



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102131399 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 20

(21) 申请号 200980133588. 5 *A23C 9/123* (2006. 01)
(22) 申请日 2009. 06. 19 *A23C 9/13* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *A23L 1/30* (2006. 01)
PCT/NL2008/050434 2008. 06. 30 NL *A23L 1/308* (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日 *A61K 31/702* (2006. 01)
2011. 02. 25 *A61K 35/74* (2006. 01)
(86) PCT申请的申请数据 *A61P 1/12* (2006. 01)
PCT/NL2009/050364 2009. 06. 19 *A61P 11/06* (2006. 01)
(87) PCT申请的公布数据
W02010/002244 EN 2010. 01. 07
(71) 申请人 N. V. 努特里奇亚
地址 荷兰祖特梅尔
(72) 发明人 J·施密特 F·里克罗伊斯
P·杰瑟尼 B·斯塔尔 G·贝姆
E·佩林
(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 钟守期
(51) Int. Cl.
A23C 9/12 (2006. 01)
A61P 17/00 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 13 页

(54) 发明名称
用于剖腹产婴儿的营养组合物

(57) 摘要

本发明涉及待给予剖腹产婴儿的组合物, 具体涉及包含革兰氏阴性细菌的灭活细胞和 / 或细菌细胞碎片以及任选的灭活的革兰氏阳性细菌的灭活细胞和 / 或细菌细胞碎片的制品。从而可以刺激在所述婴儿的肠道微生物菌群的快速定殖。

1. 一种用于向剖腹产婴儿提供营养的营养组合物,包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片,其中所述组合物包含每 g 干重组合物少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌。

2. 一种营养组合物,包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片,其中所述组合物包含每 g 干重组合物少于 10^3 cfu 的细菌。

3. 前述权利要求任一项的组合物,其中所述组合物包含灭活的革兰氏阳性细菌和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片。

4. 前述权利要求任一项的组合物,其中所述革兰氏阳性细菌包括产乳酸细菌。

5. 前述权利要求任一项的组合物,其中所述革兰氏阳性细菌包括双歧杆菌、乳杆菌和 / 或链球菌,优选短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*)。

6. 前述权利要求任一项的组合物,其中所述革兰氏阴性细菌包括拟杆菌。

7. 前述权利要求任一项的组合物,还包含至少一种、更优选至少两种选自低聚果糖、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、低聚阿拉伯半乳糖、低聚葡糖甘露糖、低聚半乳甘露糖和含有唾液酸的寡糖和糖醛酸寡糖的非消化性寡糖。

8. 权利要求 7 的组合物,其中所述组合物包含低聚半乳糖和 / 或低聚果糖。

9. 权利要求 7 或 8 任一项的组合物,其中所述组合物包含每 100g 干重组合物 0.5 至 75g 的非消化性寡糖。

10. 前述权利要求任一项的组合物,其中所述组合物包含蛋白质、脂肪和消化性碳水化合物,其中所述蛋白质提供 5 至 25% 的总卡路里、所述脂肪提供 25 至 60% 的总卡路里,并且所述消化性碳水化合物提供 30 至 70% 的总卡路里。

11. 前述权利要求任一项的组合物,其中所述组合物在出生后 1 周内经肠给予剖腹产婴儿。

12. 前述权利要求任一项的组合物,用于 (i) 治疗和 / 或预防剖腹产婴儿的病症,以及 / 或者 (ii) 刺激剖腹产婴儿的健康。

13. 前述权利要求任一项的组合物,用于治疗选自变态反应、湿疹、哮喘、感染和腹泻的病症。

14. 前述权利要求任一项的组合物,用于在剖腹产婴儿中诱导对细菌的肠道耐受和 / 或用于在剖腹产婴儿中改善肠道微生物菌群定殖。

15. 一种制备适用于剖腹产婴儿的婴儿营养物的方法,包括混合:

(a) 人乳;和

(b) 一种组合物,包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片,其中所述组合物包含每 g 干重少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌。

16. 一种装有待给予剖腹产婴儿的组合物的小袋,所述组合物包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片,其中所述组合物包含每 g 干重少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌。

17. 一种通过混合以下成分得到的用于在剖腹产婴儿中诱导对细菌的肠道耐受和 / 或

在剖腹产婴儿中改善肠道微生物菌群定殖的组合物：

i. 可营养用或可药用液体；和

ii. 干组合物，其中所述干组合物包含

灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片，其中所述干组合物包含每 g 干重少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌。

用于剖腹产婴儿的营养组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及喂食剖腹产婴儿的方法和给予剖腹产婴儿的组合物。

背景技术

[0002] 在出生前婴儿的肠道一般是无菌的。在阴道分娩过程中,婴儿的肠道会接种上母亲的阴道和 / 或粪便细菌,导致源自母亲的细菌在婴儿的胃肠道中定殖。源自母亲的健康肠道微生物菌群对婴儿有多种积极作用,例如减少感染的发生率和加强免疫系统。Negele et al,2004, *Pediatr. Allergy Immunol.* 15 :48-54 公开了剖腹产婴儿对喘鸣 (wheezing) 和变应性致敏的风险增加。

[0003] 在剖腹产婴儿中,肠道细菌的定殖被推迟,并且通过存在于医院环境中的微生物而发生,导致形成了不同的、非最优的肠道微生物菌群。与阴道分娩的婴儿的肠道微生物菌群相比,剖腹产婴儿的肠道微生物菌群包含较少的细菌,较少的有益细菌和较少的有益细菌种类。具体而言,剖腹产婴儿的微生物菌群的产乳酸菌例如双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 种的谱和量不同于阴道分娩的婴儿的双歧杆菌属种的肠道谱和量。同时,在剖腹产婴儿中,拟杆菌属 (*Bacteroides*) 种的量较少,并且拟杆菌属的定殖被推迟。微生物菌群的这些差异一直很好地持续至儿童期。**Grönlund** et al,1999, *JPGN* 28 : 19-25 公开了剖腹产后的肠道菌群与阴道分娩的婴儿的有差异。

[0004] 婴儿配方物通常被设计来模仿形成接受人乳的婴儿的肠道微生物菌群,这意味着所有婴儿对人乳和婴儿配方物的反应都相似。然而,有一小群剖腹产婴儿由于定殖推迟和非最佳将反应不同。

[0005] WO 2007/045502 公开了至少两种不同的微生物、或至少一种微生物和至少一种非消化性寡糖或者至少两种不同的双歧杆菌种、亚种或菌株用于制备向剖腹产婴儿进行肠道给予的组合物的用途。WO 2007/046698 公开了包含非消化性寡糖的组合物用于制备向剖腹产婴儿进行肠道给予的组合物的用途。**Natren®**生产了专门针对婴儿设计并且适于剖腹产婴儿的益生菌产品 **Life Start®**。Life **Start®**用婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*) 制得。

[0006] Heyman et al,2005, *Acta Paediatrica* 94 :34-36 公开了在用于健康婴儿的发酵婴儿配方物中使用死微生物,其对肠道功能有积极作用。

[0007] US 2006/018890 涉及通过给予双歧杆菌和促粘附菌株 (adherencepromoting strain) 治疗婴儿呼吸道感染和急性中耳炎的用途。优选活菌,并且所示实验数据使用了活的乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*) 和 *Lactobacillus GG*。

[0008] EP 1364586 公开了类干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 和乳双歧杆菌促进口服耐受的用途。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物的发酵产品中。

[0009] Kirjavainen et al,2003, *JPGN* 36 :223-227 公开了使用活 LGG (而不是热灭活 LGG) 是治疗特应性湿疹和牛奶过敏的潜在方法。

[0010] EP 1597978 公开了当被婴儿粪便发酵时多聚果糖 (polyfructose) 和半乳寡糖之间的协同效应。

[0011] US 2006/0233773 公开了 *Lactobacillus GG* 用于预防或减少发生呼吸道变态反应的用途。这些细菌是活细菌。

[0012] Mcvay et al, 2008, *J Pediatr Surg* 43 :25-29 公开了具有活益生菌的配方物与化学酸化的乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 发酵的婴儿配方物 and 对照婴儿配方物相比, 在减少肺部和胃肠道细菌定殖方面更优。用剖腹产的幼兔对所述配方物进行了测试。

发明内容

[0013] 动物实验表明, 在出生后两小时内阴道分娩的婴儿肠道已显示出对细菌的免疫反应, 而在剖腹产的婴儿中未观察到如此快速的免疫反应。这种反应由细菌的免疫原性因子引发, 并且指示出对这些细菌的耐受诱导, 从而能够实现在消化道的快速定殖。本发明人相信, 这种快速免疫反应对于婴儿的健康发育非常重要。因此, 特别希望在剖腹产婴儿中有相似的效应, 特别是耐受诱导和细菌在消化道的快速定殖。

[0014] 本发明人认识到, 使剖腹产新生儿的肠道及早地暴露于包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片的肠道产品会诱导与阴道分娩婴儿类似的对这些革兰氏阴性细菌的肠道耐受, 能够实现如在阴道分娩婴儿中一样的在肠道的快速定殖。所述组合物优选还包含革兰氏阳性细菌——所述革兰氏阳性细菌优选是灭活的, 和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片。革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌的灭活细胞和 / 或细菌细胞碎片的存在将有利地导致对所述两类细菌的肠道耐受。发明人认识到, 不仅对革兰氏阳性细菌的耐受诱导是重要的, 对革兰氏阴性细菌的耐受诱导也是重要的。这有别于本领域的偏见, 即革兰氏阳性细菌特别是双歧杆菌和乳杆菌被认为很重要。与阴道分娩婴儿相比, 在剖腹产的婴儿中观察到更少量的革兰氏阴性细菌, 特别是大肠杆菌和 / 或拟杆菌。

[0015] 由于肠道微生物菌群在婴儿发育中——特别是在对免疫系统的刺激、对特异性疾病的敏感性和对感染的抗性中——起到决定性作用, 它对刺激剖腹产婴儿的肠道微生物菌群的快速且健康的形成极其重要。

[0016] 剖腹产婴儿在医院环境中出生, 由于存在医院细菌因而有致病感染和 / 或腹泻的风险。此外, 与由母体细菌接种的婴儿肠道的情况相比, 健康肠道菌群的发育受阻导致致病细菌更快的定殖。本发明特别地旨在提供一种组合物, 所述组合物通过诱导婴儿消化道对有益细菌的耐受、刺激有益细菌——优选产乳酸菌——的生长、和 / 或减少有害细菌的生长来降低剖腹产婴儿的感染和 / 或腹泻的发生率和严重度。因此, 本发明的组合物可有利地用于治疗 and / 或预防剖腹产婴儿的感染。

[0017] 剖腹产婴儿患特异性疾病——例如食物变态反应、哮喘、特异性皮炎 and / 或变应性鼻炎——的风险升高。本发明特别地旨在提供一种组合物, 所述组合物通过改善有益细菌的肠道定殖来降低剖腹产婴儿的特异性疾病例如特异性湿疹 (或特异性皮炎)、变态反应 and / 或哮喘的发生率和严重度。因此, 本发明可有利地用于治疗 and / 或预防婴儿的特异性疾病。

[0018] 所述灭活的革兰氏阴性细菌 and / 或革兰氏阴性细菌的细胞碎片以及还任选的革兰氏阳性细菌 (优选为灭活的) and / 或革兰氏阳性细菌的细胞碎片包括糖蛋白、糖脂、肽聚

糖、脂多糖 (LPS)、脂磷壁酸 (lipoteichoic acid) (LTA)、鞭毛、脂蛋白、荚膜多糖和 / 或 DNA。不意欲囿于理论, 本发明人相信, 这些免疫原性分子会诱导肠道对革兰氏阴性细菌和优选还有对革兰氏阳性细菌定殖的耐受。此外, 灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细胞碎片的存在还有导致对革兰氏阴性细菌感染、肠道感染和全身感染的免疫性增强的优点。在肠道内诱导对细菌的耐受导致有益细菌的更快定殖, 而在另一方面在所述产品中不存在活细胞引起安全性的增加和产品工艺性质的改善。在更易受感染的剖腹产婴儿的情况下, 安全性优点尤其重要。在通常被认为不安全的革兰氏阴性细菌的情况下, 安全性优点尤其重要。

具体实施方式

[0019] 本发明涉及一种向剖腹产婴儿提供营养的方法, 所述方法包括向所述婴儿给予一种营养组合物, 所述营养组合物包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片, 其中所述组合物包含每 g 干重组合物少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌。

[0020] 换句话说, 本发明涉及一种用于向剖腹产婴儿提供营养的营养组合物, 包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片, 其中所述组合物包含每 g 干重组合物少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌。

[0021] 本发明还可以被表述为: 包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片的组合物用于制备用于向剖腹产婴儿提供营养的营养组合物的用途, 其中所述组合物包含每 g 干重组合物少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌。

[0022] 本发明还涉及一种营养组合物, 包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片, 其中所述组合物包含每 g 干重组合物少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌。

[0023] 本文下文任何提及本发明的营养组合物处, 或者指出本发明的营养组合物的进一步的或优选的实施方案处, 同样适用于本发明的用途。

[0024] 剖腹产

[0025] 本发明涉及向剖腹产婴儿肠道给予一种营养组合物, 所述营养组合物包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片。剖腹产 (剖宫产) 是从母亲腹壁切口、然后从子宫壁取出婴儿的手术操作。剖腹产通常在对母亲或婴儿比阴道分娩更安全时进行。或者, 女性可以选择剖腹产而不是经阴道分娩其婴儿。在本说明书通篇中, 术语“经剖腹产分娩”、“经剖腹产出生”、“剖腹生产”和“剖腹产”等可互换使用。

[0026] 灭活的细菌和 / 或细菌细胞碎片

[0027] 本发明的肠道营养组合物包含灭活的细菌和 / 或细菌细胞碎片。细菌细胞碎片的实例有糖蛋白、糖脂、肽聚糖、脂多糖 (LPS)、脂磷壁酸 (LTA)、鞭毛、脂蛋白、荚膜多糖和 / 或 DNA。本发明的组合物包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌。这将诱导对革兰氏阴性细菌和优选还有对革兰氏阳性细菌的

耐受。优选革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌的灭活细胞和 / 或细菌细胞碎片都存在, 因为两者都是在婴儿肠道中定殖的重要细菌种类。此外, 灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细胞碎片的存在还有导致对革兰氏阴性细菌感染、肠道感染和全身感染的免疫性增强的优点。

[0028] 革兰氏阴性细菌是那些在革兰氏染色步骤中由于细胞壁中的肽聚糖含量低而不保留结晶紫染料的细菌。革兰氏阴性细菌有细胞质膜, 并且还有含有 LPS 的外膜。在这两层膜之间存在一薄的肽聚糖层。不存在磷壁酸或脂磷壁酸。革兰氏阴性细菌包括蛋白菌类 (proteobacteria) 和拟杆菌类等。

[0029] 本发明使用的灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或来自其的细胞碎片优选选自拟杆菌属 (*Bacteroides*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、普雷沃氏菌属 (*Prevotella*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形菌属 (*Proteus*)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、韦荣氏球菌属 (*Veillonella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和消化链球菌属 (*Peptostreptococcus*), 更优选拟杆菌属。本发明使用的革兰氏阴性细菌优选包括选自脆弱拟杆菌 (*B. fragilis*)、多形拟杆菌 (*B. thetaiotamicron*)、普通拟杆菌 (*B. vulgatis*)、吉氏拟杆菌 (*B. distasonis*)、卵形假杆菌 (*B. ovatus*) 和单形拟杆菌 (*B. uniformis*) 的至少一种拟杆菌, 更优选脆弱拟杆菌。拟杆菌属种——婴儿中的肠道微生物菌群的一重要类别——的定殖在剖腹产婴儿中被严重推迟, 特别是脆弱拟杆菌的定殖。

[0030] 革兰氏阳性细菌是被革兰氏染色阳性染色 (深蓝色或紫色) 的细菌。革兰氏阳性生物体由于细胞壁中肽聚糖含量较高而能够保留结晶紫染料。革兰氏阳性细菌仅有一层细胞质膜, 缺乏在革兰氏阴性细菌中出现的外膜。革兰氏阳性细菌有含有磷壁酸和脂磷壁酸的厚肽聚糖层。革兰氏阳性细菌包括硬壁菌门 (*firmicutes*) 和放线菌门 (*actinobacteria*)。本发明优选的灭活的革兰氏阳性细菌和 / 或来自其的细胞碎片优选为乳酸细菌, 更优选乳杆菌属、双歧杆菌属和 / 或链球菌属的细菌。本发明使用的革兰氏阳性细菌优选包括选自短双歧杆菌 (*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*)、假小链双歧杆菌 (*B. pseudocatenulatum*)、热嗜酸双歧杆菌 (*B. thermacidophilum*) 和长双歧杆菌 (*B. longum*) 的至少一种双歧杆菌, 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、长双歧杆菌的至少一种双歧杆菌, 更优选长双歧杆菌和短双歧杆菌的至少一种双歧杆菌, 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。本发明使用的乳酸细菌优选包括至少 1 种、更优选至少 2 种、甚至更优选至少 3 种、最优选至少 4 种不同的双歧杆菌种。所使用的乳酸细菌优选包括至少长双歧杆菌和短双歧杆菌。上述组合通常旨在增加对剖腹产婴儿肠道中更广泛数量的革兰氏阳性细菌的耐受。这可有利地影响婴儿, 提供多种健康益处。

[0031] 本发明使用的革兰氏阳性细菌优选包括至少 1 种、更优选至少 2 种乳杆菌属种, 所述乳杆菌属种选自干酪乳杆菌 (*L. casei*)、路氏乳杆菌 (*L. reuteri*)、副干酪乳杆菌 (*L. paracasei*)、鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*)、嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、约

氏乳杆菌 (*L. johnsonii*)、乳酸乳杆菌 (*L. lactis*)、唾液乳杆菌 (*L. salivarius*)、卷曲乳杆菌 (*L. crispatus*)、加氏乳杆菌 (*L. gasseri*)、玉米乳杆菌 (*L. zeae*)、发酵乳杆菌 (*L. fermentum*) 和植物乳杆菌 (*L. plantarum*)，更优选干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、约氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌、发酵乳杆菌，甚至更优选副干酪乳杆菌。本发明使用的乳酸细菌甚至更优选包括短双歧杆菌和 / 或副干酪乳杆菌，因为与母乳喂养的婴儿相比，这些细菌的生长在配方物喂养的婴儿（甚至是当向所述婴儿配方物中加入非消化性寡糖时）的肠道中受抑制。进一步增加的生物多样性将对剖腹产的新生儿的健康有刺激作用。

[0032] 所使用的革兰氏阳性细菌优选包括选自肉食杆菌属 (*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*) 和魏斯氏菌属 (*Weissella*) 的至少 1 种微生物，更优选嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)。本发明所用的革兰氏阳性细菌优选包括选自瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、真杆菌属 (*Eubacterium*) 和丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*) 的至少 1 种微生物，更优选选自布氏瘤胃球菌 (*R. bromii*)、卵形瘤胃球菌 (*R. obeum*)、伶俐瘤胃球菌 (*R. callidus*)、直肠假杆菌 (*E. rectale*)、迟缓真杆菌 (*E. lentum*)、产气真杆菌 (*E. aerofaciens*) 和费氏丙酸杆菌 (*P. freudenreichii*) 的至少 1 种微生物。进一步增加的生物多样性将对剖腹产的新生儿的健康有刺激作用。

[0033] 灭活或破碎细菌的方法

[0034] 本领域已知获得活细菌细胞的生物量的方法。随后，将革兰氏阴性细菌和优选还有革兰氏阳性细菌的活细胞基本上全部除去，例如通过灭活和 / 或物理除去。优选将所述细胞灭活。活细菌细胞优选通过选自以下的方法灭活：热处理、UV 处理、超声处理、用氧处理、以杀菌剂例如乙醇处理、施加超高压、高压均浆化和 / 或使用细胞破裂器 (*cell disruptor*)。优选将所述细菌热杀死。优选的热杀死的方法有巴氏灭菌法、灭菌、超高温处理、在细菌不能存活温度下喷雾蒸煮 (*spray cooking*) 和 / 或喷雾干燥。优选通过热处理、超声处理、以杀菌剂例如乙醇处理、施加超高压、高压均浆化和 / 或使用细胞破碎器得到细胞碎片。细菌的完整细胞优选通过物理去除法除去，如过滤或离心如在 3000g 下离心 1h，完整细胞和细胞碎片分别留在片状沉淀中或保留物中以及上清液和 / 或滤出液中。活细胞的灭活和 / 或物理去除应使活细菌的量低于本领域已知的常规平皿培养技术所用的检出限。该检出限为少于 10^3 cfu 活细胞，优选少于 10^2 cfu 活细胞。以每克干重组合物计，所述组合物优选包含少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌活细胞，更优选少于 10^3 cfu 的总活细菌活细胞。以每克干重组合物计，所述组合物更优选包含少于 10^2 cfu 的革兰氏阴性细菌活细胞，更优选少于 10^2 cfu 的总活细菌活细胞。下文指出用于检测灭活的细菌细胞和 / 或细菌细胞碎片的分子技术例如实时 PCR 技术不适用，因为它们不指示活细菌。

[0035] 在一个实施方案中，本发明营养组合物基本上不包含活革兰氏阴性细菌，并且优选也不包含活革兰氏阳性细菌。术语“基本上不包含活细菌”是指活细菌的量低于本领域已知的常规平皿培养技术的检出限。

[0036] 对活细胞灭活的优点在于，在生产后，终营养组合物可被巴氏法灭菌和 / 或灭菌，因此降低有害微生物例如阪崎肠杆菌 (*E. sakazakii*) 污染的机会。这对于剖腹产的婴儿是尤其重要的，这是因为他们由于其肠道定殖推迟而更易感染。因此，本发明使得液态、即用

型配方物可在室温下制备和保存。此外,可以更容易地控制每个婴儿和 / 或幼儿接受的生物活性组分的剂量,因为在液体产品中不会发生进一步生长,在婴儿的肠道中也不会发生生长。后者是取决于个体肠道环境的可变因子,并且从而导致在个体婴儿中有益效果程度的差异。

[0037] 另外的优点是,所述营养组合物可以更容易且低成本地保存,因为不需要采取专门的预防措施以将细菌的活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 / 或在婴儿配方物以水复溶后、食用前的阶段中,也无后酸化发生。与蛋白凝聚的不利效应和不良口味也可以该方式避免。

[0038] 制备革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片或灭活细胞的优选方法在 W001/01785 中、更具体在实施例 1 和 2 中公开,并且在 WO 2004/093899 中、更具体在实施例 1 中公开。类似方法可作必要的修正后使用,以从革兰氏阴性细菌得到灭活的细胞和 / 或细菌细胞碎片。

[0039] 包含革兰氏阴性细菌和任选的革兰氏阳性细菌的灭活细胞或细胞碎片的产品

[0040] 本发明的婴儿和 / 或幼儿营养物优选为发酵组合物。本发明的营养物优选包含乳源产品,所述产品由革兰氏阳性产乳酸细菌、更优选双歧杆菌、乳杆菌和 / 或链球菌、甚至更优选短双歧杆菌、副干酪乳杆菌和 / 或嗜热链球菌发酵而来,其中细胞在发酵后被灭活。在发酵和 / 或产乳酸细菌与乳源产品的其他相互作用时,可形成另外的生物活性化合物,例如同样刺激免疫系统和 / 或刺激肠道微生物菌群定殖的生物活性肽和 / 或寡糖。所述乳源产品优选选自乳、酪素、酪蛋白、酪蛋白水解产物、酪蛋白肽、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解产物、乳清肽和乳糖或其混合物。乳可以是全乳、半脱脂乳和 / 或脱脂乳。乳清可以是甜乳清和 / 或酸乳清。待发酵的所述组合物优选为脱脂乳。

[0041] 发酵的孵育时间优选为至少 2h, 优选为 4 至 48h, 更优选为 6 至 24h, 甚至更优选为 6 至 12h。足够长的时间使发酵和伴随的免疫原性细胞碎片——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——的产生高程度发生,其中孵育时间因为经济的原因不需要过长。

[0042] 优选将乳底物——优选脱脂乳——巴氏法灭菌、冷却并用一种或多种乳杆菌菌株发酵至某一酸度,之后将发酵产物冷却并保存。优选使用一种或多种双歧杆菌种代发酵,以类似的方法制备第二种乳源产品。然后,优选将所述两种发酵产物混合在一起,并与组成婴儿配方物的脂肪组分之外的其他组分混合。优选将所述混合物预热,然后加入脂肪,匀化,巴氏法灭菌并干燥。

[0043] 优选将乳底物——优选乳糖——巴氏法灭菌、冷却并用一种或多种嗜热链球菌菌株发酵,之后将发酵的产物冷却并保存。优选使用脱脂乳和一种或多种双歧杆菌种代发酵,以类似的方法制备第二乳源产品。然后,优选将所述两种发酵产物混合在一起,并与组成婴儿配方物的其他组分混合、巴氏法灭菌并干燥。

[0044] 以每 g 终组合物干重计,所述灭活的细菌或细胞碎片优选获自多于 1×10^2 cfu、特别是至少 1×10^3 cfu 的革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌,更优选革兰氏阴性细菌,更优选多于 1×10^4 cfu, 甚至更优选多于 1×10^6 cfu。以每 g 终组合物干重计,所述灭活的细菌或细胞碎片优选获自少于 1×10^{11} cfu 的革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌,更优选革兰氏阴性细菌,更优选 1×10^{10} cfu, 甚至更优选 1×10^9 cfu。组合物中每 g 干重的 cfu 量可在灭活步骤之前立即测定。或者,灭活的细菌和 / 或细菌细胞碎片的量可通过实时 PCR 技术测定。例

如,灭活的或破碎的细菌总量可使用Nadkarni et al,2002,Microbiology 148 :257-266的通用细菌探针和引物测定。使用对革兰氏阴性细菌群或革兰氏阳性细菌群特异的探针和引物的方法可在作必要修正后应用。

[0045] 非消化性寡糖

[0046] 本发明优选包含非消化性寡糖。所述非消化性寡糖优选刺激有益肠道细菌、特别是产乳酸细菌和/或拟杆菌的生长。非消化性寡糖的存在与灭活的细菌和/细菌细胞碎片通过刺激有益细菌——特别是乳酸细菌和/或拟杆菌——的生长、通过减少有害细菌在肠道中的生长和/或通过直接有利地刺激免疫系统协同地发挥作用。因此,非消化性寡糖与灭活的细菌和/或细菌细胞碎片同时存在有利地引起更快且更高的定殖。所述组合物优选包含至少两种不同的非消化性寡糖。至少两种不同的非消化性寡糖的存在会产生不同细菌种更多样的微生物菌群,例如是阴道分娩的婴儿的情形。至少两种不同的非消化性寡糖与灭活的细菌和/或细菌细胞碎片的存在可有利地产生更快、更高且更多样的定殖。

[0047] 在本发明中使用的术语“寡糖”是指聚合度(DP)为2至250、优选DP为2至100、更优选2至60、甚至更优选2至10的糖。在本发明中使用的术语“非消化性寡糖”是指在肠道中不被存在于人上消化道(小肠和胃)中的酸或消化酶的作用消化、但是优选被人肠道内的菌群发酵的寡糖。例如,蔗糖、乳糖、麦芽糖和麦芽糊精被认为是消化性的。

[0048] 所述非消化性碳水化合物为选自低聚果糖(fructo-oligosaccharides)、低聚半乳糖(galacto-oligosaccharides)、低聚葡萄糖(gluco-oligosaccharides)、低聚阿拉伯糖(arabino-oligosaccharides)、低聚甘露糖(mannan-oligosaccharides)、低聚木糖(xylo-oligosaccharides)、低聚岩藻糖(fuco-oligosaccharides)、低聚阿拉伯半乳糖(arabinogalacto-oligosaccharides)、低聚葡糖甘露糖(glucomanno-oligosaccharides)、低聚半乳甘露糖(galactomanno-oligosaccharides)、含唾液酸(sialic acid)的寡糖和糖醛酸寡糖的至少一种、更优选至少两种。本发明的组合物优选包含低聚果糖、低聚半乳糖和/或半乳糖醛酸寡糖,更优选低聚半乳糖,最优选 β -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 β -低聚半乳糖,低聚葡萄糖类包括龙胆寡糖(gentio-oligosaccharides)、黑曲霉寡糖(nigero-oligosaccharides)、环糊精寡糖(cyclodextrin-oligosaccharides)和聚葡萄糖(polydextrose),低聚阿拉伯半乳糖类包括阿拉伯树胶(gum acacia),低聚半乳甘露糖类包括部分水解的瓜尔胶(guar gum)。

[0049] 本发明的组合物优选包含至少两种平均聚合度(DP)不同的非消化性寡糖。为了进一步改良,本发明的非消化性寡糖优选具有相对高含量的短链寡糖,因为这些寡糖会强烈地刺激双歧杆菌的生长。

[0050] 所述组合物优选包含低聚半乳糖。低聚半乳糖优选选自 β -低聚半乳糖、乳糖-N-四糖(LNT)、乳糖-N-新四糖(neo-LNT)、岩藻糖基乳糖(fucosyl-lactose)、岩藻糖基化LNT(fucosylated LNT)和岩藻糖基化新LNT(fucosylated neo-LNT)。在一个特别优选的实施方案中,本发明的组合物包含 β -低聚半乳糖。本发明使用的 β -低聚半乳糖是指聚合度(DP)为2至20的由以单体亚单元计超过50%、优选超过65%的半乳糖单元组成的寡糖,其中至少50%、更优选至少75%、甚至更优选至少90%的半乳糖单元经 β -糖苷键、优选 β -1,4或 β -1,6糖苷键连接在一起。在人乳寡糖中也主要是 β -键。平均DP优选为3至6。葡萄糖单元可存在于半乳糖单元链的还原端。 β -低聚半乳糖有时也指反式低聚半

乳糖 (TOS)。β-低聚半乳糖的一个合适来源是**Vivinal®GOS** (可市购于荷兰兹沃勒的 Borculo DomoIngredients)。其他合适来源有 Oligomate (Yakult)、Cupoligo (Nissin) 和 Bi2muno (Classado)。已发现 β-低聚半乳糖在刺激乳酸细菌、特别是双歧杆菌的生长中最为有效。

[0051] 所述组合物优选含有低聚果糖。本发明使用的低聚果糖是指由以单体亚单元计超过 50%、优选超过 65% 的果糖单元组成的碳水化合物,其中至少 50%、更优选至少 75%、甚至更优选至少 90% 的果糖单元经 β-糖苷键、优选 β-2,1 糖苷键连接在一起。葡萄糖单元可存在于半乳糖单元链的还原端。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。低聚果糖可包括果聚糖、水解果聚糖、菊糖、水解菊糖和合成低聚果糖。所述组合物优选包含平均聚合度 (DP) 为 3 至 6 的短链低聚果糖,更优选水解菊糖或合成低聚果糖。所述组合物优选包含平均 DP 大于 20 的长链低聚果糖,例如 RaftilinHP。所述组合物优选同时包含短链和长链低聚果糖。适合在所述组合物中使用的低聚果糖还易于市购得到,例如 RaftilineHP 和 RaftiloseP95 (Orafti)。

[0052] 所述组合物更优选包含低聚半乳糖和低聚果糖的结合物,更优选低聚半乳糖和长链低聚果糖的结合物。这类混合物会刺激健康肠道菌群——特别是双歧杆菌和 / 或乳杆菌——的生长,并且减少大肠杆菌在剖腹产婴儿中的出现。所述混合物协同地刺激乳酸细菌,特别是双歧杆菌。

[0053] 本发明的组合物优选包含糖醛酸寡糖,更优选半乳糖醛酸寡糖。在本发明中使用的糖醛酸寡糖这一术语是指这样的一种寡糖,即其中至少 50% 的存在于所述寡糖中的单糖单元是糖醛酸。在本发明中使用的半乳糖醛酸寡糖这一术语是指这样一种寡糖,即其中至少 50% 的存在于所述寡糖中的单糖单元是半乳糖醛酸。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。降解的果胶优选通过对水果和 / 或蔬菜果胶、更优选苹果、柑橘和 / 或甜菜果胶、甚至更优选至少一种裂解酶降解的苹果、柑橘和 / 或甜菜果胶进行水解和 / 或 β 消去反应来制备。在一个优选实施方案中,糖醛酸寡糖的至少一个末端糖醛酸单元具有双键。优选一个末端糖醛酸单元包含一个 C₄-C₅ 双键。所述醛酸寡糖可被衍生化。所述糖醛酸寡糖可被甲氧基化和 / 或酰胺化。所述糖醛酸寡糖的特征优选在于大于 20%、优选大于 50%、甚至优选大于 70% 的甲氧基化度。所述双键会有效地防止致病细菌对肠道上皮细胞的附着,从而降低 (医院) 致病细菌在剖腹产婴儿的结肠中的定殖。此外,糖醛酸寡糖优选会刺激健康肠道菌群的形成并被发酵,导致肠道有机酸的产生和肠道 pH 的下降,这会抑制 (医院) 致病细菌的生长。

[0054] 因此,在一个实施方案中,用于本发明的组合物优选包含至少 β-低聚半乳糖。在一个实施方案中,用于本发明的组合物优选包含至少短链低聚果糖和 / 或长链低聚果糖,优选长链低聚果糖。在一个实施方案中,用于本发明的组合物优选包含至少糖醛酸寡糖。在一个实施方案中,用于本发明的组合物优选包含至少 β-低聚半乳糖,以及至少短链低聚果糖或长链低聚果糖或者两者。在一个实施方案中,用于本发明的组合物优选包含至少 β-低聚半乳糖和至少糖醛酸寡糖。在一个实施方案中,用于本发明的组合物优选包含至少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,用于本发明的组合物优选包含至少 β-低聚半乳糖、短链低聚果糖和糖醛酸寡糖,或者至少 β-低聚半乳糖、长链低聚果糖和糖醛酸寡糖。两种不同非消化性碳水化合物——优选 β-低聚

半乳糖和低聚果糖——的混合物之间的重量比优选在 20 至 0.05 之间,更优选在 20 至 1 之间。 β -低聚半乳糖更类似人乳寡糖。本发明组合物优选包含 DP 为 2-10 的 β -低聚半乳糖和 / 或 DP 为 2-60 的低聚果糖。已发现这种结合物会协同地增加双歧杆菌和乳酸杆菌 (lactobacilli)。这三种非消化性寡糖的存在甚至会进一步刺激双歧杆菌。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 至 2):1:(1 至 20),更优选 (12 至 7):1:(1 至 3)。

[0055] 所述组合物每 100ml 优选包含 80mg 至 3g 非消化性寡糖,更优选 150mg 至 2g,甚至更优选 300mg 至 1.5g。以干重计,所述组合物优选包含 0.05 重量%至 750 重量%、更优选 0.1 重量%至 20 重量%、甚至更优选 0.5 重量%至 10 重量%的非消化性寡糖。较低量的非消化性寡糖在刺激微生物群中的有益细菌时效应较低,而过高量将导致胃气胀和腹部不适的副作用。

[0056] 配方物

[0057] 本发明中使用的组合物是肠道营养组合物,并适合给予剖腹产婴儿。本发明的组合物可经肠给予,更优选口服给予。

[0058] 本发明的组合物优选为婴儿配方物。本发明的组合物可有利地作为婴儿的完全营养物应用。本发明的组合物优选包含脂质、蛋白质和消化性碳水化合物,并优选以液体形式给予。本发明包括干食品(例如粉末),其附有将所述干食品混合物与一种合适液体(例如水)相混合的说明书。

[0059] 本发明有利地提供了一种这样的组合物,其中脂肪提供 5 至 50%的总卡路里,蛋白质提供 5 至 50%的总卡路里,消化性碳水化合物组分提供 15 至 90%的总卡路里。在一个实施方案中,所述组合物包含蛋白质、脂肪和消化性碳水化合物,其中蛋白质提供 5 至 25%的总卡路里,脂肪提供 25 至 60%的总卡路里,消化性碳水化合物组分提供 30 至 70%的总卡路里。优选地,在本发明的组合物中,脂质提供 35 至 50%的总卡路里,蛋白质提供 7.5 至 12.5%的总卡路里,消化性碳水化合物提供 40 至 55%的总卡路里。为计算蛋白质提供的总卡路里%,需要将蛋白质、多肽和氨基酸提供的总能量合计考虑。

[0060] 本发明的组合物优选包含选自动物脂质(人脂质除外)和植物脂质的至少一种脂质。本发明的组合物优选包含植物脂质和选自鱼油、动物油、藻油、真菌油和细菌油的至少一种油的结合物。本发明组合物不包含人乳。

[0061] 在所述营养制品中使用的蛋白质优选选自非人的动物蛋白(例如乳蛋白)、植物蛋白(优选大豆蛋白和 / 或稻蛋白),上述蛋白质的水解产物、游离氨基酸以及蛋白质、水解产物和游离氨基酸的混合物。本发明的组合物优选包含酪蛋白、乳清、水解酪蛋白和 / 或水解乳清蛋白。所述蛋白质优选包含完整蛋白质,更优选完整牛乳清蛋白和 / 或完整牛酪蛋白。由于本发明的组合物适合用于降低婴儿中的变态反应,其蛋白质优选选自水解乳清蛋白。本发明的组合物优选包含水解酪蛋白和 / 或水解乳清蛋白,植物蛋白和 / 或氨基酸。使用这些蛋白质进一步降低了婴儿的变态反应。使用这些水解蛋白质会有利地改善由剖腹产婴儿的不成熟的肠道对饮食蛋白质组分的吸收。

[0062] 本发明的组合物优选包含选自蔗糖、乳糖、葡萄糖、果糖、固态玉米糖浆、淀粉和麦芽糊精的消化性碳水化合物,更优选乳糖。

[0063] 本发明的组合物的粘度优选为 1 至 60mPa. s,优选为 1 至 20mPa. s,更优选为 1 至

10mPa. s, 最优选为 1 至 6mPa. s。低粘度会确保适当地给予所述液体, 例如适当地通过整个奶嘴。同时, 此粘度与人乳的粘度非常相似。此外, 低粘度会引起正常的胃排空和更好的能量摄入, 这对于需要能来实现最佳生长和发育的婴儿来说是必要的。本发明的组合物优选通过将粉末组合物与水混合来制备。婴儿配方物通常用这种方式制备。因此, 本发明还涉及包装的粉末组合物, 其中所述包装与说明书一起提供, 所述说明书指示将所述粉末与合适量的液体相混合, 从而形成粘度为 1 至 60mPa. s 的液体组合物。所述液体的粘度通过在 20°C 和在 95s⁻¹ 剪切速率下使用 Physica Rheo meter MCR 300 (PhysicaMesstechnik GmbH, Ostfilden, Germany) 来测定。

[0064] 大便不规律 (例如便硬 (Hard stools)、大便量不足 (insufficient stool volume)、腹泻) 是剖腹产婴儿中的一个重要问题。这可能是由于粪便中大肠杆菌含量高造成的。已经发现大便问题可通过给予液体食品形式的本发明的非消化性寡糖来减少, 所述制品的重量渗透摩尔浓度 (osmolality) 为 50 至 500mOsm/kg, 更优选 100 至 400mOsm/kg。减少大便不规律会增强健康肠道微生物菌群的定殖和形成。

[0065] 鉴于上述, 同样重要的是, 所述液体食品不具有过多的卡路里密度, 但仍会提供足够的卡路里来供给受试者。因此, 所述液体食物优选具有 0.1 至 2.5kcal/ml 的卡路里密度, 甚至更优选 0.5 至 1.5kcal/ml 的卡路里密度, 最优选 0.6 至 0.8kcal/ml 的卡路里密度。

[0066] 在一个实施方案中, 本发明涉及装有待给予剖腹产婴儿的组合物的小袋, 所述组合物包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片, 其中所述组合物包含每 g 干重少于 10³cfu 的革兰氏阴性细菌, 更优选少于 10³cfu 的细菌。所述小袋优选装有从以每 g 最终组合物干重计多于 1×10²cfu、特别是至少 1×10³ 的革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌、更优选革兰氏阴性细菌得到的灭活细菌或细胞碎片, 更优选多于 1×10⁴cfu, 甚至更优选多于 1×10⁶cfu。所述小袋优选装有从以每 g 最终组合物干重计少于 1×10¹²cfu 的革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌、更优选革兰氏阴性细菌中得到的灭活细菌或细胞碎片, 更优选 1×10¹⁰cfu, 甚至更优选 1×10⁹cfu。所述小袋优选另外装有非消化性寡糖, 更优选选自低聚果糖、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、低聚阿拉伯半乳糖、低聚葡糖甘露糖、低聚半乳甘露糖、含有唾液酸的寡糖和糖醛酸寡糖的至少两种非消化性寡糖。所述小袋优选装有 0.25 至 5g, 更优选 0.5 至 2g 非消化性寡糖。

[0067] 应用

[0068] 本发明在一个实施方案中提供了用于给予剖腹产婴儿的肠道营养组合物。本发明优选提供 (i) 对剖腹产婴儿的病症进行治疗和 / 或预防, 以及 / 或者 (ii) 刺激剖腹产婴儿的健康。所述病症优选选自自由低双歧杆菌和 / 或乳杆菌的微生物菌群引起的肠道病症。所述病症优选选自变态反应、湿疹、哮喘、感染和腹泻。

[0069] 在一方面中, 本发明提供了一种用于治疗选自如下病症的本发明的营养组合物: 变态反应、湿疹、哮喘、感染和腹泻。

[0070] 向剖腹产新生儿提供革兰氏阴性细菌和优选还有革兰氏阳性细菌 (例如灭活的细胞和 / 或细菌细胞外膜碎片例如糖蛋白、糖脂、肽聚糖、脂多糖 (LPS)、脂磷壁酸 (LTA)、鞭毛、脂蛋白、荚膜多糖和 / 或 DNA) 的免疫原性因子会诱导对这些细菌的耐受, 从而增加这些细菌的肠道定殖, 并且 / 或者可降低有害细菌的定殖。这些免疫原性因子对刺激双歧杆菌

生长和 / 或减少有害细菌生长还可能有直接作用。此外,灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细胞碎片的存在还有导致对革兰氏阴性细菌的感染、肠道感染和全身感染的免疫性增强的优点。在肠道中诱导对细菌的耐受会引起有益细菌的快速定殖,而在另一方面所述产品中不存在活细胞会引起安全性的增加和产品工艺性质的改善。在通常被认为不安全的革兰氏阴性细菌的情况下,安全性优点尤其重要。

[0071] 本发明优选提供了一种这样的方法,即该方法用于预防和 / 或治疗感染和 / 或感染病症——特别是胃肠道感染,更优选治疗和 / 或预防由选自葡萄球菌属 (*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 B 族链球菌 (*Streptococcus* group B))、梭菌属 (*Clostridium*) (特别是艰难梭菌 (*C. difficile*))、杆菌属 (*Bacillus*) (特别是枯草杆菌 (*B. subtilis*))、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (特别是铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*))、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、变形菌属 (*Proteus*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*) 和埃希氏菌属 (*Escherichia*) 的一种或多种微生物、优选大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 引起的感染,所述方法包括给予本发明的营养组合物。

[0072] 本发明的组合物优选用于一种治疗和 / 或预防剖腹产婴儿的肠道感染、肠道炎症和 / 或腹泻的方法中。本发明的组合物优选用于一种调节剖腹产婴儿的免疫系统的方法中。在另一方面中,本发明因此提供了一种治疗和 / 或预防剖腹产婴儿的全身感染、尿道感染、耳炎和 / 或呼吸道感染的方法,所述方法包括给予本发明的营养组合物。

[0073] 在另一方面中,本发明提供了一种用于在婴儿、优选剖腹产婴儿中治疗和 / 或预防变态反应 (特别是食物变态反应、更特别是牛乳变态反应)、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、甚至更优选变态反应和 / 或哮喘的方法,所述方法包括向所述婴儿给予一种组合物,所述组合物包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌 (优选为灭活的) 和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片。这些健康效应由对免疫系统和 / 或肠道微生物菌群的作用得到。

[0074] 给予本发明的组合物会引起肠道微生物菌群的改善和随后作为微生物发酵的代谢终产物的有机酸的形成。有机酸的量增加会引起粘液产量增加,增进消化道成熟和 / 或增强消化道屏障。因此,在另一方面中,本发明提供了一种降低剖腹产婴儿肠壁通透性和 / 或增进剖腹产婴儿肠壁成熟的方法,所述方法包括向所述婴儿给予一种组合物,所述组合物包含灭活的革兰氏阴性细菌和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌 (优选为灭活的) 和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片。

[0075] 本发明的组合物优选用于在剖腹产婴儿肠道中诱导对细菌的耐受,和 / 或用于使剖腹产婴儿的肠道微生物菌群定殖向阴道分娩婴儿中存在的微生物菌群方向改善,和 / 或用于使富含产乳酸细菌的微生物菌群在剖腹产婴儿中快速定殖。

[0076] 在一个实施方案中,本发明涉及一种制备适用于剖腹产婴儿的婴儿营养物的方法,包括将人乳和一种组合物混合,所述组合物包含灭活的革兰氏阴性细菌细胞和 / 或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌细胞 (优选为灭活的) 和 / 或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片,其中所述组合物包含每 g 干重少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌,更优选少于 10^3 cfu 的细菌。

[0077] 在一个实施方案中,本发明涉及一种在剖腹产婴儿中诱导对细菌的肠道耐受和/或在剖腹产婴儿中改善肠道微生物菌群的定殖的方法,包括将 i) 可营养用或可药用液体和 ii) 干组合物混合的步骤,其中所述干组合物包含灭活的革兰氏阴性细菌和/或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌(优选为灭活的)和/或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片,并且其中所述组合物包含每 g 干重少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌,优选少于 10^3 cfu 的细菌;以及将在第一步中得到的组合物给予所述婴儿的步骤。

[0078] 换言之,本发明涉及一种通过将 i) 可营养用或可药用液体和 ii) 干组合物混合得到的用于在剖腹产婴儿中诱导对细菌的肠道耐受和/或在剖腹产婴儿中改善肠道微生物菌群的定殖的组合物,其中所述干组合物包含灭活的革兰氏阴性细菌和/或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌(优选为灭活的)和/或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片,其中所述干组合物包含每 g 干重少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌。

[0079] 本发明还可以被表述为,通过将 i) 可营养用或可药用液体和 ii) 干组合物混合得到的组合物用于制备用于在剖腹产婴儿中诱导对细菌的肠道耐受和/或在剖腹产婴儿中改善肠道微生物菌群的定殖的营养组合物的用途,其中所述干组合物包含灭活的革兰氏阴性细菌和/或革兰氏阴性细菌的细菌细胞碎片以及任选的革兰氏阳性细菌(优选为灭活的)和/或革兰氏阳性细菌的细菌细胞碎片,其中所述干组合物包含每 g 干重少于 10^3 cfu 的革兰氏阴性细菌。

[0080] 本发明的组合物优选在出生第一年给予剖腹产婴儿,优选出生后 3 个月内,更优选出生后 6 周内,甚至更优选出生后 2 周内,甚至更优选出生后 1 周内,更优选 72 小时内,最优选出生后 48 小时内。

[0081] 实施例

[0082] 实施例 1:对阴道分娩婴儿和剖腹产婴儿的肠道微生物菌群的分子表征

[0083] 在本研究中,通过使用一种拟杆菌和大肠杆菌的种特异性引物进行 PCR 扩增,研究了分娩方式(剖腹产与阴道分娩)对出生第 3 天时肠道微生物组成的影响。

[0084] 依照 Favier et al, Environ Microbiol 2002 ;68 :219-226 ;Satokari et al, Appl Environ Microbiol 2001 ;67 :504-513 ;Satokari et al System ApplMicrobiol 2003 ;26 :572-584,将微生物 DNA 提取并分析。

[0085] 在 23 名剖腹产新生儿在出生第 3 天和 23 名阴道分娩新生儿在出生第 3 天获得的粪便样本中检测到的细菌种的结果如下:

[0086] 发现 23 名阴道分娩新生儿有 9 名有大肠杆菌 (39.1%),而发现 23 名剖腹产新生儿中仅有 2 名有大肠杆菌 (8.7%)。

[0087] 仅在 8.7% 的阴道分娩新生儿中发现有拟杆菌,而在剖腹产新生儿没有拟杆菌。

[0088] 可以得出结论,剖腹产婴儿的微生物菌群与阴道分娩婴儿的微生物菌群不同在于革兰氏阴性细菌含量低。

[0089] 这些结果表明了本发明的组合物和方法的有利用途。

[0090] 实施例 2:用于剖腹产婴儿的组合物

[0091] 制备了包含 21g/1 蛋白质、24g/1 脂肪、83g/1 碳水化合物、8g/1 非消化性寡糖、5g/1 矿物质和 0.45g/1 维生素的婴儿配方物。

[0092] 于 70°C 将脂肪加入至 UHT 灭菌的乳中,并且将所述混合物在两阶段均化,第一

个阶段以 200kg/cm²，第二个阶段以 50kg/cm²。于 37℃将所述混合物以 1.5%的含有 1 至 5×10⁹ 个细菌 /ml 的短双歧杆菌 1-2219 培养物接种，并在 37℃孵育 8h。然后，将所述混合物冷却至 5℃。将剩余的成分溶于水并加入所得产品中。所述组合物每 100ml 即饮配方物包含 0.72g β-低聚半乳糖和 0.08g 长链和 / 或短链菊糖。

[0093] 加入另外 250ml 热杀死的脆弱拟杆菌。所述热杀死的脆弱拟杆菌通过如下方式得到：在 250ml Varel & Bryant, 1974, Appl Microbiol 18 :251-257 的化学成分确定的培养基中培养脆弱拟杆菌至细胞密度为 7×10⁸ 细菌 /ml 并且随后将所述培养物灭菌。

[0094] 将所得混合物在 140℃ UHT 灭菌 6 至 7 秒并无菌包装。

[0095] 实施例 3 :用于剖腹产婴儿的组合物

[0096] 制备了这样的婴儿配方物，即每 100g 干物质包含：蛋白质 (80%酪蛋白和 20%乳清) 13g ;植物脂肪 25.5g ;乳糖 42.25g ;麦芽糊精 16g ;矿物质 3g ;维生素 0.25g。

[0097] 将植物脂肪加入于 75℃加热的牛乳。将所述混合物在两阶段均化，第一个阶段以 200kg. s/cm²，第二个阶段以 50kg. s/cm²。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℃巴氏法灭菌，通过蒸发浓缩至 48%干物质。将所述浓缩物冷却至 37℃，以 5%的含有 10⁹ 细菌 /ml 短双歧杆菌 1-2219 培养物接种，并在 37℃孵育 8h。

[0098] 加入另外 250ml 热杀死的脆弱拟杆菌。所述热杀死的脆弱拟杆菌通过如下方式得到：在 250ml Varel & Bryant, 1974, Appl Microbiol 18 :251-257 的化学成分确定的培养基中培养脆弱拟杆菌至细胞密度为 7×10⁸ 细菌 /ml 并且随后将所述培养物灭菌。

[0099] 随后再将所述浓缩物巴氏法灭菌。

[0100] 将所述浓缩物喷雾干燥并且每升水加入 140g 得到复溶的婴儿配方乳。加入非消化性寡糖以得到 0.72g β-低聚半乳糖和 0.08g 菊糖 /100ml 即饮配方。所述产品所附的包装和 / 或支持材料指示所述产品可适用于 a) 刺激有益细菌的肠道定殖，b) 预防和 / 或治疗剖腹产婴儿的感染 ;和 / 或 c) 预防和 / 或治疗剖腹产婴儿的变态反应。