



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108882740 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201680082793.3

(22)申请日 2016.12.29

(30)优先权数据

15202856.9 2015.12.29 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/082845 2016.12.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/114900 EN 2017.07.06

(71)申请人 N·V·努特里奇亚

地址 荷兰祖特梅尔

(72)发明人 J·科诺尔 H·鲍里迪尤斯

A·R·奥泽尔 A·J·纳奥塔

(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 侯婧 张晓玲

(51)Int.Cl.

A23L 33/00(2006.01)

A23L 33/135(2006.01)

A23L 33/21(2006.01)

A61K 31/702(2006.01)

A61K 35/744(2006.01)

A61K 35/745(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页

(54)发明名称

含有不可消化寡糖的发酵配方物

(57)摘要

包含不可消化寡糖的发酵配方物协同刺激婴儿的分泌性IgA。

1. 发酵成分和不可消化寡糖在制备营养组合物中的用途,所述营养组合物用于增加0至36月龄的人类受试者的IgA分泌,其中所述发酵成分是一种由产乳酸细菌发酵的组分,并且其中所述营养组合物包含基于营养组合物的干重计总共0.02至1.5重量%的乳酸和乳酸盐,并且包含基于营养组合物的干重计2.5至15重量%的不可消化寡糖。

2. 发酵成分和不可消化寡糖在制备营养组合物中的用途,所述营养组合物用于改善0至36月龄的人类受试者的黏膜免疫防御,其中所述发酵成分是一种由产乳酸细菌发酵的组分,并且其中所述营养组合物包含基于营养组合物的干重计总共0.02至1.5重量%的乳酸和乳酸盐,并且包含基于营养组合物的干重计2.5至15重量%的不可消化寡糖。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述发酵成分是由产乳酸细菌发酵的乳底物,并且所述乳底物包括至少一种选自以下的乳底物:乳、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,或其混合物。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述营养组合物为婴儿配方物、第二阶段配方物或成长乳。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述不可消化寡糖选自低聚果糖、不可消化糊精、低聚半乳糖、低聚木糖、阿拉伯寡糖、阿拉伯半乳寡糖、低聚葡萄糖、低聚龙胆糖、葡甘露寡糖、半乳甘露寡糖、甘露寡糖、低聚异麦芽糖、黑曲霉寡糖、葡甘露寡糖、壳寡糖、大豆低聚糖、糖醛酸寡糖、唾液酸寡糖和低聚岩藻糖,及其混合物。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述不可消化寡糖包括低聚半乳糖和/或低聚果糖。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中总共至少90重量%的乳酸和乳酸盐为L(+)-乳酸和/或L(+)-乳酸盐。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述发酵成分由双歧杆菌属和/或链球菌属发酵。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述营养组合物包含短双歧杆菌和/或嗜热链球菌。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述产乳酸细菌被灭活至低于 10^5 cfu/g营养组合物的干重、更优选低于 10^3 cfu/g营养组合物的干重的水平。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述营养组合物包含蛋白质、可消化碳水化合物和脂质,并且其中提供1.6至4g蛋白质/100kcal营养组合物,提供5至20g可消化碳水化合物/100kcal营养组合物,并且提供3至7g脂质/100kcal营养组合物。

12. 一种增加0至36月龄的人类受试者的IgA分泌的方法,其包括给予人类受试者一种包含发酵成分和不可消化寡糖的营养组合物,所述营养组合物包含基于营养组合物的干重计总共0.02至1.5重量%的乳酸和乳酸盐,并且包含基于营养组合物的干重计2.5至15重量%的不可消化寡糖,并且其中所述发酵成分是一种由产乳酸细菌发酵的组分。

13. 一种改善0至36月龄的人类受试者的黏膜免疫防御的方法,其包括给予人类受试者一种包含发酵成分和不可消化寡糖的营养组合物,所述营养组合物包含基于营养组合物的干重计总共0.02至1.5重量%的乳酸和乳酸盐,并且包含基于营养组合物的干重计2.5至15重量%的不可消化寡糖,并且其中所述发酵成分是一种由产乳酸细菌发酵的组分。

14. 根据权利要求12或13所述的方法,其中所述发酵成分是由产乳酸细菌发酵的乳底

物,并且所述乳底物包括至少一种选自以下的乳底物:乳、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,或其混合物。

含有不可消化寡糖的发酵配方物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于改善免疫系统的婴幼儿营养领域。

背景技术

[0002] 人们普遍认为新生儿的最佳营养是人乳。当母亲无法母乳喂养其婴儿或选择不进行母乳喂养时,基于成熟人乳组成的婴儿配方物(IF)被认为是最佳的替代物。提高婴儿配方物的质量的研究不一定是为了模拟人乳的精确组成,而是为了实现超出在母乳喂养的婴儿中仅观察到营养方面的功能效果。

[0003] 人乳富含分泌型IgA(sIgA),其作为第一道防线以保护婴儿的肠道屏障免受肠道毒素和病原微生物的侵害。sIgA对消化酶具有抗性,并且通过阻断抗原和病原微生物进入上皮细胞受体、将它们截留在粘液中、以及通过蠕动和黏膜纤毛的活动促进它们的去除,从而促进它们从肠道中清除。此外,sIgA在黏膜免疫防御系统和肠内稳态中发挥作用,不会激发且甚至改善炎症反应。相比之下,基于牛乳成分的标准婴儿配方物具有低得多的sIgA浓度,并且与母乳喂养的婴儿相比,用标准婴儿配方物喂养的婴儿具有降低的sIgA水平。

[0004] EP 2 318 046公开了益生菌与分泌型IgA的组合用于治疗或预防炎症。EP 2 315 595公开了活的益生菌用于增加剖腹产(C section)婴儿的免疫球蛋白分泌的用途。然而,该文献没有公开发酵成分和乳酸。WO 2014/201037公开了益生菌、益生元、合生元和抗生素用于治疗与抗生素治疗和免疫病症相关的哺乳动物的微生物群变化的用途。Fukushima等人(1998,Int J Food Microbiol 42:39-44)研究了益生菌双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)菌株对一群较大儿童的IgA分泌的影响,并且发现总的IgA和抗脊髓灰质炎病毒的IgA的水平增加。益生菌是活的产乳酸细菌,如活的乳酸杆菌或活的双歧杆菌。通常,含有益生菌的婴儿配方物作为含有干燥的益生菌细胞的粉末销售,其中由于不利于发酵的环境,例如太低的水活度,因此不可能进行发酵,并且不会产生乳酸。

[0005] 不可消化寡糖也通过它们对微生物群组成的影响而影响肠道sIgA应答。Scholtens等人(2008,J Nutr 138:1141-1147)以及Bakker-Zierikzee等人(2006,Pediatr Allergy Immunol 17:134-140)发现喂食补充有scGOS/lcFOS的配方物的健康婴儿的粪便sIgA水平高于喂食标准配方物的婴儿的粪便sIgA水平,从而支持这一假说。

[0006] Mullié等人(2004,Ped Res 56:791-795)公开了在健康的新生儿中,发酵配方物的消耗与给予疫苗后产生的对脊髓灰质炎病毒具有特异性的肠道sIgA抗体的增加有关,但对总的IgA滴度没有影响。

[0007] WO 2009/151330公开了一种用于剖腹产婴儿的通过产乳酸细菌和不可消化寡糖的发酵而获得的组合物。目的是诱导耐受性,从而有助于随后的活细菌定植。没有提到IgA分泌。WO 2009/151331公开了一种免疫刺激组合物,其包含不可消化寡糖和在用双歧杆菌温育后获得的产物。通过刺激全身免疫系统的Th1应答并降低全身免疫系统的Th2应答,接种反应增加并且过敏减少。WO 2009/151329公开了一种组合物,其包含不可消化寡糖和通过用双歧杆菌温育而获得的产物,用于减少细菌移位并改善肠道屏障功能。其目的是以这

种方式预防全身感染。该文件没有提及对黏膜免疫防御和IgA分泌的任何影响。

发明内容

[0008] 在健康足月婴儿的临床试验中,发现当与给予不含不可消化寡糖的非发酵对照配方物、不含不可消化寡糖的发酵配方物或含有不可消化寡糖的非发酵配方物相比时,观察到给予含有不可消化寡糖的发酵婴儿配方物使肠道分泌型IgA (sIgA) 大量增加。sIgA的分泌协同增加并且与母乳喂养的参照组中的sIgA更相似。这进一步表明黏膜免疫防御系统的协同增强。

[0009] 出人意料地,协同效应不能解释为发酵组合物中不可消化寡糖和产乳酸细菌之间的直接相互作用,原因在于细菌被灭活;也不能解释为增加的肠道微生物活性,原因在于与肠道pH没有明显的相关性。

具体实施方式

[0010] 因此,本发明涉及一种增加0至36月龄的人类受试者的IgA分泌的方法,其包括给予人类受试者包含发酵成分和不可消化寡糖的营养组合物,所述营养组合物包含基于营养组合物的干重计总共0.02至1.5重量%的乳酸和乳酸盐,并且包含基于营养组合物的干重计2.5至15重量%的不可消化寡糖。

[0011] 在一个实施方案中,本发明的用于增加0至36月龄的人类受试者的IgA分泌的方法是非治疗性方法。

[0012] 本发明还可表述为发酵成分和不可消化寡糖在制备用于增加0至36月龄的人类受试者的IgA分泌的营养组合物中的用途,其中所述营养组合物包含基于营养组合物的干重计总共0.02至1.5重量%的乳酸和乳酸盐,并且包含基于营养组合物的干重计2.5至15重量%的不可消化寡糖。

[0013] 本发明还可表述为一种包含发酵成分和不可消化寡糖的营养组合物,其中所述营养组合物包含基于营养组合物的干重计总共0.02至1.5重量%的乳酸和乳酸盐,并且包含基于营养组合物的干重计2.5至15重量%的不可消化寡糖,其用于增加0至36月龄的人类受试者的IgA分泌。

[0014] 另一方面,本发明涉及一种改善0至36月龄的人类受试者的黏膜免疫防御的方法,其包括给予人类受试者包含发酵成分和不可消化寡糖的营养组合物,所述营养组合物包含基于营养组合物的干重计总共0.02至1.5重量%的乳酸和乳酸盐,并且包含基于营养组合物的干重计2.5至15重量%的不可消化寡糖。

[0015] 在一个实施方案中,本发明的用于改善0至36月龄的人类受试者的黏膜免疫防御的方法是非治疗性方法。

[0016] 本发明还可表述为发酵成分和不可消化寡糖在制备用于改善0至36月龄的人类受试者的黏膜免疫防御的营养组合物中的用途,其中所述营养组合物包含基于营养组合物的干重计总共0.02至1.5重量%的乳酸和乳酸盐,并且包含基于营养组合物的干重计2.5至15重量%的不可消化寡糖。

[0017] 本发明还可表述为一种包含发酵成分和不可消化寡糖的营养组合物,其中所述营养组合物包含基于营养组合物的干重计总共0.02至1.5重量%的乳酸和乳酸盐,并且包含

基于营养组合物的干重计2.5至15重量%的不可消化寡糖,其用于改善0至36月龄的人类受试者的黏膜免疫防御。

[0018] 发酵成分

[0019] 本发明的方法或用途中的营养组合物(下文也称为本发明的营养组合物)包含发酵成分。发酵成分是由产乳酸细菌发酵的组分。优选在营养组合物的制备过程中进行发酵。优选地,由于发酵后的热灭活或通过其他方式灭活,营养组合物在最终产品中不含显著量的活细菌。优选地,发酵成分是乳衍生产品,其为由产乳酸细菌发酵的乳底物,并且所述乳底物包括至少一种选自以下的乳底物:乳、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,或其混合物。合适地,包含发酵成分和不可消化寡糖的营养组合物及其制备方法记载于WO 2009/151330、WO 2009/151331和WO 2013/187764中。

[0020] 发酵成分优选包含细菌细胞碎片,如糖蛋白、糖脂、肽聚糖、脂磷壁酸(LTA)、脂蛋白、核苷酸和/或荚膜多糖。有利的是将包含灭活细菌和/或细胞碎片的发酵成分直接用作最终营养产品的一部分,因为这将导致更高浓度的细菌细胞碎片。当使用商业制剂时,通常洗涤这些制剂,并将材料与包含细菌细胞碎片的水性生长培养基分离,从而减少或消除细菌细胞碎片的存在。此外,在产乳酸细菌与乳底物的发酵和/或其他相互作用时,形成另外的生物活性化合物,例如生物活性肽和/或寡糖,其同样刺激黏膜免疫防御系统。因此,与非发酵的乳衍生产品相比,发酵成分、特别是发酵的乳衍生产品被认为具有改善的效果。

[0021] 优选地,营养组合物包含基于干重计5至97.5重量%、更优选10至95重量%、更优选20至90重量%、甚至更优选25至60重量%的发酵成分。作为表示发酵程度的方式,可以采用营养组合物中乳酸和乳酸盐的总水平,因为这是产乳酸细菌在发酵时产生的代谢终产物。本发明的营养组合物包含基于组合物的干重计总共0.02至1.5重量%、更优选0.05至1.0重量%、甚至更优选0.05至0.5重量%的乳酸和乳酸盐。优选地,总共至少50重量%、甚至更优选至少90重量%的乳酸和乳酸盐呈L(+)-异构体的形式。因此,在一个实施方案中,L(+)-乳酸和L(+)-乳酸盐的总和大于50重量%、更优选大于90重量%,基于乳酸和乳酸盐的总和计。在本文中,L(+)-乳酸盐和L(+)-乳酸也称为L-乳酸盐和L-乳酸。

[0022] 用于制备发酵成分的产乳酸细菌

[0023] 用于制备发酵成分、特别是用于发酵乳底物的产乳酸细菌优选以单一培养物或混合培养物的形式提供。产乳酸细菌由以下属组成:双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、乳杆菌属(*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*)和魏斯氏菌属(*Weissella*)。优选地,用于发酵的产乳酸细菌包括双歧杆菌属和/或链球菌属的细菌。

[0024] 优选地,链球菌是嗜热链球菌(*S. thermophilus*)菌株。优选地,链球菌在底物发酵过程中产生 β -半乳糖苷酶活性。合适的嗜热链球菌菌株的选择记载于EP 778885的实施例2和FR 2723960的实施例1中。在本发明的另一个优选的实施方案中,营养组合物包含 10^2 - 10^5 cfu嗜热链球菌活细菌/g营养组合物的干重,优选营养组合物包含 10^2 - 10^4 嗜热链球菌活细菌/g干重。

[0025] 就本发明的目的而言,用于制备发酵成分的优选的嗜热链球菌菌株已被

Compagnie Gervais Danone保藏在由Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, Paris, France运营的Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)处, 于1995年8月23日保藏的登记号为I-1620且于1994年8月25日保藏的登记号为I-1470。

[0026] 双歧杆菌为革兰氏阳性厌氧杆状细菌。就本发明的目的而言, 当与相应的双歧杆菌菌种的模式菌株相比时, 用于制备发酵成分的优选双歧杆菌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, 如在关于该主题的手册例如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还由Scardovi, V. 记载于*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者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*)、链状双歧杆菌 (*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*)、假小链双歧杆菌 (*B. pseudocatenulatum*)、嗜酸嗜热双歧杆菌 (*B. thermacidophilum*) 和长双歧杆菌 (*B. longum*), 更优选短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、两歧双歧杆菌、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, 更优选选自以下的短双歧杆菌: 短双歧杆菌 Bb-03 (Rhodia/Danisco)、短双歧杆菌 M-16V (Morinaga)、短双歧杆菌 R0070 (Institute Rosell, Lallemand)、短双歧杆菌 BR03 (Probiotal)、短双歧杆菌 BR92 (Cell Biotech) DSM 20091、LMG 11613 和保藏在法国巴黎 CNCM 的短双歧杆菌 I-2219。最优选地, 短双歧杆菌为短双歧杆菌 M-16V (Morinaga) 或短双歧杆菌 I-2219, 甚至更优选短双歧杆菌 I-2219。

[0027] 最优选地, 营养组合物包含由乳酸菌发酵的发酵成分, 所述乳酸菌包括短双歧杆菌和嗜热链球菌 (*S. thermophilus*) 两者。在一个实施方案中, 乳酸菌发酵是通过嗜热链球菌和短双歧杆菌的发酵。在一个实施方案中, 营养组合物包含发酵成分, 其中乳酸菌在发酵后被灭活。

[0028] 优选地, 发酵成分不通过保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) 发酵。保加利亚乳杆菌发酵的产品被认为不适合婴儿, 因为在幼小婴儿中, 将D-乳酸盐转化为丙酮酸盐的特异性脱氢酶的活性远低于转化L-乳酸盐的脱氢酶。

[0029] 优选地, 本发明的营养组合物包含灭活的产乳酸细菌和/或源自产乳酸细菌的细菌碎片, 其获自基于每g最终组合物的干重计大于 1×10^4 cfu 的产乳酸细菌, 更优选 1×10^5 cfu, 甚至更优选 1×10^6 cfu。优选地, 灭活细菌或细菌碎片获自基于每g最终组合物的干重计小于 1×10^{14} cfu 的产乳酸细菌, 更优选 1×10^{13} cfu, 甚至更优选 1×10^{12} cfu。

[0030] 发酵方法

[0031] 待发酵的乳底物适合存在于水性培养基中。待发酵的乳底物优选选自乳、乳清、乳清蛋白、乳清蛋白水解物、酪蛋白、酪蛋白水解物和乳糖及其混合物。乳可为全脂乳、半脱脂乳和/或脱脂乳。优选地, 待发酵的乳底物包括脱脂乳。乳清可为甜乳清和/或酸乳清。优选地, 乳清以3至80g干重/L含有乳底物的水性培养基的浓度存在, 更优选40至60g/L。优选地,

乳清蛋白水解物以2至80g干重/L含有乳底物的水性培养基存在,更优选5至15g/L。优选地,乳糖以5至50g干重/L水性底物存在,更优选1至30g/L。优选地,含有乳底物的水性培养基包含缓冲盐,以将pH保持在所需范围内。优选使用磷酸二氢钠或磷酸二氢钾作为缓冲盐,优选以0.5至5g/L、更优选1.5至3g/L使用。优选地,含有乳底物的水性培养基包含半胱氨酸,其量为0.1至0.5g/L水性底物,更优选0.2至0.4g/L。半胱氨酸的存在导致底物具有低的氧化还原电位,这有利于产乳酸细菌、特别是双歧杆菌的活性。优选地,含有乳底物的水性培养基包含酵母提取物,其量为0.5至5g/L含有乳底物的水性培养基,更优选1.5至3g/L。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。酵母提取物的存在将增强产乳酸细菌的发酵。

[0032] 合适地,在发酵步骤之前对乳底物、特别是含有乳底物的水性培养基进行巴氏灭菌,以消除不需要的活细菌的存在。合适地,在发酵后对产物进行巴氏灭菌,以使酶失活。合适地,酶失活在75℃下进行3分钟。合适地,含有乳底物的水性培养基在发酵前均质化和/或乳衍生产品在发酵后均质化。均质化导致更稳定的底物和/或发酵产物,尤其是在脂肪的存在下。

[0033] 接种密度优选为 1×10^2 至 5×10^{10} 、优选 1×10^4 至 5×10^9 cfu产乳酸细菌/ml含有乳底物的水性培养基,更优选为 1×10^7 至 1×10^9 cfu产乳酸细菌/ml含有乳底物的水性培养基。发酵后的最终细菌密度优选为 1×10^3 至 1×10^{10} 、更优选 1×10^4 至 1×10^9 cfu/ml含有乳底物的水性培养基。

[0034] 发酵优选在约20℃至50℃、更优选30℃至45℃、甚至更优选约37℃至42℃的温度下进行。产乳酸细菌、更特别是乳酸杆菌和/或双歧杆菌的生长和/或活性的最佳温度为37℃至42℃。

[0035] 温育优选在4至8、更优选6至7.5的pH下进行。所述pH不会引起蛋白质沉淀和/或不好的味道,同时产乳酸细菌如乳酸杆菌和/或双歧杆菌能够使乳底物发酵。

[0036] 温育时间优选为10分钟至48小时,优选2小时至24小时,更优选4小时至12小时。足够长的时间使得能够在很大程度上进行发酵并同时产生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,然而出于经济原因,温育时间不需要太长。

[0037] 优选地,将乳底物、优选脱脂乳进行巴氏灭菌,冷却,并利用一种或多种产乳酸菌株、优选嗜热链球菌菌株发酵至一定程度的酸度,在所述酸度下冷却发酵产物并储存。优选地,以类似方式使用一种或多种用于发酵的双歧杆菌菌种制备第二乳衍生产品。随后,优选将两种发酵产物混合在一起并与构成婴儿配方物的除脂肪组分之外的其他组分混合。优选地,将混合物预热,然后在生产线上(in-line)加入脂肪,均质化,巴氏灭菌并干燥。

[0038] 制备适用于本发明目的的发酵成分的方法本身是已知的。EP 778885——通过引用的方式纳入本文——在实施例7中具体公开了一种制备发酵成分的合适方法。FR 2723960——通过引用的方式纳入本文——在实施例6中具体公开了一种制备发酵成分的合适方法。简而言之,将包含乳糖和任选的其他常量营养素(如脂肪(优选植物脂肪)、酪蛋白、乳清蛋白、维生素和/或矿物质等)的乳底物、优选巴氏灭菌的乳底物浓缩至例如15至50%的干物质,然后用嗜热链球菌接种,例如用含有 10^6 至 10^{10} 个细菌/ml的5%培养物接种。优选地,所述乳底物包含乳蛋白肽。发酵的温度和持续时间如上所述。合适地,在发酵之后,

可对发酵成分进行巴氏灭菌或杀菌,并且例如进行喷雾干燥或冻干,以提供一种适于在最终产品中进行配制的形式。

[0039] 制备本发明的发酵成分的优选方法公开于W0 01/01785中,更具体地公开于实施例1和2中。制备本发明的发酵产物的优选方法记载于W0 2004/093899中,更具体地记载于实施例1中。

[0040] 灭活和/或物理除去活细胞的方法

[0041] 在发酵成分中产乳酸细菌的活细胞在发酵后优选通过例如灭活和/或物理去除被除去。优选使细胞灭活。优选地,在乳底物发酵之后将产乳酸细菌热灭活。优选的热灭活方法是(闪蒸)巴氏灭菌、杀菌、超高温处理、高温/短时热处理和/或在细菌不能存活温度下喷雾干燥。细胞碎片优选通过热处理获得。通过所述热处理使得优选至少90%、更优选至少95%、甚至更优选至少99%的活的微生物灭活。优选地,发酵的营养组合物包含小于 1×10^5 菌落形成单位(cfu)的活乳酸菌/g干重。热处理优选在70至180°C、优选80至150°C的温度下进行优选约3分钟至2小时,优选在80至140°C的温度下进行5分钟至40分钟。乳酸菌的灭活有利地导致较少的后酸化和更安全的产品。当将营养组合物给予婴儿或幼儿时,这是特别有利的。合适地,在发酵之后,可对发酵成分进行巴氏灭菌或杀菌,并且例如进行喷雾干燥或冻干,以提供一种适于在最终产品中进行配制的形式。

[0042] 不可消化寡糖

[0043] 本发明的营养组合物包含不可消化寡糖,并且优选包含至少两种不同的不可消化寡糖,特别是两种不同来源的不可消化寡糖。不可消化寡糖的存在刺激sIgA的分泌。不可消化寡糖的存在刺激黏膜免疫防御系统。因此,同时存在不可消化寡糖和发酵成分、特别是通过用产乳酸细菌发酵获得的乳衍生产品协同且有利地导致肠道中更高的IgA分泌。因此,同时存在不可消化寡糖和发酵成分、特别是通过用产乳酸细菌发酵获得的乳衍生产品协同且有利地导致增加的黏膜免疫防御。

[0044] 本文所用的术语“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的糖类。如果本发明的营养组合物包含DP为2至100的寡糖,则这导致可含有DP为2至5、DP为50至70和DP为7至60的寡糖的组合物。本发明中使用的术语“不可消化寡糖”是指不通过存在于人上消化道(如小肠和胃)中的酸或消化酶的作用而在肠道中被消化,但优选通过人肠道微生物群发酵的寡糖。例如,蔗糖、乳糖、麦芽糖和麦芽糖糊精被认为是可消化的。

[0045] 优选地,本发明的不可消化寡糖是可溶的。当提及多糖、纤维或寡糖时,本文所用的术语“可溶的”意指根据L.Prosky et al., J.Assoc.Off.Anal.Chem.71,1017-1023 (1988)记载的方法,所述物质至少是可溶的。

[0046] 在本发明的方法或用途中,本发明的营养组合物中包含的不可消化寡糖优选包括不可消化寡糖的混合物。不可消化寡糖优选选自低聚果糖,例如菊粉;不可消化糊精;低聚半乳糖,例如反式低聚半乳糖;低聚木糖、阿拉伯寡糖(arabino-oligosaccharide)、阿拉伯低聚半乳糖(arabinogalacto-oligosaccharide)、低聚葡萄糖(gluco-oligosaccharide)、低聚龙胆糖(gentio-oligosaccharide)、葡甘露寡糖(glucomanno-oligosaccharide)、半乳甘露寡糖(galactomannooligosaccharide)、甘露寡糖、低聚异麦芽糖、黑曲霉寡糖(nigero-oligosaccharide)、葡甘露寡糖(glucomanno-oligosaccharide)、壳寡糖(chito-

oligosaccharide)、大豆低聚糖(soy oligosaccharide)、糖醛酸寡糖(uronic acid oligosaccharide);唾液酸寡糖(sialyloligosaccharide),例如3-唾液酸乳糖(3-SL)、6-唾液酸乳糖(6-SL)、唾液酸乳糖四糖a、b、c(LST)、二唾液酸乳糖N四糖(DSLNT)、唾液酸乳糖N六糖(sialyl-lactoHexaose)(S-LNH)、DS-LNH;以及低聚岩藻糖,例如(未)硫酸化的岩藻多糖寡糖(fucoidan oligosaccharide),2'-岩藻糖基乳糖(2'-FL),3-岩藻糖基乳糖(3-FL),二岩藻糖基乳糖,乳糖-N-岩藻戊糖(lacto-N-fucopenatose)(LNFP) I、II、III、V,乳糖-N-新岩藻戊糖(Lacto-N-neofucopenatose)(LNnFP),乳糖-N-二岩藻糖基-六糖(Lacto-N-difucosyl-hexaose)(LNDH)及其混合物,甚至更优选选自低聚果糖,如菊粉;低聚半乳糖,如反式低聚半乳糖;和岩藻寡糖及其混合物,甚至更优选反式低聚半乳糖和/或菊粉,最优选反式低聚半乳糖。在本发明的组合物或方法的一个实施方案中,不可消化寡糖选自反式低聚半乳糖、低聚果糖及其混合物。

[0047] 不可消化寡糖优选选自 β -低聚半乳糖、 α -低聚半乳糖和半乳糖(galactan)。根据更优选的实施方案,不可消化寡糖为 β -低聚半乳糖。优选地,不可消化寡糖包括具有 β (1,4)、 β (1,3)和/或 β (1,6)糖苷键和末端葡萄糖的低聚半乳糖。反式低聚半乳糖例如可以商品名 **Vivinal®GOS**(Domo FrieslandCampina Ingredients)、Bi2muno(Clasado)、Cup-oligo(Nissin Sugar)和Oligomate55(Yakult)获得。这些寡糖在更大程度上增加sIgA水平并增强黏膜免疫防御活性。

[0048] 不可消化寡糖优选包括低聚果糖。在其他情况下,低聚果糖可以具有例如果聚糖(fructopolysaccharide)、低聚果糖(oligofructose)、多聚果糖(polyfructose)、聚果聚糖(polyfructan)、菊粉、果聚糖(levan)和果聚糖(fructan)的名称,并且可指包含 β -连接的果糖单元的寡糖,其优选通过 β (2,1)和/或 β (2,6)糖苷键连接且优选的DP为2至200。优选地,低聚果糖含有末端 β (2,1)糖苷键连接的葡萄糖。优选地,低聚果糖含有至少7个 β -连接的果糖单元。在另一个优选的实施方案中,使用菊粉。菊粉是一种低聚果糖,其中至少75%的糖苷键为 β (2,1)键。通常,菊粉的平均链长为8至60个单糖单元。适用于本发明的组合物的低聚果糖可以商品名 **Raftiline®HP**(Orafti)商购获得。其他合适的来源为Raftilose(Orafti)、Fibrulose和Fibruline(Cosucra)以及Frutafit和Frutalose(Sensus)。

[0049] 优选地,本发明的营养组合物包含低聚半乳糖和低聚果糖的混合物。优选地,低聚半乳糖和低聚果糖的混合物以1/99至99/1、更优选1/19至19/1、更优选1/1至19/1、更优选2/1至15/1、更优选为5/1至12/1、甚至更优选8/1至10/1、甚至更优选约9/1的重量比存在。当低聚半乳糖具有低的平均DP并且低聚果糖具有相对高的DP时,该重量比是特别有利的。最优选的是平均DP低于10、优选低于6的低聚半乳糖和平均DP高于7、优选高于11、甚至更优选高于20的低聚果糖的混合物。这种混合物协同增加sIgA水平并增强黏膜免疫防御活性。

[0050] 优选地,本发明的营养组合物包含短链低聚果糖和长链低聚果糖的混合物。优选地,短链低聚果糖和长链低聚果糖的混合物以1/99至99/1、更优选1/19至19/1、甚至更优选1/10至19/1、更优选1/5至15/1、更优选1/1至10/1的重量比存在。优选的是平均DP低于10、优选低于6的短链低聚果糖和平均DP高于7、优选高于11、甚至更优选高于20的低聚果糖的混合物。

[0051] 本发明的营养组合物包含总共2.5至20重量%、更优选2.5至15重量%、甚至更优选3.0至10重量%、最优选5.0至7.5重量%的不可消化寡糖,基于营养组合物的干重计。基

于100ml计,本发明的营养组合物优选包含总共0.35至2.5重量%、更优选0.35至2.0重量%、甚至更优选0.4至1.5重量%的不可消化寡糖,基于100ml营养组合物计。较低量的不可消化寡糖在刺激sIgA形成或黏膜免疫防御方面效果较差,而过高的量则会导致腹胀和腹部不适的副作用。

[0052] 营养组合物

[0053] 根据本发明使用的营养组合物还可被认为是药物组合物,优选适合于向婴儿给药。本发明的营养组合物优选肠内给药,更优选口服给药。

[0054] 本发明的营养组合物优选为婴儿配方物、第二阶段配方物(follow on formula)或成长乳(growing up milk)。本发明的营养组合物可有利地用作婴儿的完全营养物。优选地,本发明的营养组合物为婴儿配方物。婴儿配方物定义为用于婴儿的配方物,并且例如可为用于0至6或0至4月龄婴儿的起始配方物。第二阶段配方物用于4或6月龄至12月龄的婴儿。成长乳用于12至36月龄的儿童。本发明的组合物优选包含脂质组分、蛋白质组分和碳水化合物组分,并且优选以液体形式给予。本发明的营养组合物还可为干食品的形式,优选为粉末形式,其附有将所述干食品(优选粉末)与合适的液体(优选水)进行混合的说明。根据本发明使用的营养组合物优选包含其他成分,例如维生素、矿物质、微量元素和其他微量营养素,以使其成为完全营养组合物。根据国际指令,优选婴儿配方物包含维生素、矿物质、微量元素和其他微量营养素。

[0055] 本发明的营养组合物优选包含脂质、蛋白质和可消化碳水化合物,其中脂质提供总卡路里的5至50%,蛋白质提供总卡路里的5至50%,并且可消化碳水化合物提供总卡路里的15至90%。优选地,在本发明的营养组合物中,脂质提供总卡路里的35至50%,蛋白质提供总卡路里的7.5至12.5%,并且可消化碳水化合物提供总卡路里的40至55%。为了计算蛋白质占总卡路里的百分比,需要考虑由蛋白质、肽和氨基酸提供的总能量。优选地,提供3至7g脂质/100kcal营养组合物,优选4至6g/100kcal营养组合物;提供1.6至4g蛋白质/100kcal营养组合物,优选1.75至2.5g/100kcal营养组合物,并且提供5至20g可消化碳水化合物/100kcal营养组合物,优选8至15g/100kcal营养组合物。优选地,本发明的营养组合物包含4至6g的脂质/100kcal,1.6至1.9g蛋白质/100kcal、更优选1.75至1.85g蛋白质/100kcal,和8至15g可消化碳水化合物/100kcal营养组合物。在一个实施方案中,每100kcal营养组合物提供3至7g脂质,优选每100kcal营养组合物提供4至6g脂质;每100kcal营养组合物提供1.6至2.1g蛋白质,优选每100kcal营养组合物提供1.6至2.0g蛋白质;并且每100kcal营养组合物提供5至20g可消化碳水化合物,优选每100kcal营养组合物提供8至15g可消化碳水化合物,并且其中优选地可消化碳水化合物组分包含至少60重量%的乳糖,基于总的可消化碳水化合物计,更优选至少75重量%、甚至更优选至少90重量%的乳糖,基于总的可消化碳水化合物计。卡路里的总量由来自蛋白质、脂质、可消化碳水化合物和不可消化寡糖的卡路里的总和确定。

[0056] 本发明的营养组合物优选包含可消化碳水化合物组分。优选的可消化碳水化合物组分为乳糖、葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖、麦芽糖、淀粉和麦芽糖糊精。乳糖是人乳中存在的主要的可消化碳水化合物。本发明的营养组合物优选包含乳糖。由于本发明的营养组合物包含通过产乳酸细菌发酵获得的发酵成分,因此乳糖的量相对于其来源由于发酵而减少,通过发酵乳糖转化为乳酸盐和/或乳酸。因此,在本发明的营养组合物的制备中,优选加入

乳糖。优选地,本发明的营养组合物不包含除乳糖之外的大量碳水化合物。与可消化碳水化合物如麦芽糖糊精、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖和具有高血糖指数的其他可消化碳水化合物相比,乳糖具有较低的血糖指数,因此是优选的。本发明的营养组合物优选包含可消化碳水化合物,其中至少35重量%、更优选至少50重量%、更优选至少60重量%、更优选至少75重量%、甚至更优选至少90重量%、最优选至少95重量%的可消化碳水化合物为乳糖。基于干重计,本发明的营养组合物优选包含至少25重量%的乳糖,优选至少40重量%、更优选至少50重量%的乳糖。

[0057] 本发明的营养组合物优选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,本发明的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(fungal oil)和细菌油(bacterial oil)的油的组合。本发明的营养组合物优选提供3至7g脂质/100kcal营养组合物,优选提供4至6g脂质/100kcal营养组合物。当呈液体形式例如作为即食液体时,营养组合物优选包含2.1至6.5g脂质/100ml,更优选3.0至4.0g/100ml。基于干重计,本发明的营养组合物优选包含12.5至40重量%、更优选19至30重量%的脂质。优选地,脂质包含必需脂肪酸 α -亚麻酸(ALA)、亚油酸(LA)和/或长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)。LC-PUFA、LA和/或ALA可作为游离脂肪酸,以甘油三酯形式、甘油二酯形式、单甘油酯形式、磷脂形式或作为上述的一种或多种的混合物提供。优选地,本发明的营养组合物包含至少一种、优选至少两种选自以下的脂质来源:菜籽油(例如菜油(colza oil)、低芥酸菜籽油和芥花油)、高油酸葵花籽油,高油酸红花油、橄榄油、海产油(marine oil)、微生物油、椰子油、棕榈仁油和乳脂。本发明的营养组合物不是人乳。

[0058] 本发明的营养组合物优选包含蛋白质。营养组合物中使用的蛋白质优选选自非人动物蛋白质,优选乳蛋白;植物蛋白,例如优选大豆蛋白和/或大米蛋白;及其混合物。本发明的营养组合物优选含有酪蛋白和/或乳清蛋白,更优选牛乳清蛋白和/或牛酪蛋白。因此,在一个实施方案中,本发明的营养组合物中的蛋白质包含选自乳清蛋白和酪蛋白的蛋白质,优选乳清蛋白和酪蛋白,优选地乳清蛋白和/或酪蛋白来自牛乳。优选地,蛋白质包含小于5重量%的游离氨基酸、二肽、三肽或水解蛋白质,基于总蛋白质计。本发明的营养组合物优选包含酪蛋白和乳清蛋白,酪蛋白:乳清蛋白的重量比为10:90至90:10,更优选20:80至80:20,甚至更优选35:65至55:45。

[0059] 根据凯氏定氮法,通过测量总氮并在酪蛋白的情况下使用6.38的转换因子或者对于除酪蛋白之外的其他蛋白质使用6.25的转换因子,基于本发明的营养组合物的干重计,计算蛋白质的重量%。本发明中使用的术语“蛋白质”或“蛋白质组分”是指蛋白质、肽和游离氨基酸的总和。

[0060] 本发明的营养组合物优选包含1.6至4.0g蛋白质/100kcal营养组合物、优选每100kcal营养组合物提供1.6至3.5g、甚至更优选1.75至2.5g的蛋白质。在一个实施方案中,本发明的营养组合物包含1.6至2.1g蛋白质/100kcal营养组合物、优选每100kcal营养组合物提供1.6至2.0g、更优选1.75至2.1g、甚至更优选1.75至2.0g的蛋白质。在一个实施方案中,本发明的营养组合物包含的蛋白质的量小于2.0g/100kcal,优选1.6至1.9g,甚至更优选1.75至1.85g/100kcal营养组合物。基于总卡路里计太低的蛋白质含量将导致婴儿和幼儿的生长和发育不充分。当呈液体形式例如作为即食液体时,营养组合物优选包含0.5至6.0g蛋白质/100ml、更优选1.0至3.0g蛋白质/100ml、甚至更优选1.0至1.5g蛋白质/100ml,

最优选1.0至1.3g蛋白质/100ml。基于干重计,本发明的营养组合物优选包含5至20重量%的蛋白质,优选至少8重量%的蛋白质,基于总营养组合物的干重计,更优选8至14重量%的蛋白质,甚至更优选8至9.5重量%的蛋白质,基于总营养组合物的干重计。

[0061] 为了满足婴儿或幼儿的卡路里需求,营养组合物优选包含45至200kcal/100ml液体。对于婴儿,营养组合物更优选具有60至90kcal/100ml液体,甚至更优选65至75kcal/100ml液体。这种卡路里密度确保水和卡路里消耗之间的最佳比例。对于幼儿——12至36月龄的人类受试者,营养组合物更优选具有45至65的卡路里密度,甚至更优选50至60kcal/100ml。本发明的组合物的摩尔渗透压浓度优选为150至420mOsmol/L,更优选260至320mOsmol/L。低的摩尔渗透压浓度旨在进一步降低胃肠道压力。

[0062] 当营养组合物为液体形式时,每日给予的优选体积为每日约80至2500ml,更优选约200至1200ml。优选地,每日的喂食次数为1至10,优选3至8。在一个实施方案中,每日以液体形式给予营养组合物,持续至少2天,优选至少4周,优选至少8周,更优选至少12周,其中每日给予的总体积为200ml至1200ml,并且其中每日的喂食次数为1至10。

[0063] 当呈液体形式时,本发明的营养组合物优选具有1至60mPa.s、优选1至20mPa.s、更优选1至10mPa.s、最优选1至6mPa.s的粘度。低粘度确保适当的液体给予,例如,适合通过整个奶嘴。所述粘度还非常类似于人乳的粘度。此外,低粘度导致正常的胃排空和更好的能量摄入,这对需要能量用于最佳生长和发育的婴儿是必需的。本发明的组合物优选通过将粉末状组合物与水混合来制备。通常,婴儿配方物以这种方式制备。因此,本发明还涉及一种包装的粉末组合物,其中所述包装提供有将粉末与适量液体混合从而得到粘度为1至60mPa.s的液体组合物的说明。使用Physica Rheometer MCR 300 (Physica Messtechnik GmbH, Ostfilden, Germany) 在20℃下以 $95s^{-1}$ 的剪切速率测定液体的粘度。

[0064] 应用

[0065] 在本发明的上下文中,疾病或某种病症的“预防”还意指患疾病或某种病症的“风险降低”,并且还意指处于患所述疾病或所述某种病症的“风险的人的治疗”。

[0066] 本发明的发明人发现,在食用本发明的营养组合物后,sIgA的水平协同增加。这表明黏膜免疫防御系统得到改善。

[0067] 与给予不包含发酵产物和不可消化寡糖的组的营养组合物相比,观察到本文所述的效果,即sIgA增加和/或改善的黏膜免疫系统。发现与标准婴儿配方物喂养的婴儿相比,所观察到的这些效果还更接近于在人乳喂养的婴儿中观察到的水平。

[0068] 出人意料地,协同效果不能解释为发酵组合物中不可消化寡糖和产乳酸细菌之间的直接相互作用,原因在于细菌被灭活;也不能解释为增加的肠道微生物活性,原因在于与肠道pH没有明显的相关性。

[0069] 在一个实施方案中,本发明的营养组合物用于增加0至36月龄的人类受试者的IgA分泌。在一个实施方案中,本发明的营养组合物用于增加0至18月龄的人类受试者、甚至更优选12月龄以下的婴儿、甚至更优选0至6月龄的婴儿的IgA分泌。在一个实施方案中,本发明的营养组合物用于增加12至36月龄的幼儿的IgA分泌,最优选18至30或至24月龄的幼儿的IgA分泌。优选地,本发明的营养组合物还用于为所述人类受试者提供营养。本发明的营养组合物优选肠内给予,更优选口服给予。

[0070] 在一个实施方案中,本发明的营养组合物用于改善0至36月龄的人类受试者的黏

膜免疫防御。在一个实施方案中,本发明的营养组合物用于改善0至18月龄的人类受试者、甚至更优选12月龄以下的婴儿、甚至更优选0至6月龄的婴儿的黏膜免疫防御。在一个实施方案中,本发明的营养组合物用于改善12至36月龄的幼儿的黏膜免疫防御,最优选18至30或至24月龄的幼儿的黏膜免疫防御。优选地,本发明的营养组合物还用于为所述人类受试者提供营养。本发明的营养组合物优选肠内给予,更优选口服给予。

[0071] 在优选的实施方案中,本发明的方法或用途用于阴道分娩的婴儿。

[0072] 在优选的实施方案中,本发明的方法或用途用于足月婴儿,优选用于健康的足月婴儿。

[0073] 在本文及其权利要求书中,动词“包含”及其变形以其非限制性含义使用,意指包括该词后面的项目,但不排除未具体提及的项目。另外,由不定冠词“一”或“一个”引出的元素不排除存在多于一个元素的可能性,除非上下文明确要求存在一个且仅一个元素。因此,不定冠词“一”或“一个”通常意指“至少一个”。重量%意指重量百分比。

[0074] 实施例

[0075] 实施例1:发酵的婴儿配方物和不可消化寡糖对婴儿分泌型IgA水平的协同效果

[0076] 在随机的、双盲的、对照的、平行组、前瞻性、多中心的、多国的、干预研究中,将受试者平等地随机分成四个治疗组。此外,将自出生以来纯母乳喂养(从未接受任何婴儿配方物)且其母亲有意向继续纯母乳喂养直到婴儿至少4月龄的婴儿列入母乳喂养参考组。总共350名受试者入组,其中280名受试者被随机给予四种测试产品中的任一种,并且70名受试者被列入母乳喂养参考组。

[0077] 测试组1:婴儿配方物1是用于奶瓶喂养的0-6月龄婴儿的改良的基于牛乳的婴儿配方物(Nutrilon 1,由荷兰Nutricia销售)。配方物含有不可消化寡糖(NDO)——低聚半乳糖(购自FrieslandCampina Domo的**Vivinal**®GOS,平均聚合度低于6)和低聚果糖(购自Orafti的RaftilinHP,平均聚合度高于20)以约9:1的w/w比的混合物,其量为约0.8g/100ml。配方物不含发酵组分。

[0078] 测试组2:婴儿配方物2是用于奶瓶喂养的0-6月龄婴儿的改良的基于牛乳的婴儿配方物,并且是包含菌株短双歧杆菌CNCM 1-2219和嗜热链球菌CNCM 1-1620的发酵的婴儿配方物**Calisma**®(由Gallia,France销售),所述菌株在发酵过程后被热灭活,细菌发酵代谢物为例如L-(+)乳酸。L-乳酸盐的量高于0.05重量%,基于组合物的干重计。未添加NDO。在发酵过程中,基于干重计约2重量%的量的低聚半乳糖由嗜热链球菌产生。

[0079] 试验组3:婴儿配方物3是实验测试配方物,并且是用于奶瓶喂养的0-6月龄婴儿的改良的基于牛乳的婴儿配方物。配方物含有约0.9g/100ml的量的不可消化寡糖(平均聚合度低于6的低聚半乳糖和平均聚合度高于20的低聚果糖(购自Orafti的RaftilinHP)的混合物),并且包含发酵的婴儿配方物**Calisma**®(由法国Gallia销售),如在测试组2的IF 2中。加入的低聚半乳糖的量考虑了由于嗜热链球菌的作用而产生的低聚半乳糖的量。

[0080] 对照组:婴儿配方物4是对照配方物:用于奶瓶喂养的0-6月龄婴儿的改良的基于牛乳的婴儿配方物,不含不可消化寡糖且未发酵。

[0081] 所有四种测试配方物都包含核苷酸和含有长链脂肪酸的脂肪混合物。配方物在卡路里含量、蛋白质含量、脂肪混合物方面相似,并且具有相似量的可消化碳水化合物。测试产品2和3中的活细菌数低于 10^3 cfu/g。根据用于婴儿配方物的国际指令2006/141/EC,配方

物还包含维生素、矿物质、微量元素和其他微量营养素。

[0082] 在研究结束时,198名随机受试者完成了研究,而82名随机受试者过早地退出研究。将有效的测试产品组和对照组相比,提早退出者的数量和性质没有统计学上的显著性差异。就人口统计学和基线特征而言,受试者在研究组中很好地均衡。

[0083] 每次就诊时,父母将粪便样本收集到由Nutricia Research提供的粪便容器中。在父母收集后将样品在-20°C下直接冷冻并保持在该温度下直至将样品交给研究人员。在现场,将样品储存在-80°C下用于后续分析。在每次收集时,2个管必须填充一半。如果由于研究现场的实际问题需要,可以安排其他运输和储存方式。用标准实验室技术测定粪便分泌型IgA水平。由于sIgA测量的分布显示出潜在的偏斜,因此为了统计分析,在使用ANOVA测试研究组之间的差异之前已经进行了对数变换。基于几何平均值(效应量=由于对数变换表示为几何平均比的组差异)对sIgA水平进行统计学分析。

[0084] 结果显示在表1中。为了分析原始数据,意向治疗(ITT)分析被认为是该研究的主要分析。在4个月——婴儿仍然完全喂食婴儿配方物的时间段——时,IF 3组(包含发酵配方物和不可消化寡糖的实验配方物)与IF 4对照组或IF 2组(Calisma)中的粪便sIgA水平之间存在统计学上的显著性差异($p < 0.05$)。当与IF 1组(Nutrilon)相比时,存在趋势($p = 0.07$)。当IF 1与IF 2、IF 1与IF 4比较时,或当IF 2与IF 4比较时,没有统计学上的显著性差异。

[0085] 表1:每次就诊时的粪便的sIgA浓度($\mu\text{g/g}$)——ITT人群

[0086]

sIgA 浓度	IF 1	IF 2	IF 3	IF 4	母乳喂养
配方物	未发酵 含 NDO	发酵 无 NDO	发酵 含 NDO	未发酵 无 NDO	
平均值 (SD)	714.5 [#] (822.8)	539.0* (636.6)	929.4 (889.9)	685.3* (986.9)	1028.0 (603.0)
n	42	48	45	40	35
中值	442.6	253.6	742.9	331.4	1051.7
Q1 - Q3	142.3 - 854.1	120.7 - 756.7	269.0 - 1517.8	154.5 - 663.5	489.8 - 1443.5
最小值 - 最大值	31.6 - 3634.4	30.2 - 2345.5	48.4 - 4994.4	29.2 - 5356.8	147.3 - 2329.1

[0087] *与测试IF 3相比 $p < 0.05$

[0088] [#]与测试IF 3相比: $p = 0.07$

[0089] 当与母乳喂养的参照组相比时,没有给出统计数据,原因在于参照组不是随机的,

因此不应该用于与随机研究组的直接比较。没有进行中值的统计分析,但观察到类似的模式。

[0090] 测试组3和4之间的sIgA产生的差异可表示为基于几何平均值的效应量,其等于1.65。这可以解释为:当与使用IF 4的对照组相比时,在4月龄时使用实验配方物IF 3导致sIgA浓度增加约65%。类似地,测试组3相对于测试组1的效应量为1.53,并且测试组3相对于测试组2的效应量为2.06。

[0091] 食用IF 3的组中的sIgA浓度协同地高于预期,基于食用IF 1和IF 2以及对照IF 4的组的结果,并且有益地更类似于在母乳喂养的参照组中观察到的水平。这表明对黏膜免疫防御有协同增加效果。

[0092] 由于IF 3(和IF 2)中存在的细菌被热灭活,因此这种效果不能解释为源自配方物的肠道产乳酸细菌的量的增加,也不能解释为这些源自配方物的产乳酸细菌对所添加的不可消化寡糖的肠道发酵的增加。

[0093] 实施例2:食用含有不可消化寡糖的发酵的婴儿配方物增加肠道sIgA水平

[0094] 在随机的、多中心的、双盲的、前瞻性临床试验中,婴儿在28日龄之前入组,并被指定接受三种配方物中的一种直至17周龄:

[0095] 测试组1:婴儿配方物1包含每100ml 66kcal、1.35g蛋白质(牛乳清蛋白/酪蛋白,重量比为1/1)、8.2g可消化碳水化合物(其中5.6g乳糖和2.1g麦芽糖糊精)、3.0g脂肪(主要是植物脂肪)、0.8g包含重量比为9:1的scGOS(来源 **Vivinal®**GOS)和1cFOS(来源 **RaftilinHP®**)的不可消化寡糖。基于干重计,在该婴儿配方物中约50%源自Lactofidus™,一种以商品名Gallia销售的市售可得的婴儿配方物。Lactofidus™是一种发酵乳衍生组合物,通过用嗜热链球菌发酵而制备,并且包含短双歧杆菌。采用温和的热处理来使乳酸菌灭活。婴儿配方物包含基于干重计约0.55重量%的乳酸+乳酸盐,其中至少95%为L(+)-乳酸/乳酸盐。根据婴儿配方物的国际指令2006/141/EC,组合物还包含维生素、矿物质、微量元素和其他微量营养素。

[0096] 测试组2:婴儿配方物2,类似于婴儿配方物1,但不含不可消化寡糖scGOS和1cFOS。

[0097] 测试组3:婴儿配方物3,一种包含0.8g不可消化寡糖的非发酵婴儿配方物,所述不可消化寡糖包含重量比为9:1的scGOS(来源 **Vivinal®**GOS)和1cFOS(来源 **RaftilinHP®**),并且其余部分在组成上与婴儿配方物1相似。

[0098] 在基线处以及在干预17周后,以类似于实施例1中所述的方式收集粪便样品用于生理学和微生物学分析。仅分析具有一组完整的粪便样品(两次就诊)的受试者小组的样品,其中粪便量足以进行所有分析。此外,排除了来自以下婴儿的样品:在出生后任何时候使用任何全身性抗生素或在研究期间使用添加到配方物中的增稠剂的婴儿。

[0099] 在选定的一组粪便样品中,评估所用的婴儿配方物对分泌型免疫球蛋白A(sIgA)的影响,结果如表2所示。

[0100] 表2:每次就诊时的粪便的sIgA浓度(μg/g)

[0101]

参数	示出的统计值	IF 1 (N = 30)	IF 2 (N = 30)	IF 3 (N = 30)
sIgA ($\mu\text{g/g}$ 湿重 粪便) ^W	中值 (最小值-最大值)	1424.4* (84.9 - 3346.4)	1245.9 (144.7 - 3006.1)	499.7* (45.6 - 5145.4)
pH ^W	中值 (最小值-最大值)	6.1* [#] (5.2 - 7.6)	5.6 [#] (5.0 - 7.3)	6.9* (5.6 - 8.2)

[0102] ^W为了分析,使用了Wilcoxon秩和检验(W),这是因为违反了正态假设和/或存在异常值。

[0103] *对于所测试的感兴趣的比较:IF 1与IF 3,组之间存在显著性差值($p < 0.05$)。

[0104] [#]对于所测试的感兴趣的比较:IF 1与IF 2,组之间存在显著性差值($p < 0.05$)。

[0105] 同样,在食用实验婴儿配方物1的组中sIgA浓度高于食用婴儿配方物2或3的组的sIgA浓度,非常类似于实施例1中的结果。这表明对黏膜免疫防御的影响增加。

[0106] 有趣地,对粪便sIgA水平的影响与对粪便pH的影响不一致。在食用婴儿配方物2的组中pH最低,并且在食用实验婴儿配方物1的组中pH中等。pH反映了肠道微生物群的活性。测试组1和2的较低的粪便pH归因于测试婴儿配方物中存在的不可消化寡糖的发酵,并且在测试组2中发酵最高,而在测试组1中sIgA水平最高。