



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102118976 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 26

- (21) 申请号 200980131387. 1 A23L 1/29 (2006. 01)
- (22) 申请日 2009. 06. 12 A23L 1/30 (2006. 01)
- (30) 优先权数据 A23L 1/308 (2006. 01)
  - PCT/NL2008/050375 2008. 06. 13 NL A61K 35/74 (2006. 01)
  - 08168054. 8 2008. 10. 31 EP A61P 1/12 (2006. 01)
  - A61P 11/06 (2006. 01)
  - A61P 17/00 (2006. 01)
- (85) PCT国际申请进入国家阶段日 (56) 对比文件
  - 2011. 02. 11 WO 2007045502 A1, 2007. 04. 26, 说明书第
  - 3, 6-10, 12-14 页.
  - WO 2007045502 A1, 2007. 04. 26, 说明书第
  - 3, 6-10, 12-14 页.
  - CN 1662154 A, 2005. 08. 31, 说明书全文.
  - US 20060018890 A1, 2006. 01. 26, 说明书全
  - 文.
  - US 20060233773 A1, 2006. 10. 19, 说明书全
  - 文.
  - CN 1964638 A, 2007. 05. 16, 说明书全文.
- (86) PCT国际申请的申请数据 审查员 陈红霞
- (87) PCT国际申请的公布数据
- (73) 专利权人 N. V. 努特里奇亚
- 地址 荷兰祖特梅尔
- (72) 发明人 J·施密特 E·佩林 B·斯塔尔
- G·贝姆
- (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
- (51) Int. Cl.
  - A61K 31/702 (2006. 01)
  - A23C 9/12 (2006. 01)
  - A23C 9/123 (2006. 01)
  - A23C 9/13 (2006. 01)
  - A23C 9/20 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书18页

(54) 发明名称  
用于经剖腹产分娩的婴儿的营养组合物

(57) 摘要  
本发明涉及用于喂养经剖腹产分娩的婴儿的方法, 并且涉及待给予经剖腹产分娩的婴儿的组合物, 特别是涉及通过产乳酸细菌发酵乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物和 / 或乳糖而获得的产品的应用。因此可促进所述婴儿的肠道微生物丛的快速定殖。

CN 102118976 B

1. 一种营养组合物,包含
  - a) 一种乳源产品,所述乳源产品是一种由产乳酸细菌发酵的乳基质并且所述乳基质选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物、乳糖、及其混合物,
  - b) 小于  $10^3$ cfu 的产乳酸细菌 / 克所述组合物干重,和
  - c) 至少两种选自如下的非消化性寡糖:低聚果糖、低聚半乳糖、低聚葡萄糖、低聚阿拉伯糖、低聚甘露糖、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。
2. 权利要求 1 的营养组合物,其中所述产乳酸细菌包含短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)和 / 或嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)。
3. 权利要求 2 的营养组合物,其中所述产乳酸细菌包含短双歧杆菌。
4. 权利要求 3 的营养组合物,其中所述产乳酸细菌包含短双歧杆菌 CNCM I-2219。
5. 权利要求 1-4 任一项的营养组合物,其中所述组合物包含低聚半乳糖和 / 或低聚果糖。
6. 权利要求 1-4 任一项的营养组合物,其中所述组合物包含 0.5 到 75 克非消化性寡糖 / 100 克所述组合物干重。
7. 权利要求 1-4 任一项的营养组合物,其中所述组合物包含蛋白、碳水化合物和脂肪,其中所述蛋白提供总卡路里的 5-25%,所述脂肪提供总卡路里的 25-60%,并且所述可消化性碳水化合物提供总卡路里的 30-70%。
8. 权利要求 1-4 任一项的营养组合物,其中所述组合物在  $20^{\circ}\text{C}$  和  $95\text{s}^{-1}$  的剪切速率下的粘度为 1-6mPa. s。
9. 权利要求 1-4 任一项的营养组合物,其中所述乳源产品可通过一种包括以下步骤的方法获得:
  - a) 在包含乳基质的水性培养基中以  $1 \times 10^2$  到  $5 \times 10^{10}$ cfu 产乳酸细菌 / ml 的量接种产乳酸细菌,所述水性培养基具有 4-8 的 pH,其中所述乳基质选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物、乳糖、及其混合物,
  - b) 在需氧或厌氧条件下并在  $20^{\circ}\text{C}$  -  $50^{\circ}\text{C}$  的温度下孵育所述混合物至少 2 小时,以及
  - c) 灭活和 / 或从所述水性培养基中以物理方法移除产乳酸细菌的活细胞。
10. 权利要求 1-9 任一项的组合物用于制备一种营养组合物的用途,其中所述营养组合物用于为经剖腹产分娩的婴儿提供营养。
11. 权利要求 1-9 任一项的组合物用于制备一种营养组合物的用途,其中所述营养组合物在出生一周内经肠给予经剖腹产分娩的婴儿。
12. 权利要求 1-9 任一项的组合物用于制备一种营养组合物的用途,其中所述营养组合物用于 (i) 治疗和 / 或预防经剖腹产分娩的婴儿的疾病,和 / 或 (ii) 促进经剖腹产分娩的婴儿的健康。
13. 权利要求 1-9 任一项的组合物用于制备一种营养组合物的用途,其中所述营养组合物用于在经剖腹产分娩的婴儿中诱导对产乳酸细菌的肠道耐受,和 / 或用于改善经剖腹产分娩的婴儿中富含产乳酸细菌的微生物丛的定殖。
14. 一种乳源产品用于制备一种营养组合物的用途,所述组合物包含
  - a) 一种乳源产品,所述乳源产品是一种由产乳酸细菌发酵的乳基质并且所述乳基质选

自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物、乳糖、及其混合物,和

b) 小于  $10^3$ cfu 的产乳酸细菌 / 克所述组合物干重,

用于 (i) 治疗和 / 或预防经剖腹产分娩的婴儿的疾病,和 / 或 (ii) 促进经剖腹产分娩的婴儿的健康。

15. 一种乳源产品用于制备一种营养组合物的用途,所述组合物包含

a) 一种乳源产品,所述乳源产品是一种由产乳酸细菌发酵的乳基质并且所述乳基质选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物、乳糖、及其混合物,和

b) 小于  $10^3$ cfu 的产乳酸细菌 / 克所述组合物干重,

用于在经剖腹产分娩的婴儿中诱导对产乳酸细菌的肠道耐受,和 / 或用于改善经剖腹产分娩的婴儿中富含产乳酸细菌的微生物丛的定殖。

16. 权利要求 14-15 任一项的用途,其中所述产乳酸细菌包含短双歧杆菌和 / 或嗜热链球菌。

17. 权利要求 16 的用途,其中所述产乳酸细菌包含短双歧杆菌。

18. 权利要求 17 的用途,其中所述产乳酸细菌包含短双歧杆菌 CNCM I-2219。

19. 权利要求 14-15 任一项的用途,其中所述乳源产品可通过一种包括以下步骤的方法获得:

a) 在包含乳基质的水性培养基中以  $1 \times 10^2$  到  $5 \times 10^{10}$ cfu 产乳酸细菌 /ml 的量接种产乳酸细菌,所述水性培养基具有 4-8 的 pH,其中所述乳基质选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物、乳糖、及其混合物,

b) 在需氧或厌氧条件下并在  $20^\circ\text{C}$  - $50^\circ\text{C}$  的温度下孵育所述混合物至少 2 小时,以及

c) 灭活和 / 或从所述水性培养基中以物理方法移除产乳酸细菌的活细胞。

20. 权利要求 14-15 任一项的用途,还包含蛋白、碳水化合物和脂肪,其中所述蛋白提供总卡路里的 5-25%,所述脂肪提供总卡路里的 25-60%,并且所述可消化性碳水化合物提供总卡路里的 30-70%。

21. 权利要求 14-15 任一项的用途,还包含至少一种选自如下的非消化性寡糖:低聚果糖、低聚半乳糖、低聚葡萄糖、低聚阿拉伯糖、低聚甘露糖、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。

22. 权利要求 21 的用途,其中所述非消化性寡糖选自低聚半乳糖和低聚果糖。

23. 权利要求 21 或 22 的用途,包含 0.5-75 克非消化性寡糖 /100 克所述组合物干重。

## 用于经剖腹产分娩的婴儿的营养组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于喂养经剖腹产分娩的婴儿的方法并涉及待给予经剖腹产分娩的婴儿的组合物。

### 背景技术

[0002] 出生前,婴儿的肠道通常是无菌的。在阴道分娩过程中,婴儿的肠道被母亲的阴道和 / 或排泄物细菌接种,导致源自母亲的细菌在婴儿胃肠道内定殖。母亲的健康肠道微生物丛对婴儿具有许多积极作用,例如感染发生率下降以及免疫系统增强。

[0003] 在经剖腹产分娩的婴儿中,肠道细菌的定植较迟并且是由医院环境中的细菌进行的,导致产生不同的、非最优的肠道微生物丛。**Grönlund** et al,1999,JPNG 28 :19-25 公开了剖腹产分娩后的婴儿与阴道分娩的婴儿相比肠道微生物丛的差异。与经阴道分娩的婴儿的肠道微生物丛相比,剖腹产分娩的婴儿的肠道微生物丛包括较少的细菌、较少的有益细菌和较少的有益细菌种类。具体地,经剖腹产分娩的婴儿的微生物丛的产乳酸细菌(例如双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)种)的菌群(profile)和含量不同于经阴道分娩的婴儿的双歧杆菌属种的肠道菌群和含量。这些微生物丛的差异一直持续至儿童期。

[0004] 婴儿配方通常被设计为模仿接受人母乳的婴儿体内肠道微生物丛的发育,意图使所有婴儿对人母乳和婴儿配方发生类似的反应。然而,由于定殖较迟并且非最佳,因此经剖腹产分娩的婴儿的亚群会发生不同的反应。

[0005] EP 1776877 公开了至少两种不同的微生物,或者至少一种微生物和至少一种不可消化的寡糖或者至少两种不同的双歧杆菌属种、亚种或株系用于制造一种用于对经剖腹产分娩的婴儿经肠给药的组合物的应用。这些细菌是活细菌。

[0006] WO 2007/046698 公开了一种含有非消化性寡糖的组合物用于制造一种用于对经剖腹产分娩的婴儿经肠给药的组合物的应用。任选地存在乳酸细菌。

[0007] Natren®生产特别针对婴儿设计并适合经剖腹产分娩的婴儿的益生菌产品 Life Start®。Life Start®包含活的婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)。

[0008] Heyman et al,2005,Acta Paediatrica 94 :34-36 公开了非活的微生物在用于健康婴儿的且对肠道功能有积极作用的发酵婴儿配方中的应用。

[0009] US 2006/018890 涉及通过给予双歧杆菌和一种促粘附菌株来治疗婴儿呼吸道感染和急性中耳炎的应用。优选活细菌,并且所示实验数据使用活的乳双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)和GG乳杆菌(*Lactobacillus GG*)。

[0010] EP 1364586 公开了副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)和乳双歧杆菌促进口服耐受的应用。任选地,所述细菌是死的。任选地,将这些细菌加入不包括婴儿配方的发酵产物中。

[0011] Kirjavainen et al,2003,JPNG 36 :223-227 公开了使用有活力的而非热灭活的GG乳杆菌是一种处理特应性湿疹和牛奶过敏的潜在方法。所测产物不是发酵组合物。

[0012] EP 1597978 公开了在通过婴儿排泄物发酵时多聚果糖和低聚半乳糖之间的一种

协同效应。

[0013] US 2006/0233773 公开了 GG 乳杆菌用于防止或减少呼吸道变应发生的应用。这些细菌是活的。

[0014] Mcvay et al, 2008, J Pediatr Surg 43 :25-29 公开了含有活益生菌的配方在减少肺部和胃肠细菌定殖方面优于化学酸化的、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 发酵的婴儿配方和对照婴儿配方。在经剖腹产分娩的小兔中检测了该配方。

## 发明内容

[0015] 动物实验显示在出生后两个小时内, 经阴道分娩的婴儿的肠道已经呈现对细菌的免疫反应, 而在经剖腹产分娩的婴儿中未观察到如此快速的免疫反应。此反应由细菌免疫原性因子引发并且指示对这些细菌的耐受的诱导, 从而实现肠道快速定殖。此快速免疫反应被认为对婴儿的健康发育非常重要。因此, 特别需要在经剖腹产分娩的婴儿中具有相似的作用, 特别是细菌的耐受诱导和肠道快速定殖。

[0016] 发明人认识到, 使经剖腹产分娩的新生婴儿的肠道较早接触经产乳酸细菌发酵的乳源产品, 可诱导与经阴道分娩婴儿相似的肠道对这些细菌的耐受, 实现与经阴道分娩婴儿一样的快速定殖。

[0017] 然而, 所述发酵乳自身的耐受诱导作用不足以实现足够的肠定殖。因此, 特别重要的是, 本发明组合物包含一种有效改善产乳酸细菌的肠道定殖的寡糖混合物。

[0018] 由于肠道微生物丛在婴儿发育中, 特别是在免疫系统的促进、特应性疾病的敏感性和对感染的抵抗力中具有重要作用, 因此促进经剖腹产分娩的婴儿的肠道微生物丛的快速和健康发育极其重要。

[0019] 经剖腹产分娩的婴儿是在医院环境中分娩的, 这种环境中由于医院细菌的存在而具有感染病原和 / 或腹泻的危险。此外, 与婴儿肠道被母体细菌接种的情况相比, 健康肠道微生物丛的形成受损会导致病原菌的更快定殖。本发明的一个具体目标是通过诱导婴儿肠道对有益细菌的耐受, 通过促进有益细菌优选产乳酸细菌的生长和 / 或通过减少有害细菌的生长, 来提供一种降低经剖腹产分娩的婴儿的感染和 / 或腹泻的发病率和严重度的组合物。因此本发明可有利地用于治疗 and / 或预防经剖腹产分娩的婴儿的感染。

[0020] 剖腹产分娩的婴儿具有更高的患特应性疾病 (例如食物过敏、哮喘、特应性皮炎和 / 或变应性鼻炎) 的危险。本发明的一个具体目标是提供一种通过提高有益细菌的肠道定殖来降低经剖腹产分娩的婴儿中特应性疾病 (例如特应性湿疹 (或特应性皮炎)、过敏症和 / 或哮喘) 的发病率和严重度的组合物。因此本发明可有利地用于治疗 and / 或预防经剖腹产分娩的婴儿的过敏症。

[0021] 所述已经由产乳酸细菌发酵的乳源产品包含产乳酸细菌的碎片或 / 和由产乳酸细菌分泌的产物, 例如糖蛋白、糖脂、肽聚糖、脂磷壁酸 (LTA)、鞭毛、脂蛋白、荚膜多糖和 / 或 DNA。并不希望囿于理论的, 本发明人相信这些免疫原性分子诱导肠道对产乳酸细菌定殖的耐受。在肠道中诱导对产乳酸细菌的耐受导致所需细菌的更快定殖, 而在另一方面在所述产品中不存在活细胞导致安全性的增加和产品技术性能的改善。所述安全性优点对于更易于受到感染的剖腹产分娩的婴儿来说是特别重要的。

[0022] 所述组合物包含至少两种非消化性寡糖。非消化性寡糖的存在促进产乳酸细菌

(例如乳酸杆菌和/或双歧杆菌)的生长,降低非有益细菌在胃肠道内的生长和/或直接有利地促进免疫系统。这导致有益细菌的更高定殖。因此,非消化性寡糖和由产乳酸细菌发酵获得的乳源产品的存在可协同作用并有利地导致产乳酸细菌(例如乳酸杆菌和/或双歧杆菌)的更快和更高的定殖。

[0023] 至少两种不同的非消化性寡糖的存在导致产乳酸细菌菌种更多样的微生物丛,如经阴道分娩的婴儿一样。至少两种不同的非消化性寡糖和由产乳酸细菌发酵获得的乳源产品的存在可协同作用并有利地导致产乳酸细菌特别是乳酸杆菌和/或双歧杆菌的更快、更高以及更多样的定殖。

[0024] 据观察,如在预防接种模型和过敏症模型这两种动物模型中所测试的,一种包含至少两种不同的非消化性寡糖和一种由产乳酸细菌发酵获得的乳源产品的组合物对免疫反应具有协同效应。

### 具体实施方式

[0025] 本发明涉及一种对经剖腹产分娩的婴儿提供营养的方法,所述方法包括对所述婴儿给予一种包含以下组分的营养组合物,所述营养组合物包括:

[0026] a. 一种乳源产品,所述乳源产品是一种由产乳酸细菌发酵的乳基质并且所述乳基质包含选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物和/或乳糖中的至少一种,

[0027] b. 小于  $10^3$ cfu 的产乳酸细菌/克所述组合物干重,和

[0028] c. 至少两种选自如下的非消化性寡糖:低聚果糖、低聚半乳糖、低聚葡萄糖、低聚阿拉伯糖、低聚甘露糖、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。

[0029] 本发明还涉及一种营养组合物,包含:

[0030] a. 一种乳源产品,所述乳源产品是一种由产乳酸细菌发酵的乳基质并且所述乳基质包含选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物和/或乳糖中的至少一种。

[0031] b. 小于  $10^3$ cfu 的产乳酸细菌/克所述组合物干重,和

[0032] c. 至少两种选自如下的非消化性寡糖:低聚果糖、低聚半乳糖、低聚葡萄糖、低聚阿拉伯糖、低聚甘露糖、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。

[0033] 本发明的一个方面涉及用于对经剖腹产分娩的婴儿提供营养的本发明组合物。换言之,本发明涉及一种乳源产品用于制备一种为经剖腹产分娩的婴儿提供营养的营养组合物的应用,所述组合物包含:a) 一种乳源产品,所述乳源产品是一种由产乳酸细菌发酵的乳基质并且所述乳基质包含选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物和/或乳糖中的至少一种,b) 小于  $10^3$ cfu 的产乳酸细菌/克所述组合物干重,和 c) 至少两种选自如下的非消化性寡糖:低聚果糖、低聚半乳糖、低聚葡萄糖、低聚阿拉伯糖、低聚甘露糖、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。

[0034] 在另一方面,本发明涉及一种用于一种选自以下的用途的营养组合物,其中所述

营养组合物包含 a) 一种乳源产品,所述乳源产品是一种由产乳酸细菌发酵的乳基质并且所述乳基质包含选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物和 / 或乳糖中的至少一种,和 b) 小于  $10^3$ cfu 的产乳酸细菌 / 克所述组合物干重;

[0035] I) (i) 治疗和 / 或预防经剖腹产分娩的婴儿的疾病,和 / 或 (ii) 促进经剖腹产分娩婴儿的健康;

[0036] II) 治疗经剖腹产分娩的婴儿中选自过敏症、湿疹、哮喘、感染和腹泻的疾病;以及

[0037] III) 经剖腹产分娩的婴儿中诱导对产乳酸细菌的肠道耐受,和 / 或用于改善经剖腹产分娩的婴儿中富含产乳酸细菌的微生物丛的定殖。

[0038] 换言之,本发明涉及一种乳源产品用于制备一种用于一种选自以下的用途的营养组合物的应用,所述组合物包含 a) 一种乳源产品,所述乳源产品是一种由产乳酸细菌发酵的乳基质并且所述乳基质包含选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物和 / 或乳糖中的至少一种,和 b) 小于  $10^3$ cfu 的产乳酸细菌 / 克所述组合物干重;

[0039] I) (i) 治疗和 / 或预防经剖腹产分娩的婴儿的疾病,和 / 或 (ii) 促进经剖腹产分娩的婴儿的健康;

[0040] II) 治疗经剖腹产分娩的婴儿中选自过敏症、湿疹、哮喘、感染和腹泻的疾病;以及

[0041] III) 经剖腹产分娩的婴儿中诱导对产乳酸细菌的肠道耐受,和 / 或用于提高经剖腹产分娩的婴儿中富含产乳酸细菌的微生物丛的定殖。

[0042] 在方面 I)、II) 和 III) 的进一步的实施方案中,所述组合物还包含至少一种选自如下的非消化性寡糖:低聚果糖、低聚半乳糖、低聚葡萄糖、低聚阿拉伯糖、低聚甘露糖、低聚木糖、低聚岩藻糖、阿拉伯半乳糖、葡甘露寡糖、半乳甘露寡糖、含唾液酸的寡糖和糖醛酸寡糖。优选地,所述非消化性寡糖选自低聚半乳糖和低聚果糖。优选地,所述组合物包含 0.5-75 克非消化性寡糖 / 100 克所述组合物干重。

[0043] 在本发明的上下文中,术语“乳基质”也称为“水性基质”或简称为“基质”,是由产乳酸细菌发酵的物质。在本发明的上下文中,术语“乳源产品”是产乳酸细菌对基质进行发酵所获得的产品,也称为“发酵产品”。

[0044] 发酵是一种使用内源性电子受体(其通常为有机化合物),从碳水化合物(例如乳中存在的乳糖)的氧化中产生能量的过程。此过程不同于细胞呼吸,在细胞呼吸中电子经电子传递链被供给外源性电子受体例如氧气。

[0045] 在本发明中,产乳酸细菌对乳源产品的发酵具有将乳源产品中存在的碳水化合物转化为有机酸的一般含义。除乳酸以外,这些形成的有机酸还可包含其他有机酸例如乙酸。被发酵的碳水化合物优选为乳糖。

[0046] 下面提及营养组合物之处,或者详细说明本发明的营养组合物的其他或优选实施方案时,这也适用于根据本发明的应用。

[0047] 剖腹产术

[0048] 本发明涉及向经剖腹产分娩的婴儿经肠给予一种包含可由产乳酸细菌对乳基质发酵获得的乳源产品的组合物。剖腹产术是一种通过母亲腹壁和子宫壁上的切口分娩婴儿的外科手术方法。剖腹产术通常是在对母亲或婴儿比阴道分娩更安全时进行。或者,妇女

可选择剖腹产而不是经阴道分娩她的婴儿。

[0049] 由产乳酸细菌发酵的乳源产品。

[0050] 本发明的或用于本发明的应用的一种营养组合物包含一种乳源产品,所述乳源产品是一种由产乳酸细菌发酵的乳基质并且所述乳基质包含选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物和 / 或乳糖中的至少一种。本发明的组合物优选地包含一种可由包括以下步骤的方法获得的乳源产品:

[0051] a. 在包含乳基质的水性培养基中以  $1 \times 10^2$  到  $5 \times 10^{10}$  cfu/ml 的量接种产乳酸细菌,所述水性培养基具有约 4-8 的 pH,并包含至少一种选自乳、清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物、乳糖及其混合物的乳基质,

[0052] b. 在需氧或厌氧条件下并在约 20°C -50°C 的温度下,在所述水性培养基中接种所述产乳酸细菌,优选至少 2 小时,以及

[0053] c. 灭活和 / 或从所述水性培养基中以物理方法移除产乳酸细菌的活细胞。

[0054] 任选地,此方法随后接有一个或多个以下步骤:

[0055] d. 超滤所述水性培养基,优选地通过一个或多个截留阈值为 100-300kDa 的滤膜超滤,从而获得浓缩的保留物,

[0056] e. 分级分离所述浓缩的保留物,优选地通过以下方法进行:将所述浓缩的保留物脱水,在一种缓冲液中溶解所述脱水的保留物,对所述保留物溶液进行凝胶排阻色谱,优选地在具有 600kDa 排阻阈值的柱上进行对所述保留物溶液的凝胶排阻色谱,以及

[0057] f. 回收所需级分,优选地回收在色谱结束时流出的级分,该级分包含乳源产品或由其构成。

[0058] 所述发酵产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)、鞭毛、脂蛋白、DNA 和 / 或荚膜多糖。这些碎片引起新生婴儿肠中的免疫反应,从而诱导肠道耐受并加速细菌的肠道快速定殖。使用包含直接作为最终营养产品一部分的灭活细菌和 / 或细胞碎片的发酵乳源产品是有利的,因为这会导致更高浓度的细菌细胞碎片。当应用益生菌商业制品时,它们通常被洗涤并从包含细菌细胞碎片的水性生长培养基中分离,从而减少或消除细菌细胞碎片的存在。此外,当产乳酸细菌发酵所述乳基质和 / 或发生其他相互作用时,形成了其他生物活性化合物,例如生物活性的肽和 / 或寡糖,这还促进免疫系统和 / 或促进肠道微生物丛的定殖。因此所述发酵的乳源产品与非发酵的乳源产品相比具有改进的效果。

[0059] 优选地,所述营养组合物包含基于干重计 5-100 重量%、更优选 10-100 重量%、更优选 20-90 重量%、更优选 50-80 重量%的所述发酵产品。优选地,每 100ml 所述组合物包含 1-100 重量%、更优选 2-100 重量%、更优选 5-50 重量%、再更优选 10-20 重量%的发酵产品。

[0060] 用于生产所述发酵产品的产乳酸细菌

[0061] 用于所述乳基质发酵的产乳酸细菌优选地以单一或混合培养物的形式提供。产乳酸细菌包括双歧杆菌属、乳酸杆菌属 (Lactobacillus)、肉杆菌属 (Carnobacterium)、肠球菌属 (Enterococcus)、乳球菌属 (Lactococcus)、明串珠菌属 (Leuconostoc)、酒球菌属 (Oenococcus)、片球菌属 (Pediococcus)、链球菌属 (Streptococcus)、四联球菌属 (Tetragenococcus)、漫游球菌属 (Vagococcus) 和食窦魏斯氏菌属 (Weissella)。优选地,



用于发酵的产乳酸细菌包括乳酸杆菌属和 / 或双歧杆菌属和 / 或链球菌属的细菌。

[0062] 双歧杆菌为革兰氏阳性、厌氧、棒形细菌。当与各种双歧杆菌属种的模式菌株比较时,本发明的双歧杆菌属种优选地具有至少 95%、更优选地具有至少 97% 的 16S rRNA 序列的同一性,如在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 中所定义的。优选使用的双歧杆菌也记载于 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. 635p 中。优选地,用于发酵的产乳酸细菌包括或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*)、两歧双歧杆菌 (*B. bifidum*)、链双歧杆菌 (*B. catenulatum*)、青春双歧杆菌 (*B. adolescentis*)、嗜热双歧杆菌 (*B. thermophilum*)、没食子双歧杆菌 (*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*)、假链双歧杆菌 (*B. pseudocatenulatum*)、嗜酸热双歧杆菌 (*B. thermacidophilum*) 和长双歧杆菌 (*B. longum*),更优选地选自短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、两歧双歧杆菌、链双歧杆菌和长双歧杆菌,更优选地选自短双歧杆菌和长双歧杆菌,甚至更优选短双歧杆菌,最优选保藏于法国巴黎 CNCM 的短双歧杆菌 I-2219。优选地,用于发酵的产乳酸细菌包括至少一种,更优选地至少两种,再更优选地至少三种,最优选地至少四种不同的双歧杆菌属种。优选地,用于发酵的产乳酸细菌至少包括长双歧杆菌和 / 或短双歧杆菌。上述组合主要旨在增加对经剖腹产分娩的婴儿肠道中更多样的微生物的耐受。这有益地影响婴儿,显示出多种健康益处。

[0063] 乳酸杆菌为革兰氏阳性、厌氧、棒形细菌。当与各种乳酸杆菌属种的模式菌株比较时,本发明的乳酸杆菌属种优选地具有至少 95%、更优选地具有至少 97% 的 16S rRNA 序列的同一性,如在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 中所定义的。优选地,用于发酵的产乳酸细菌包含至少一种、更优选地至少两种选自以下的乳酸杆菌属种:干酪乳酸杆菌 (*L. casei*)、罗伊氏乳酸杆菌 (*L. reuteri*)、副干酪乳酸杆菌 (*L. paracasei*)、鼠李糖乳酸杆菌 (*L. rhamnosus*)、嗜酸乳酸杆菌 (*L. acidophilus*)、约氏乳酸杆菌 (*L. johnsonii*)、乳酸乳杆菌 (*L. lactis*)、唾液乳酸杆菌 (*L. salivarius*)、卷曲乳酸杆菌 (*L. crispatus*)、加氏乳酸杆菌 (*L. gasseri*)、玉米乳酸杆菌 (*L. zeae*)、发酵乳酸杆菌 (*L. fermentum*) 和植物乳酸杆菌 (*L. plantarum*),更优选地干酪乳酸杆菌、副干酪乳酸杆菌、鼠李糖乳酸杆菌、约氏乳酸杆菌、嗜酸乳酸杆菌和发酵乳酸杆菌,甚至更优选副干酪乳酸杆菌。甚至更优选地,用于发酵的产乳酸细菌包括短双歧杆菌和 / 或副干酪乳酸杆菌,因为即使向婴儿配方中加入非消化性乳糖,这些细菌在配方奶粉喂养的婴儿肠道中的生长与母乳喂养的婴儿相比仍有缺陷。进一步增加的生物多样性对经剖腹产分娩的新生儿的健康具有促进作用。

[0064] 优选地,用于发酵的产乳酸细菌包括至少一种选自肉杆菌属、肠球菌属、乳球菌属、明串珠菌属、酒球菌属、片球菌属、链球菌属、四联球菌属、漫游球菌属和食窦魏斯氏菌属的微生物,更优选地包括或为嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)。进一步增加的生物多样性对经剖腹产分娩的新生儿的健康具有促进作用。

[0065] 接种密度优选为  $1 \times 10^2$  到  $5 \times 10^{10}$ , 优选  $1 \times 10^4$  到  $5 \times 10^9$  cfu 产乳酸细菌 / ml 含有乳基质的水性培养基, 更优选  $1 \times 10^7$  到  $1 \times 10^9$  cfu 产乳酸细菌 / ml 含有乳基质的水性培养基。发酵后最终细菌密度优选为  $1 \times 10^3$  到  $1 \times 10^{10}$ , 更优选  $1 \times 10^4$  到  $1 \times 10^9$  cfu/ml 含有乳基质的水性培养基。

[0066] 优选地, 本发明的营养组合物包括灭活的产乳酸细菌和 / 或源于产乳酸细菌的细菌碎片, 所述灭活的产乳酸细菌和 / 或所述细菌碎片获自大于  $1 \times 10^2$  cfu 的产乳酸细菌 / 克所述最终组合物干重、更优选  $1 \times 10^4$  cfu、更优选  $1 \times 10^5$  cfu。优选地, 所述灭活细菌或细菌碎片获自小于  $1 \times 10^{11}$  cfu 的产乳酸细菌 / 克所述最终组合物干重、更优选  $1 \times 10^{10}$  cfu、甚至更优选  $1 \times 10^9$  cfu。

#### [0067] 发酵方法

[0068] 要发酵的乳基质选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物、乳糖及其混合物, 最优选脱脂乳。乳可为全乳、半脱脂乳和 / 或脱脂乳。乳清可为甜乳清和 / 或酸乳清。优选地, 所存在的乳清的浓度为 3-80 克干重 / 升含有乳基质的水性培养基、更优选 40-60 克干重 / 升。优选地, 所存在的乳清蛋白水解物为 2-80 克干重 / 升含有乳基质的水性培养基、更优选 5-15 克干重 / 升。优选地, 所存在的乳糖为 5-50 克干重 / 升水性基质、更优选 1-30 克干重 / 升。优选地, 所述含有乳基质的水性培养基包含缓冲盐以将 pH 保持在所需范围内。优选地, 使用磷酸二氢钠或磷酸二氢钾作为缓冲盐, 优选地 0.5-5 克 / 升, 更优选 1.5-3 克 / 升。优选地, 所述含有乳基质的水性培养基以 0.1-0.5 克 / 升水性基质, 更优选 0.2-0.4 克 / 升水性基质的量包含半胱氨酸。半胱氨酸的存在导致对产乳酸细菌特别是双歧杆菌的活性有利的低基质氧化还原电势。优选地, 所述含有乳基质的水性培养基以 0.5-5 克 / 升含有乳基质的水性培养基, 更优选 1.5-3 克 / 升含有乳基质的水性培养基的量包含酵母提取物。酵母提取物是产乳酸细菌的酶辅因子和生长因子的丰富来源。酵母提取物的存在会提高产乳酸细菌的发酵。

[0069] 适当地, 在发酵步骤前将所述含有乳基质的水性培养基巴氏灭菌以除去不想要的活细菌。适当地, 在发酵步骤后将所述产品巴氏灭菌以灭活酶。适当地, 酶灭活是在  $75^\circ\text{C}$  下进行 3 分钟。适当地, 在发酵前将所述含有乳基质的水性培养基均质, 和 / 或在发酵后将所述乳源产品均质。均化可产生更稳定的基质和 / 或发酵产品, 特别是在存在脂肪的情况下。

[0070] 所述发酵优选地在约  $20^\circ\text{C}$  -  $50^\circ\text{C}$ 、更优选  $30^\circ\text{C}$  -  $45^\circ\text{C}$ 、甚至更优选约  $37^\circ\text{C}$  -  $42^\circ\text{C}$  的温度下进行。对于产乳酸细菌 (更优选乳酸杆菌和 / 或双歧杆菌) 的生长和 / 或活性的最佳温度为  $37^\circ\text{C}$  -  $42^\circ\text{C}$ 。

[0071] 孵育优选地在 4-8、更优选 6-7.5 的 pH 下进行。此 pH 不引起蛋白沉淀和 / 或不良味道, 同时产乳酸细菌例如乳酸杆菌和 / 或双歧杆菌能够发酵所述乳基质。

[0072] 所述孵育时间优选地为至少 2 小时, 优选 4-48 小时, 更优选 6-24 小时, 甚至更优选 6-12 小时。足够长的时间可使发酵和免疫原性细胞碎片 (例如糖蛋白、糖脂、肽聚糖、脂磷壁酸 (LTA)、鞭毛、脂蛋白、DNA 和 / 或荚膜多糖) 的同时生产以较高程度发生, 然而由于经济原因孵育时间不需不必要地长。

[0073] 任选地, 可在上述方法后进行一个或多个以下步骤:

[0074] i) 在发酵后通过截留阈值为 100-300kDa 的滤膜超滤所述乳源产品以获得浓缩的保留物。所述膜优选聚醚砜膜, 并且过滤优选地在低于  $60^\circ\text{C}$  的温度下进行。

[0075] ii) 用水洗涤所述浓缩的保留物。

[0076] iii) 使所述浓缩的保留物脱水, 优选地通过冷冻干燥进行。

[0077] iv) 将所述脱水的保留物溶解于一种缓冲液中, 优选 pH 6-8 的 Tris 缓冲液中。

[0078] v) 在一个具有 600kDa 排阻阈值的柱上进行所述保留物溶液的凝胶排阻色谱, 优选 Dextran 或琼脂糖柱例如 Superdex<sup>®</sup> 200。

[0079] vi) 用具有截留值为 10kDa 的膜对所述产品进行脱盐。回收在色谱结束时流出的级分, 该级分包含乳源产品或由其构成。

[0080] 还可加入用于生产需要获得的营养组合物的其他组分。通常它们在上面的步骤 vi) 后加入。对于婴儿乳配方, 可加入本领域已知的诸如脱脂乳、乳清、乳糖、植物脂肪、矿物质、维生素等成分。

[0081] 优选地, 将乳基质优选脱脂乳巴氏灭菌、冷却并用一种或多种乳酸杆菌属菌株发酵至某个酸度, 然后将发酵产品冷却并保存。优选地, 使用一种或多种用于发酵的双歧杆菌属种以类似方式替代所述乳酸杆菌属菌株制备第二种乳源产品。随后, 优选地将所述两种发酵产品混合在一起并混以除脂肪成分以外的其他构成婴儿配方的成分。优选地, 将所述混合物预热, 随后依次加入脂肪、匀化、巴氏灭菌和干燥。

[0082] 优选地, 将乳基质优选乳糖巴氏灭菌、冷却并用一种或多种嗜热链球菌菌株发酵, 然后将发酵产品冷却并保存。优选地, 使用脱脂乳以及一种或多种用于发酵的双歧杆菌属种以类似方式替代所述嗜热链球菌菌株制备第二种乳源产品。随后, 优选地将所述两种发酵产品混合在一起并混以构成婴儿配方的其他成分, 巴氏灭菌并干燥。

[0083] 一种用于制备本发明发酵产品的优选方法公开于 WO 01/01785, 更具体地在实施例 1 和 2 中。一种用于制备本发明发酵产品的优选方法记载于 WO 2004/093899, 更具体地在实施例 1 中。

[0084] 灭活和 / 或以物理方法移除活细胞的方法

[0085] 优选地, 在发酵后必须将乳源产品中产乳酸细菌的活细胞全部除去, 例如通过灭活和 / 或物理移除。优选地将所述细胞灭活。优选地通过选自以下的方法灭活所述活细菌细胞: 热处理、UV 处理、声波处理、氧处理、用杀菌剂如乙醇处理、超高压处理、高压均化和 / 或使用细胞破碎仪。优选地, 在乳源产品的发酵后将产乳酸细菌热杀。热杀的优选方法为巴氏灭菌、消毒、超高温处理、烹饪喷雾 (spray cooking) 和 / 或在细菌不能存活温度下喷雾干燥。细胞碎片优选地通过以下方法获得: 热处理、声波处理、用杀菌剂如乙醇处理、超高压处理、高压均化和 / 或使用细胞破碎仪。优选地, 通过物理移除将细菌的完整细胞从发酵产物中除去, 例如通过过滤或离心, 如以 3000g 离心 1 小时, 然后完整细胞留在沉淀或保留物中而细胞碎片留在上清液 / 和滤出液中。活细胞的灭活和 / 或物理移除使得活产乳酸细菌的量在本领域已知的常规平板培养技术的检出限以下。此检出限为小于  $10^3$  cfu 产乳酸细菌的活细胞 / 克组合物干重。

[0086] 灭活活细胞的优点在于: 在生产后可将最终营养组合物巴氏灭菌和 / 或消毒, 因此减少了被有害微生物例如坂崎肠杆菌 (*E. sakazakii*) 污染的机率。这对于经剖腹产分娩的婴儿特别重要, 因为他们由于肠道定殖延迟而更易感染。因此本发明可制备液体的、即用配方并可将其保存在室温。此外, 每名婴儿和 / 或幼儿接受的生物活性成分的剂量可被更容易地控制, 因为在液体产品中以及在婴儿的肠道中均无额外生长发生。后者 ( 婴儿肠道

中的生长)是一种取决于个体肠道环境的可变因素,从而导致各个婴儿中有益效果程度的差异。

[0087] 其他优点在于:所述营养组合物可以更容易地保存并降低成本,因为不必采取特殊预防措施以将产乳酸细菌的活力保持在可接收水平上。特别是对于水活性高于 0.3 的产品。在水活性高的保存产品中中和 / 或在用水重溶后且饮用前的婴儿配方中也不存在后酸化。这样避免了涉及蛋白凝结的不利作用和不良口味。

#### [0088] 非消化性寡糖

[0089] 本发明组合物优选地包含至少两种非消化性寡糖。所述非消化性寡糖优选地促进所述肠道产乳酸细菌(特别是双歧杆菌和 / 或乳酸杆菌,更优选双歧杆菌)的生长。非消化性寡糖的存在促进产乳酸细菌例如乳酸杆菌和 / 或双歧杆菌的生长,降低非有益细菌在胃肠道内的生长和 / 或直接有利地促进免疫系统。这导致有益细菌的更高定殖。因此,非消化性寡糖和由产乳酸细菌发酵获得的乳源产品的存在协同作用并且有利地导致产乳酸细菌例如乳酸杆菌和 / 或双歧杆菌的更快和更高的定殖。

[0090] 至少两种不同的非消化性寡糖的存在导致具有不同的产乳酸细菌种的更多样的微生物丛,如经阴道分娩的婴儿一样。至少两种不同的非消化性寡糖和由产乳酸细菌发酵获得的乳源产品的存在协同作用并有利地导致产乳酸细菌(特别是乳酸杆菌和 / 或双歧杆菌)的更快、更高以及更多样的定殖。本发明中所用的术语“寡糖”是指聚合度(DP)为 2-250、优选 2-100、更优选 2-60、甚至更优选 2-10 的糖。如果本发明组合物中包括 DP 为 2-100 的寡糖,那么这就包括含有 DP 为 2-5、50-70 和 7-60 的寡糖的组合物。本发明中所用的术语“非消化性寡糖”是指在存在于人上消化道(小肠和胃)中的酸或消化酶作用下在肠道内不被消化,但优选地被人肠道微生物丛发酵的寡糖。例如,蔗糖、乳糖、麦芽糖和麦芽糊精被认为是消化性的。

[0091] 优选地,本发明的非消化性寡糖是可溶的。当本文所用的术语“可溶的”涉及多糖、纤维或寡糖时,是指至少根据 L. Prosky et al., J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 1017-1023(1988) 所述的方法是可溶的物质。

[0092] 优选地,本发明组合物包含 DP 为 2-250、更优选 2-60 的非消化性碳水化合物。所述非消化性碳水化合物为选自以下的至少两种:低聚果糖、低聚半乳糖、低聚葡萄糖、低聚阿拉伯糖、低聚甘露糖、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,本发明组合物包含低聚果糖、低聚半乳糖和 / 或半乳糖醛酸寡糖,更优选地低聚半乳糖,最优选  $\beta$ -低聚半乳糖。低聚果糖类包括菊糖,低聚半乳糖类包括反式低聚半乳糖或  $\beta$ -低聚半乳糖,低聚葡萄糖类包括低聚龙胆糖、低聚黑曲霉糖(nigero-oligosaccharide)、低聚环糊精糖和聚葡萄糖,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。

[0093] 本发明的组合物优选地包含至少两种具有不同平均聚合度(DP)的非消化性寡糖。优选地,重量比为:

[0094] a. (DP 为 2-5 的非消化性寡糖):(DP 为 6、7、8 和 / 或 9 的非消化性寡糖) > 1; 和 / 或

[0095] b. (DP 为 10-60 的非消化性寡糖):(DP 为 6、7、8 和 / 或 9 的非消化性寡糖) > 1.

[0096] 优选地,两种重量比均大于 2,甚至更优选地大于 5。

[0097] 为进一步改进,本发明的非消化性寡糖优选地具有相对较高含量的短链寡糖,因为它们强烈促进双歧杆菌的生长。因此,优选地,在本发明的组合中至少 10 重量%的所述非消化性寡糖具有 2-5(即 2、3、4 和 / 或 5) 的 DP 并且至少 5 重量%的非消化性寡糖具有 10-60 的 DP。优选至少 50 重量%、更优选至少 75%的所述非消化性中性寡糖具有 2-9(即 2、3、4、5、6、7、8 和 / 或 9) 的 DP。

[0098] 更优选地,所述组合包含低聚半乳糖。优选地,低聚半乳糖选自  $\beta$ -低聚半乳糖、乳-N-四糖(LNT)、乳-N-新四糖(新-LNT)、岩藻糖基乳糖、岩藻糖化的 LNT 和岩藻糖化的新-LNT。在本发明的一个特别优选的实施方案中,本发明组合包含  $\beta$ -低聚半乳糖。本发明所用的  $\beta$ -低聚半乳糖是指由聚合度(DP)为 2-20 的、基于单体亚基计多于 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%、甚至更优选至少 90%的半乳糖单元通过  $\beta$ -糖苷键(优选  $\beta$ -1,4-糖苷键)连接在一起。 $\beta$ 键在人乳的寡糖中也是主要的。所述平均 DP 优选 3-6。半乳糖单元链的还原端可存在葡萄糖单元。 $\beta$ -低聚半乳糖有时也称作反式低聚半乳糖(TOS)。 $\beta$ -低聚半乳糖的一个合适来源为 Vivinal® GOS(可从 Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Netherlands 购得)。其他合适的来源为 Oligomate(Yakult)、Cupoligo(Nissin) 和 Bi2muno(Classado)。 $\beta$ -低聚半乳糖被发现可促进产乳酸细菌优选双歧杆菌的生长。

[0099] 优选地,所述组合包含低聚果糖。本发明中所用的低聚果糖是指以单体亚基计由大于 50%、优选大于 65%的果糖单元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  $\beta$ 糖苷键(优选  $\beta$ -2,1-糖苷键)连接在一起。半乳糖单元链的还原端可存在葡萄糖单元。优选地,所述低聚果糖的 DP 或平均 DP 为 2-250,更优选地为 2-100,甚至更优选地为 10-60。低聚果糖包含果聚糖、水解果聚糖、菊糖、水解菊糖和合成低聚果糖。优选地,所述组合包含平均聚合度(DP)为 3-6 的短链低聚果糖,更优选水解菊糖或合成低聚果糖。优选地,所述组合包含平均 DP 大于 20 的长链低聚果糖,例如 RaftilinHP。优选地,所述组合同时包含短链和长链低聚果糖。适用于所述组合的低聚果糖也容易购得,如 Raftiline® HP(Orafti)。

[0100] 更优选地,所述组合包含低聚半乳糖和低聚果糖(更优选长链低聚果糖)的组合。这一混合物促进健康肠道微生物丛特别是双歧杆菌的生长,并减少经剖腹产分娩的婴儿中的大肠杆菌(E. coli)的存在。所述混合物协同地促进产乳酸细菌特别是双歧杆菌。

[0101] 本发明组合优选地包含糖醛酸寡糖,更优选地包含半乳糖醛酸寡糖。本发明所用的术语“糖醛酸寡糖”是指其中至少 50%的单糖单元为糖醛酸的寡糖。本发明所用的术语“半乳糖醛酸寡糖”是指寡其中至少 50%的单糖单元为半乳糖醛酸的寡糖。用于本发明的半乳糖醛酸寡糖优选地通过对果胶、果胶酸盐和 / 或聚半乳糖醛酸的降解制备。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  $\beta$ 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双键。该双键有效地保护肠上皮细胞免于被病原性细菌附着。优选地,所述末端半乳糖醛酸单元之一包含 C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> 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%,甚至更优选大于 70%。糖醛酸寡糖有益地降低病原性微生物对肠道上皮细胞的粘附,从而

降低（医院）病原细菌在经剖腹产分娩的婴儿的结肠中的定殖。此外，糖醛酸寡糖还优选地促进健康肠道微生物丛的形成并被发酵，导致肠道有机酸的产生和肠道 pH 的下降，这抑制了（医院）病原性细菌的生长。

[0102] 因此，在一个实施方案中，用于本发明的应用的组合物优选地包含至少一种  $\beta$ -低聚半乳糖。在一个实施方案中，用于本发明的应用的组合物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，用于本发明的应用的组合物优选地至少包含糖醛酸寡糖。在一个实施方案中，用于本发明的应用的组合物优选地至少包含  $\beta$ -低聚半乳糖并且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，用于本发明应用的组合物优选地至少包含  $\beta$ -低聚半乳糖并且至少包含糖醛酸寡糖。在一个实施方案中，用于本发明的应用的组合物优选地至少包含短链低聚果糖和糖醛酸寡糖，或者长链低聚果糖和糖醛酸寡糖。在一个实施方案中，用于本发明的应用的组合物优选地至少包含  $\beta$ -低聚半乳糖、短链低聚果糖和糖醛酸寡糖，或者至少包含  $\beta$ -低聚半乳糖、长链低聚果糖和糖醛酸寡糖。与单一非消化性碳水化合物相比，至少两种不同非消化性碳水化合物的混合物更大程度地有益促进肠道微生物丛的有益细菌。与单一非消化性碳水化合物相比，至少两种不同非消化性碳水化合物的混合物有益地促进肠道微生物丛的有益细菌的更多样化。优选地，两种不同非消化性碳水化合物（优选  $\beta$ -低聚半乳糖和低聚果糖）的混合物之间的重量比为 20-0.05，更优选 20-1。 $\beta$ -低聚半乳糖更类似于人乳的寡糖。优选地，本发明的组合物包含 DP 为 2-10 的  $\beta$ -低聚半乳糖和 / 或 DP 为 2-60 的低聚果糖。此组合被发现可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促进了双歧杆菌。反式低聚半乳糖：低聚果糖：果胶降解产物的重量比优选为 (20-2) : 1 : (1-20)，更优选地为 (12-7) : 1 : (1-3)。

[0103] 优选地，所述组合物包含 80mg 到 2g、更优选 150mg 到 1.50g、甚至更优选 300mg 到 1g 的非消化性寡糖 / 100ml。基于干重计，所述组合物优选地包含 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%的非消化性寡糖。较少量的非消化性寡糖在促进微生物群中有益细菌方面不太有效，而过高量的非消化性寡糖会造成腹胀和腹部不适的副作用。

#### [0104] 配方

[0105] 用于本发明的组合物优选为营养组合物和 / 或药物组合物并适合给予婴儿。本发明组合物优选经肠给予，更优选口服。

[0106] 本发明组合物优选为营养配方，更优选婴儿配方。本发明组合物可有益地用作一种婴儿完全营养品。本组合物优选地包含脂质成分、蛋白成分和碳水化合物成分并优选地以液体形式给予。本发明包括附有将所述干食品混合物与合适的液体（例如水）混合的指导说明的干食品（如粉末）。

[0107] 本发明有益地提供了一种组合物，其中脂质提供总卡路里的 5-50%，蛋白提供总卡路里的 5-50%，可消化性碳水化合物成分提供总卡路里的 15-90%。优选地，在本发明组合物中，脂质提供总卡路里的 35-50%，蛋白提供总卡路里的 7.5-12.5%，可消化性碳水化合物提供总卡路里的 40-55%。为计算蛋白提供的总卡路里的百分比，需要考虑由蛋白、肽和氨基酸提供的总能量。

[0108] 本发明组合物优选地包含至少一种选自动物脂质（不包括人脂质）和植物脂质的

脂质。优选地,本发明组合物包含植物脂质和至少一种选自鱼油、动物油、藻油、真菌油和细菌油的油的组合。本发明的组合物不包括人乳。

[0109] 所述营养制品中所用的蛋白优选地选自非人类的动物蛋白(优选乳蛋白)、植物蛋白(优选大豆蛋白和/或水稻蛋白)、其水解物、游离氨基酸及它们的混合物。本发明的组合物优选地含有酪蛋白、乳清、水解酪蛋白和/或水解乳清蛋白。优选地,所述蛋白包含完整的蛋白,更优选完整的牛乳清蛋白和/或完整的牛酪蛋白。由于本发明的组合物适合用于减少婴儿的过敏反应,因此所述蛋白优选地选自水解的乳蛋白。优选地,本发明的组合物包含水解的酪蛋白和/或水解的乳清蛋白、植物蛋白和/或氨基酸。这些蛋白的使用进一步减少了婴儿的过敏反应。这些水解蛋白的使用有益地改善了经剖腹产分娩的婴儿的发育未全的肠道对饮食蛋白成分的吸收。

[0110] 本发明的组合物优选地含有选自蔗糖、乳糖、葡萄糖、果糖、玉米糖浆固体、淀粉和麦芽糊精的可消化性碳水化合物,更优选乳糖。

[0111] 优选地,本发明的组合物的粘度为 1-60mPa. s、优选 1-20mPa. s、更优选 1-10mPa. s、最优选 1-6mPa. s。低粘度确保了液体的合适给药方式,例如通过整个奶嘴的合适通道。而且此粘度与人乳的粘度非常相似。此外,低粘度还导致正常胃排空和更好的能量摄取,这对于需要能量进行最佳生长和发育的婴儿是必需的。本发明的组合物优选地是通过将粉状组合物与水混合而制备。婴儿配方通常是以这种方式制备。因此本发明还涉及到包装的粉状组合物,其中与所述包装一起提供的还有用于将所述粉末与适量液体混合从而得到粘度为 1-60mPa. s 的液体组合物的指导说明。所述液体的粘度是在 20°C 下以  $95\text{s}^{-1}$  的剪切速率用 Physica Rheometer MCR 300(Physica Messtechnik GmbH, Ostfilden, Germany) 测定的。

[0112] 大便不正常例如(大便硬、大便量不足和腹泻)是经剖腹产分娩的婴儿的一个严重问题。这可能是由排泄物中高含量的大肠杆菌引起。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 的液体食物形式的本发明非消化性寡糖而减轻。大便不正常的减轻提高了健康肠道微生物丛的定殖和发展。

[0113] 由于上述原因,液体食品不含过高的卡路里密度,但又能提供足够的卡路里来供给受试者这一点很重要。因此,所述液体食品的卡路里密度优选地为 0.1-2.5kcal/ml,甚至更优选 0.5-1.5kcal/ml,最优选 0.6-0.8kcal/ml。

#### [0114] 应用

[0115] 在一个实施方案中,本发明提供了一种用于给予经剖腹产分娩婴儿的本发明经肠给与的营养组合物。优选地,本发明提供(i)对经剖腹产分娩婴儿的疾病的治疗和/或预防,和/或(ii)对经剖腹产分娩婴儿的健康的促进。所述疾病优选地选自双歧杆菌贫乏的微生物所致的肠道疾病。优选地,所述疾病选自过敏症、湿疹、哮喘、感染和腹泻。

[0116] 在一个方面中,本发明提供一种用于治疗选自过敏症、湿疹、哮喘、感染和腹泻的疾病的本发明的营养组合物。

[0117] 向经剖腹产分娩的新生儿提供乳源产品——所述乳源产品是经产乳酸细菌发酵的乳基质并且包含免疫原性因子(灭活的细胞和/或细菌碎片例如糖蛋白、糖脂、肽聚糖、脂磷壁酸(LTA)、鞭毛、脂蛋白、DNA和/或荚膜多糖)——可诱导对所述细菌的耐受,从而增加这些细菌的肠道定殖;和/或可降低有害细菌的定殖。这些免疫原性因子还可直接促进

双歧杆菌的生长和 / 或降低有害细菌的生长。诱导肠道对细菌的耐受导致所需细菌的更快定殖,而在另一方面在所述产品中不存在活细胞可使得安全性增加和产品技术性能改善。

[0118] 本发明优选地提供一种用于预防和 / 或治疗感染和 / 或感染疾病、特别是胃肠道感染的方法,更优选地用于治疗 and / 或预防由一种或多种选自以下的微生物引起的感染的方法:葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) (特别是金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*))、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、溶血葡萄球菌 (*S. haemolyticus*)、链球菌属 (*Streptococcus*) (特别是二型链球菌 (*Streptococcus* group B))、梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium*) (特别是艰难梭状芽孢杆菌 (*C. difficile*))、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) (特别是枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*))、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (特别是铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*))、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、克雷白杆菌属 (*Klebsiella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*) 和埃希氏菌属 (*Escherichia*) 优选大肠杆菌,所述方法包括给予本发明的营养组合物。

[0119] 优选地,本发明组合物用于一种用于治疗 and / 或预防经剖腹产分娩的婴儿中肠道感染、肠道炎症和 / 或腹泻的方法。优选地,本发明组合物用于一种用于调节经剖腹产分娩的婴儿的免疫系统的方法。因此,在另一方面,本发明提供一种用于治疗 and / 或预防经剖腹产分娩的婴儿中全身感染、尿道感染、耳炎和 / 或呼吸系统感染的方法,所述方法包括给予本发明的营养组合物。

[0120] 在另一方面,本发明提供一种用于治疗 and / 或预防经剖腹产分娩的婴儿的过敏症 (特别是食物过敏、更特别是牛乳过敏)、特应性湿疹 (例如特应性皮炎)、哮喘、变应性鼻炎和变应性结膜炎,甚至更优选过敏症和 / 或哮喘的方法,所述方法包括对所述婴儿给予包含本发明乳源发酵产品的组合物。这些健康作用是通过免疫系统、肠壁和 / 或肠道微生物丛的作用获得的。

[0121] 在本发明的上下文中,“预防”疾病或特定病症也指治疗具有患所述疾病或所述特定病症的危险的人。

[0122] 给予本发明组合物使得肠道微生物丛改善,并因此使得形成作为微生物发酵代谢终产物的有机酸。有机酸的量增加导致粘液产生的增加,促进肠道成熟和 / 或增强肠道屏障。因此,在另一方面,本发明提供一种用于降低经剖腹产分娩婴儿的肠壁渗透性和 / 或用于促进剖腹产分娩婴儿的肠壁成熟的方法,所述方法包括向所述婴儿给予包含经产乳酸细菌发酵的乳源产品的组合物。

[0123] 优选地,本发明的组合物用于诱导经剖腹产分娩婴儿的肠道对细菌的耐受,和 / 或用于提高经剖腹产分娩婴儿的微生物丛的肠道定殖以接近见于经阴道分娩婴儿中的微生物丛,和 / 或用于经剖腹产分娩婴儿中富含产乳酸细菌的微生物丛的快速定殖。

[0124] 本发明还提供一种用于促进婴儿中健康肠道微生物丛发展的方法,包括步骤 A: 混合 I) 一种营养学或药学可接受的液体;和 II) 一种干组合物,其中所述干组合物 II 包含本发明的发酵的乳源产品;以及步骤 B) 对经剖腹产分娩的婴儿给予在步骤 A) 中获得的组合物。

[0125] 本发明组合物优选在一周岁之前、优选在出生后 3 个月内、更优选在出生后 6 周内、甚至更优选在出生后 2 周内、甚至更优选在出生后 1 周内、更优选在出生后 72 小时内、最优选在出生后 48 小时内给予对经剖腹产分娩的婴儿。



## [0126] 实施例

## [0127] 实施例 1:非消化性寡糖对剖腹产分娩婴儿中微生物丛的作用

[0128] 对婴儿给予添加有 0.72 克 /100ml 平均 DP 为 2-7 的低聚半乳糖 (GOS) 和 0.08 克 /100ml 平均 DP 大于 20 的低聚果糖 (FOS, Raftilin HP®) (GFSF 组) 的婴儿配方或者给予不含非消化性寡糖的普通婴儿配方 (SF 组)。

[0129] 测定排泄物中的双歧杆菌含量。在第一周,双歧杆菌属占总细菌的百分比在经剖腹产分娩的婴儿 (n = 44) 中为 4.3%,而在经阴道分娩的婴儿 (n = 28) 中为 19.8%。在 6 周时,在经剖腹产分娩婴儿 (n = 21) 的 SF 组中双歧杆菌的百分比为 12.3%,而在经剖腹产分娩婴儿 (n = 13) 的 GFSF 组中为 17.2%。经剖腹产分娩婴儿的 SF 组的排泄物 pH 为 7.2,而经剖腹产分娩婴儿的 GFSF 组为 6.5。在经剖腹产分娩婴儿的 SF 组中大肠杆菌的百分比为 11.8%,而在经剖腹产分娩婴儿的 GFSF 组中为 0% (见表 1)。

[0130] 这些结果表明与不接受非消化性寡糖的经剖腹产分娩婴儿 (SF 组) 相比,对经剖腹产分娩的婴儿给予非消化性中性寡糖 (GFSF 组) 导致产生更多的双歧杆菌丛并使得潜在病原性细菌的含量减少。此外,所述结果表明大肠杆菌的含量因给予非消化性寡糖而减少。所述结果表明非消化性寡糖、特别是低聚半乳糖和低聚果糖在本发明组合物中的应用有益地进一步改善了对经剖腹产分娩的婴儿的当前治疗。

[0131] 表 1:在喂以含有非消化性寡糖 (GFSF) 或不含非消化性寡糖 (SF) 的配方的经阴道和剖腹产分娩的婴儿中双歧杆菌的百分比。

[0132]

婴儿	第一周的双歧杆菌 (%)	6 周后的双歧杆菌 (%)	排泄物 pH	大肠杆菌 (%)
阴道分娩	19.8			
剖腹产 SF	4.3	12.3	7.2	11.8
剖腹产 GFSF	4.3	17.2	6.5	0

## [0133] 实施例 2:包含灭活短双歧杆菌的发酵乳源产品的制备

[0134] 通过两步法获得短双歧杆菌 CNCM I-2219 培养物的发酵产品。将浓缩沉淀形式的起始培养物加入巴氏灭菌的脱脂乳中;并在缺氧条件下于 37°C 孵育 8 小时。在该方法过程中,短双歧杆菌细胞的数量增加至约  $3 \times 10^9$  cfu/ml,并且酸度从约 pH 6.7 变为 pH 4.5-5.0,表明发酵过程正在进行。合适地,存在其量为 0.1-0.5 克 / 升的半胱氨酸和 / 或其量为 0.5-5 克 / 升的酵母提取物。

[0135] 然后将此发酵产品在浓缩的巴氏灭菌的脱脂乳 (43 重量%干物质) 中稀释 10 倍,温度为 37°C。此稀释步骤使所述脱脂乳的初始 pH 降至 6-6.1。在一个水箱中并且在每 2 小时定期搅拌 10 分钟的情况下于 37°C 孵育 8 小时后, pH 保持 6-6.1 并且短双歧杆菌数量为  $10^6$  cfu/ml。将此浓缩液巴氏灭菌,然后喷雾干燥,称为 BbC50cf。活的短双歧杆菌细胞的量低于检测限 ( $< 10^3$  cfu/克)。

## [0136] 实施例 3:在小鼠接种模型中,包含灭活短双歧杆菌的发酵乳源产品和非消化性

寡糖对 Th1 反应增加的协同效应。

[0137] 方法：

[0138] 在一个小鼠模型中测试了包含 (a) 根据实施例 2 制备的 BbC50cf ;(b) 低聚半乳糖 (Elixor) 和低聚果糖 (Raftilin HP) 的组合 ;以及 (c) 即 (a) 和 (b) 的组合作用的作用,其中通过迟发型超敏 (DTH) 反应测量了对一种抗原的反应。这种在被疫苗中存在的抗原局部激发后的耳中 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。这些 Th1 细胞在耳部被所述抗原激发时浸润耳部,并导致肿胀。Th1 细胞在耳中的浸润需要约 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,观察到的被所述抗原激发的 DTH 反应越强。

[0139] 将 BbC50cf 冻干并以 3 重量%的终浓度用于小鼠饮食中。所用的含有反式低聚半乳糖 (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 重量比是 9 : 1。测试了含有 1 重量%的 GF 的饮食 (基于小鼠饮食总重计)。测试了含有非消化性寡糖和短双歧杆菌发酵混合物的组合 (GF 加 BbC50cf) 的饮食的作用,其中所述饮食含有 1 重量%的 GF 和 3 重量%的 BbC50cf (基于饮食总重计)。

[0140] 将雌性、6 周龄 C57B1/6 小鼠 (Harlan Nederland BV, Horst, the Netherlands) 在规律的 12 小时光 / 暗方案下分组饲养。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的饮食 (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。

[0141] 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)。加强注射后 9 天 (第 31 天),用电子数显外径千分尺 (Digimatic outside micrometer, Mitutoyo, Veenendaal, the Netherlands) 测量基础耳厚度并且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,采集血液样品并杀死小鼠。这是 24 小时后的耳厚度减去  $t = 0$  时的耳厚度。

[0142] 接种由皮内 (i. c.) 注射 100  $\mu$ l 1 : 1 混合的抗原溶液和 Stimune 佐剂 (Specol, Cedi-diagnostics BV, Lelystad, the Netherlands) 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 是三价蛋白疫苗,含有 3x3011g/ml 的三种不同流行性感冒菌株的血球凝集素。对于 DTH 反应,在小鼠两耳中均皮内注射 25  $\mu$ l 经透析的 Influvac 作为 DTH 激发物。

[0143] 结果：

[0144] 含有 1 重量%的 GF 或 3 重量%的 BbC50cf 的剂量的饮食均在诱导了 DTH 反应统计上不显著的轻微增加。1 重量%的 GF 或 3 重量%的 BbC50cf 的组合诱导了 DTH 反应在统计上显著增加 89% (见表 2)。由于效果显著高于只含寡糖的饮食的 DTH 反应,并且比 GF 和 BbC50cf 的累加效应高得多,所述累加效应可计算为 DTH 增加 49%,因此这些结果表明给予非消化性寡糖和 BbC50cf 对 Th1 反应的增加具有协同效应。观察到的效应表明了通过发酵包含灭活产乳酸细菌的乳源产品而获得的产品和至少两种不同非消化性碳水化合物的组合在本发明用途中的有益应用。

[0145] 表 2 :DTH 反应

[0146]

组:	平均 DTH $\mu\text{m}$ (S.E.)	$\Delta$ DTH $\mu\text{m}$	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

[0147] \* 与对照显著不同 ( $P < 0.01$ )。

[0148] 实施例 4:在小鼠过敏症模型中,包含灭活短双歧杆菌的发酵乳源产品和非消化性寡糖对 Th2 反应降低的协同效应。

[0149] 方法

[0150] 在一个小鼠模型中测试了实施例 3 中饮食的作用,其中通过速发型超敏 (ITH) 反应测量了对一种变应原的反应。这种用肺中的变应原激发后的耳中 ITH 反应是 TH2 反应增加的一个量度。在对肺中变应原的应答过程中,肥大细胞几乎立即系统性脱颗粒(包括在耳中)。这些反应均涉及 IgE,其转而在辅助性 T 细胞发育过程中又需要 Th2 反应。因此 ITH 提高表明了 IgE 增加并因此表明了 Th2 反应增加。

[0151] 无特异性病原体的雄性 BALB/c 小鼠是从 Charles River (Maastricht, the Netherlands) 获得的。食物和水以自由采食的方式提供,并且小鼠在 6-9 周龄时使用。卵清蛋白 (V 级) 和氯化乙酰- $\beta$ -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)。

[0152] 在 OVA 致敏之前,用与实施例 3 中相同的饮食测试 14 天,直至实验结束时。通过在第 0 天和第 7 天两次腹膜内注射吸附在溶于 100  $\mu\text{l}$  盐水中的 2.25mg 氢氧化铝上的 10  $\mu\text{g}$  卵清蛋白或只注射盐水而将小鼠致敏。通过在第 35、38 和 41 天在有机玻璃接触室中吸入卵清蛋白气溶胶 20 分钟激发小鼠。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中的溶液 (10mg/ml) 而产生的。在用所述变应原卵清蛋白激发后 1 小时测量 ITH。

[0153] 结果

[0154] 关于 ITH 的结果示于表 3 中:

[0155] 表 3 :ITH 反应

[0156]

组:	平均 ITH $\mu\text{m}$ (S.E.)	$\Delta$ ITH $\mu\text{m}$	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

[0157] \* 与对照显著不同 (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01)。

[0158] 含有 1 重量%的 GF 或 3 重量%的 BbC50cf 的剂量的饮食均在诱导了 ITH 反应的轻微降低。1 重量%的 GF 与 3 重量%的 BbC50cf 的组合诱导了 ITH 反应在统计上显著降低约 60% (见表 3)。由于效果显著高于只含寡糖的饮食的 ITH 反应,并且比 GF 和 BbC50cf 的累加效应高得多,所述累加效应可计算为 ITH 降低约 40%,因此这些结果表明通过给予非消化性寡糖和乳源发酵产品对 Th2 反应的降低具有协同效应。

[0159] 观察到的效应表明了非消化性寡糖与一种通过如下方式获得的产品的组合在本发明用途中的有益应用:通过以双歧杆菌发酵乳源基质,随后灭活和 / 或移除双歧杆菌从而使菌量小于  $1 \times 10^3$  cfu/g。此实验的结果表明,本发明可有益地用于支持预防和 / 或治疗——具体而言——哮喘、过敏症、特应性皮炎、变应性结膜炎、尘螨过敏症、荨麻疹和变应性鼻炎。

[0160] 实施例 5:用于经剖腹产分娩的婴儿的组合物

[0161] 制备一种婴儿配方,其中每 100 克干物质包含:蛋白(80%酪蛋白和 20%乳清);植物脂肪 25.5 克;乳糖 42.25 克;麦芽糊精 16 克;矿物质 3 克;维生素 0.25 克。

[0162] 将植物脂肪加入加热至 75°C 的牛乳中。将此混合物分两步均化,第一步以 200kg.s/cm<sup>2</sup>,第二步以 50kg.s/cm<sup>2</sup> 进行。加入乳糖、麦芽糊精、维生素和矿物质的水溶液。将所述组合物在 115°C 下巴氏灭菌并通过蒸发至 48%干物质浓缩。将此浓缩物冷却至 37°C 并于 37°C 以含有  $10^9$  细菌 /ml 的 5%的短双歧杆菌 1-2219 的培养物发酵 8 小时。随后将所述浓缩物再次巴氏灭菌。

[0163] 将所述浓缩物喷雾干燥并在每升水中加入 140 克以提供重溶的婴儿乳配方。非消化性寡糖的加入量是每 100ml 即饮配方中 0.72 克  $\beta$  低聚半乳糖和 0.08g 菊糖。所述产品随附的包装和 / 或辅助材料注明所述产品可合适地用于 a) 促进有益细菌的肠道定殖, b) 预防和 / 或治疗经剖腹产分娩的婴儿中的感染;和 / 或 c) 预防和 / 或治疗经剖腹产分娩的婴儿中的过敏症。

[0164] 实施例 6:用于经剖腹产分娩的婴儿的组合物

[0165] 制备一种婴儿配方,其中包含:蛋白 21 克 / 升、脂肪 24 克 / 升、碳水化合物 83 克 / 升、非消化性寡糖 8 克 / 升、矿物质 5 克 / 升、维生素 0.45 克 / 升。

[0166] 将脂肪加入 70°C 的 UHT 灭菌的乳中,并将此混合物分两步均化,第一步以 200kg/cm<sup>2</sup>,第二步以 50kg/cm<sup>2</sup> 进行。在 37°C 用含有 1 至  $5 \times 10^9$  细菌 /ml 的 1.5%的短双歧杆菌 1-2219 的培养物接种所述混合物并在 37°C 下发酵 8 小时。然后将所述混合物冷却至 5°C。将其余成分溶解于水中并加入所获得的产物中。所述组合物在每 100ml 即饮配方中包含

0.72 克  $\beta$ -低聚半乳糖和 0.08 克长链和 / 或短链菊糖。

[0167] 将所得混合物在 140°C 下 UHT 灭菌 6-7 秒并无菌包装。