岁、优选 0-2 岁、更优选 0-1 岁的人给予本发明制品。在一个优选实施方案中,本发明的方法涉及促进刺激 0-6 岁、优选 0-4 岁、优选 0-2 岁、更优选 0-1 岁的人类受试者免疫系统的成熟。

[0114] 过度的 Th2 反应导致对不应该引起任何免疫反应的外来组分极端敏感,所述免疫反应例如变态反应和相关疾病,如特应性皮炎、哮喘、食物变态反应、变应性鼻炎(例如花粉变态反应)、尘螨变态反应,以及其他形式的超敏如全身过敏和急性荨麻疹。因此,本发明制品对于治疗和 / 或预防选自变态反应、食物变态反应、变应性鼻炎、哮喘、特应性皮炎、尘螨变态反应和急性荨麻疹的疾病特别有利。本发明减弱了 Th2 反应。

[0115] Th1 反应增强导致对病原性细菌和 / 或病毒的反应增强。因此,本发明制品适合治疗和 / 或预防感染。本发明制品可有利地用于治疗 and / 或预防肠道感染、全身感染 and / 或呼吸道感染。

[0116] 还发现本发明制品适合用于支持疫苗接种方法,例如加强疫苗接种方法的效果。本发明制品适合在疫苗接种之前、之中和 / 或之后支持疫苗接种反应。具体地,可合适地增强对白喉-破伤风、百日咳、脊髓灰质炎疫苗、麻疹 / 腮腺炎 / 风疹、肺炎链球菌结合疫苗、B 型嗜血杆菌结合疫苗、乙肝、甲肝、水痘、流感的疫苗接种的效果。因此,本发明制品可有利地用于治疗 and / 或预防感染,和 / 或用于增强疫苗接种反应。

[0117] 在本发明的上下文中,“预防”疾病或某一病况也指治疗具有患所述疾病或所述某一病况的危险的人。

[0118] 因此,本发明制品有利于患有免疫缺陷的人类受试者,特别是患有免疫衰老的老年人,患有 AIDS 或被人体免疫缺陷病毒感染的人,以及癌症患者,特别是正在或已经进行了化疗、放疗的癌症患者和恶病质癌症患者,患有慢性肺阻塞疾病的患者 and / 或患有糖尿病的患者。

实施例

[0119] 实施例 1:使用短双歧杆菌制备孵育混合物

[0120] 通过蒸发将用巴氏法灭菌的脱脂牛乳浓缩至基于脱脂牛乳重量计 43 重量%。将所述浓缩物冷却至 37°C,然后用每 ml 含 3×10^9 cfu 的 10% (v/w) 短双歧杆菌 CNCM I-2219 培养物接种。此接种物的制备描述于下文。初始 pH 为 6-6.1。在一个水箱中于 37°C 孵育 8 小时,同时每 2 小时定时搅拌 10 分钟,之后,将 pH 保持在 6-6.1 并且短双歧杆菌数量为 10^6 个细菌 /ml (步骤 (a))。将此浓缩物用巴氏法灭菌 (步骤 b),然后喷雾干燥,称为 BbC50cf。

[0121] 所述接种物的制备如下:将浓缩的沉淀形式的起始培养物加入用巴氏法灭菌的脱

脂乳中；并在厌氧条件下于 37°C 孵育 8 小时。在该过程中，短双歧杆菌的细胞数量增加至约 3×10^9 cfu/ml，并且酸度从约 pH 6.7 变为 pH 4.5-5.0。合适地，存在量为 0.1-0.5 克 / 升水性底物的半胱氨酸和 / 或量为 0.5-5 克 / 升水性底物的酵母提取物。

[0122] 实施例 2：使用嗜热链球菌制备孵育混合物

[0123] 通过将冷冻的接种物保持在约 40°C 下约 7 小时从嗜热链球菌 CNCM I-1620 培养物制备预热接种物。将用巴氏法灭菌的乳糖溶液 (350-450g/l) 冷却至约 45-55°C，然后用含约 3×10^9 cfu/ 毫升的约 10% (v/w) 的嗜热链球菌 CNCM I-1620 预热接种物接种。初始 pH 为约 pH 6。在一个水箱中于约 50°C 下孵育约 7 小时，同时每 2 小时定时搅拌 10 分钟，之后，将 pH 恒定在 6-8，并且嗜热链球菌数量为约 10^6 个细菌 / ml (步骤 (d))。将此浓缩物用巴氏法灭菌 (步骤 e)，然后喷雾干燥，称为 St065cf。

[0124] 实施例 3：孵育混合物和非消化性碳水化合物对 Th1 反应增强的协同效应

[0125] 方法：

[0126] 在一种小鼠模型中测试了包含以下成分的饮食的效应：(a) 根据实施例 1 制备的 BbC50cf；(b) 半乳寡糖 (Elixor) 和低聚果糖 (Raftilin HP) 的结合物；以及 (c) (a) 和 (b) 的结合物 (即包含本发明方法的步骤 c))，其中通过迟发型超敏 (DTH) 反应测量了对抗原的反应。这种用疫苗中存在的抗原局部激发后的耳部 DTH 反应是 TH1 细胞增殖的一个量度。在对感染和 / 或接种的反应过程中，Th1 细胞响应所述抗原的激发而增殖。在随后用所述抗原激发该耳部时，这些 Th1 细胞渗入耳部，并导致肿胀。Th1 细胞向耳部的渗入需要约 24 小时，因此肿胀是迟发的。在初始接种和 / 或感染过程中增殖的 Th1 细胞越多，在用所述抗原激发后观察的 DTH 越强。

[0127] 将 BbC50cf 冻干并以 3 重量%的终浓度用于小鼠饮食中。所用含有反式半乳寡糖 (GOS) (来源是 Vivinal-GOS (Borculo Domo Ingredients, Netherlands)) 和低聚果糖 (FPS) (来源是 RaftilineHP, Orafti, Tiense, Belgium) 的非消化性寡糖混合物 (GF) 的 GOS : FPS 的重量比是 9 : 1。测试了基于小鼠饮食总重计含有 1 重量%的 GF 的饮食。以基于饮食总重计含有 1 重量%的 GF 和 3 重量%的 BbC50cf 的饮食测试了非消化性寡糖和短双歧杆菌孵育混合物的结合物 (GF+BbC50cf) 的效应。

[0128] 将雌性、6 周龄 C57B1/6 小鼠 (Harlan Nederland BV, Horst, the Netherlands) 在规律的 12 小时光 / 暗条件下分组饲养。组的大小为每组 10 只动物，并且在阴性对照组中有 3 只动物。对这些动物给予半合成饮食 (Research Diet Services, Wijk bij Duurstede, the Netherlands)。根据 AIN93G 标准 (Reeves et al (1993) J Nutrition 123(11) : 1923-31) 控制饮食，添加寡糖的饮食也基于这些标准。

[0129] 在适应新住处和饮食 20 天后开始接种。在第 0 天，在接种前采集血样。在第 1 天，通过皮下注射进行第一次接种。三周后，给予一次加强接种 (第 22 天)。加强注射 9 天后 (第 31 天)，用电子数显外径千分尺 (Digimatic outside micrometer, Mitutoyo, Veenendaal, the Netherlands) 测量基础耳部厚度，并通过在小鼠耳廓中皮内 (i. c.) 注射抗原溶液诱导迟发型超敏 (DTH) 反应。24 小时后 (第 32 天)，测量 DTH 反应，采取血样并杀死小鼠。这是 24 小时后的耳部厚度减去 $t = 0$ 时的耳部厚度。

[0130] 所述疫苗接种由 100 μ l 含有比例为 1 : 1 的抗原溶液和 Stimune 佐剂 (Specol, Cedi-diagnostics BV, Lelystad, the Netherlands) 混合物的皮内 (i. c.) 注射液构成。所

述抗原溶液为 Influvac 2002/2003(Solvay Pharmaceuticals, Weesp, the Netherlands) 在 PBS 中的 1 : 100 稀释液。Influvac 是一种三价蛋白疫苗,其含有 $3 \times 30 \mu\text{g/ml}$ 三种不同流感株系的血球凝集素。对于 DTH 反应,用 $25 \mu\text{l}$ 渗析的 Influvac 对小鼠两耳进行皮内注射作为 DTH 激发物。

[0131] 结果:

[0132] 含有剂量为 1 重量%的 GF 或 3 重量%的 BbC50cf 的饮食均引起 DTH 反应的统计上不显著的微小增强。1 重量%的 GF 和 3 重量%的 BbC50cf 的结合物引起 DTH 反应的统计上显著的 89% 的增强(见表 1)。由于所述效应显著高于只含有寡糖的饮食的 DTH 反应,并且较 GF 和 BbC50cf 的累加效应——其可被计算为 DTH 的 49% 的增强——高得多,这些结果表明给予非消化性寡糖和 BbC50cf 对 Th1 反应增强提供了协同效应。实测效应表明了以下成分的结合物在本发明的应用中有利用途:至少两种非消化性碳水化合物,以及通过以下方式获得的产物:将水性底物与双歧杆菌孵育,并且随后加热所述孵育混合物和 / 或通过离心和 / 或过滤除去所述双歧杆菌细胞。

[0133] 表 1 :DTH 反应

[0134]

组:	平均 DTH μm (S. E.)	Δ DTH μm	相对 DTH
假注射	-1.7(4.6)	0	0
安慰剂	67.6(14.9)	69.3	1.00
GF	73.55(8.6)	75.25	1.09
BbC50cf	95.55(5.5)	97.25	1.40
GF+BbC50cf	129.4*(17.1)	131.1	1.89
GF+BbC50cf 理论值	101.50	103.2	1.49

[0135] * 与对照显著不同 ($P < 0.01$)

[0136] 本实验的结果表明本发明可有利地用于支持疫苗接种反应。本实验的结果还表明它可有利地用于低 Th1 反应的受试者,特别是婴幼儿。本实验结果还表明它可有利地用于低 Th1 反应的受试者,特别是患免疫衰老或处于免疫衰老风险中的老年人、HIV 患者、AIDS 患者并且 / 或者正在或已经进行了化疗和 / 或放疗的癌症患者或恶病质癌症患者、患有 COPD 的患者和 / 或患有糖尿病的患者。该模型指示基础免疫学变化,其可有益于所有免疫系统功能紊乱的病况。已知婴幼儿、老人、HIV 感染者、癌症患者、COPD 患者和 / 或糖尿病患者的免疫系统均不能完全发挥功能。对于上述全部,本发明的方法是一种可能有益的其他帮助。

[0137] 实施例 4:由短双歧杆菌和嗜热链球菌获得的孵育混合物与非消化性碳水化合物对 Th1 反应增强的提高效应

[0138] 方法:

[0139] 使用与实施例 3 中相同的小鼠模型,在独立的实验中测试了包含以下成分的饮食的效应:(a) 根据实施例 1 制备的 BbC50cf(3 重量%)以及半乳寡糖(Elixor)与低聚果糖(Raftilin HP)的结合物;(b) 根据实施例 1 制备的 BbC50cf(3 重量%)以及根据实施例 2 制备的 St065cf(3 重量%)以及(c)BbC50cf(3 重量%)、St065cf(3 重量%)和半乳寡糖及低聚果糖的结合物。

[0140] 半乳寡糖(Elixor)和低聚果糖(Raftilin HP)(GF)以 9:1 的重量比并以总饮食计 1 重量%的量存在。

[0141] 结果:

[0142] 含有 1 重量%的 GF 和 3 重量%的 BbC50cf 的结合物的饮食引起 DTH 反应统计上显著的 100%的增强(见表 2)。

[0143] BbC50cf 和 St065cf 的结合物也引起 DTH 反应统计上显著的 112%的增强。

[0144] 令人惊奇的是,全部三种成分的结合物显示出 192%的最高反应增强。

[0145] 这些结果表明通过给予非消化性寡糖加上 BbC50cf 和 St065cf 对 Th1 反应增强提供了进一步提高的效应。实测效应表明了以下成分的结合物在本发明应用中的有利用途:i) 至少两种不同的非消化性碳水化合物,ii) 通过以下方式获得的产物:将水性底物与双歧杆菌孵育、然后通过加热所述孵育混合物进行灭活和/或通过离心和/或过滤除去所述双歧杆菌细胞,以及 iii) 通过以下方式获得的产物:将水性底物与链球菌孵育、然后通过加热所述孵育混合物进行灭活和/或通过离心和/或过滤除去所述链球菌细胞。

[0146] 表 2 :DTH 反应

[0147]

组:	平均 DTH μm (S. E.)	Δ DTH μm	相对 DTH
假注射	24.3(0.6)	0	0
安慰剂	66.5(0.3)	42.2	1.00
BbC50cf+GF	108.9(0.3)*	84.6	2.00
BbC50cf+St065cf	113.6(0.3)*	89.3	2.12
BbC50cf+GF+St065cf	147.6(0.2)* ^a	123.2	2.92

[0148] * 与安慰剂相比 $p < 0.05$

[0149] ^a 与 Bbc50f+GF 以及与 Bbc50f+St065cf 相比 $p < 0.05$

[0150] 实施例 5:孵育产物和非消化性碳水化合物对 Th2 反应减弱的协同效应

[0151] 方法

[0152] 在一种小鼠模型中测试了包含以下成分的饮食的效应:(a) 根据实施例 1 制备的 BbC50cf;(b) 包含半乳寡糖(Elixor)和低聚果糖(Raftilin HP)的非消化性碳水化合物(GF)的结合物;以及(c)(a)和(b)的结合物(即包括本发明方法的步骤 c)),其中通过速发型超敏(ITH)反应测量了对变应原的反应。这种在肺中以变应原激发后的耳部 ITH 反应是 Th2 反应增强的一个量度。在对肺中变应原的反应期间,包括耳部在内的全身的肥大细

胞几乎立即脱颗粒。这些反应均涉及 IgE,其在辅助性 T 细胞发育期间反过来又需要 Th2 反应。因此 ITH 增强指示 IgE 增加并因此增强 Th2 反应。

[0153] 不含特定病原体的雄性 BALB/c 小鼠从 Charles River (Maastricht, the Netherlands) 获得。食物和饮水自由采食,小鼠在 6-9 周龄时使用。卵清蛋白 (V 级) 和氯化乙酰- β -甲胆碱 (乙酰甲胆碱) 购自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)。氢氧化铝 (AlumImject) 购自 Pierce (Rockford, IL, USA)。

[0154] 将与实施例 2 中相同的饮食测试 14 天,然后进行卵清蛋白 (OVA) 敏化,直至实验结束。通过在第 0 天和第 7 天用 100 μ l 含有吸附到 2.25mg 氢氧化铝上的 10 μ g 卵清蛋白的盐水或单独的盐水进行两次腹腔内注射来敏化小鼠。在第 35、38 和 41 天通过在有机玻璃接触室中进行 20 分钟的卵清蛋白气溶胶吸入来激发小鼠。所述气溶胶是通过使用 Pari LC Star 雾化器 (Pari respiratory Equipment, Richmond, VA, USA) 雾化卵清蛋白的盐水溶液 (10mg/ml) 而生成的。在用所述变应原卵清蛋白激发 1 小时后测量 ITH。

[0155] 结果

[0156] 所得 ITH 结果示于表 3:

[0157] 表 3: ITH 反应

[0158]

组:	平均 ITH μ m(S. E.)	Δ ITH μ m	相对 ITH
对照	104.3(3.8)	0	0
安慰剂	184.7(8.7)	80.4	1
GF	159.8(17.9)*	55.5	0.69
BbC50cf	173.1(20.3)	68.8	0.86
GF+BbC50cf	136.6(14.4)**	32.3	0.40
GF+BbC50cf 理论值	151.7	47.4	0.59

[0159] * 与对照显著不同 (*P < 0.05, **P < 0.01)。

[0160] 含有剂量为 1 重量%的 GF 或 3 重量%的 BbC50cf 的饮食均引起 ITH 反应的微小减弱。1 重量%的 GF 加 3 重量%的 BbC50cf 的结合物引起 ITH 反应统计上显著的约 60%的减弱 (见表 3)。由于所述效应显著高于只含有寡糖的饮食的 ITH 反应,并且较 GF 和 BbC50cf 的累加效应——其可被计算为 ITH 的约 40%的减弱——高得多,这些结果表明通过给予非消化性寡糖和孵育产物对 Th2 反应减弱提供了协同效应。

[0161] 实测效应表明了以下成分的结合物在本发明应用中的有利用途:非消化性碳水化合物,以及通过以下方式获得的产物:将底物与双歧杆菌孵育、并随后灭活和 / 或除去所述双歧杆菌。此实验的结果表明本发明可有利地用于支持对具体而言哮喘、变态反应、特应性皮炎、变应性结膜炎、尘螨变态反应、荨麻疹和变应性鼻炎的预防和 / 或治疗。

[0162] 实施例 6:婴幼儿乳配方

[0163] 通过混合以下成分制备一种婴幼儿配方乳：脱矿质乳清、植物脂肪、乳糖、脱脂乳、非消化性碳水化合物、乳清蛋白浓缩物、鱼油、矿物质、维生素。

[0164] 将所述脱脂乳以实施例 1 中所述的方法预孵育。

[0165] 在步骤 a) 和 b) 中通过与短双歧杆菌孵育获得的制品的浓度基于婴儿配方物的干重计为 15.6 重量%。

[0166] 在终产物中未检测到活的双歧杆菌。

[0167] 每 100ml 所述婴幼儿配方物的最终组成包含：

[0168] -66kcal

[0169] -1.3g 乳蛋白（酪蛋白和乳清蛋白）

[0170] -7.3g 消化性碳水化合物（主要为乳糖）

[0171] -3.5g 脂肪（主要为植物脂肪）

[0172] -0.8g 反式半乳寡糖（来源为 VivinalGOS）和多聚果糖（来源为 raftilinHP）

[0173] -微量元素、矿物质、维生素和其他本领域已知的微量营养素。

[0174] 所述婴幼儿乳配方声明会增强免疫系统，和 / 或降低特应性湿疹的发生率，和 / 或降低感染的发生率，和 / 或降低变态反应的发生率。

[0175] 实施例 7：婴幼儿乳配方

[0176] 通过蒸发将用巴氏法灭菌的脱脂牛乳浓缩至基于脱脂牛乳重量计约 43 重量%。将所述浓缩物冷却至约 37°C，然后用含 3×10^9 cfu/ml 的约 10% (v/w) 短双歧杆菌 CNCM I-2219 培养物接种。所述接种物按照本领域已知的方法制备。初始 pH 为 6-7.1。在一个水箱中于 37°C 孵育 8 小时，同时每 2 小时定期搅拌 10 分钟，之后，将 pH 保持在 6-7.1 并且短双歧杆菌数量为约 10^6 个细菌 /ml（步骤 (a)）。

[0177] 通过将冷冻的接种物保持在约 40°C 下约 7 小时从嗜热链球菌 CNCM I-1620 培养物制备预热接种物。将用巴氏法灭菌的乳糖溶液 (350-450g/l) 冷却至约 45-55°C，然后用含约 3×10^9 cfu/ml 的约 10% (v/w) 的嗜热链球菌 CNCM I-1620 预热接种物接种。初始 pH 为约 pH 6。在一个水箱中于约 50°C 下孵育约 7 小时，同时每 2 小时定时搅拌 10 分钟，之后，将 pH 恒定保持在 6-8，并且嗜热链球菌数量为约 10^6 个细菌 /ml（步骤 (d)）。

[0178] 将孵育制品、脱脂乳、植物脂肪、麦芽糊精、反式半乳寡糖和低聚果糖，以及公知用于婴幼儿乳配方的其他成分（例如维生素、矿物质、微量元素）均混合在一起（步骤 c、f）。

[0179] 将所述混合物用巴氏法灭菌（步骤 b、e）并随后喷雾干燥。

[0180] 每 100ml 所述婴幼儿配方物的最终组成包含：

[0181] -68kcal

[0182] -1.45g 乳蛋白（源自乳的酪蛋白和乳清蛋白；部分水解的）

[0183] -8.6g 消化性碳水化合物（主要为乳糖和麦芽糊精）

[0184] -3.1g 脂肪（主要为植物脂肪）

[0185] -0.8g 反式半乳寡糖（来源为 VivinalGOS）和多聚果糖（来源为 raftilinHP）

[0186] -微量元素、矿物质、维生素和其他本领域已知的微量营养素（牛磺酸、胆碱、肌醇、核苷酸、肉毒碱）。