



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109803666 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201680080474.9

(22)申请日 2016.11.30

(30)优先权数据

62/386,347 2015.11.30 US

15/072,308 2016.03.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/064286 2016.11.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/095968 EN 2017.06.08

(71)申请人 医迈霖科技公司

地址 美国马里兰州弗雷德克市

(72)发明人 林哲志 林逸筑

(74)专利代理机构 北京弘权知识产权代理事务所(普通合伙) 11363

代理人 逯长明 许伟群

(51)Int.Cl.

A61K 35/74(2015.01)

A61K 35/744(2015.01)

C12N 1/04(2006.01)

A23L 33/115(2016.01)

A23L 33/135(2016.01)

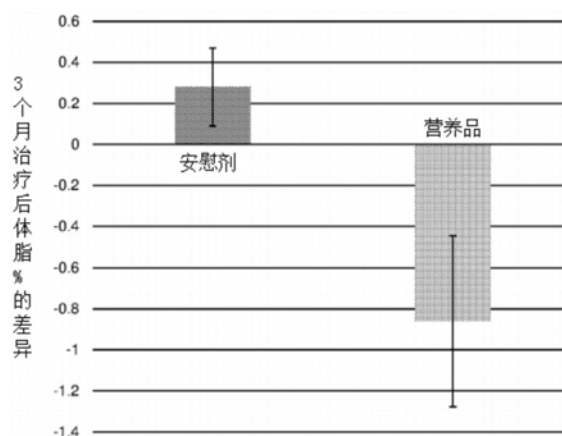
权利要求书4页 说明书41页 附图4页

(54)发明名称

包括益生菌的组合物及其使用方法

(57)摘要

本发明提供了包含益生菌与有效量的两亲性物质混合的组合物,当所述组合物受热时,所述两亲性物质增强所述组合物中的益生菌的生存能力。



1. 一种组合物,包括益生菌与有效量的两亲性物质的混合,所述两亲性物质在所述组合物受热时增强所述组合物中的益生菌的生存能力。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述益生菌作为冷冻干燥的发酵培养物与所述两亲性物质混合。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的组合物,其中,所述两亲性物质作为干粉与所述益生菌混合。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,还包括与所述两亲性物质和益生菌混合的油。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中,所述油包括花生油、玉米油、植物油、豆油或橄榄油。

6. 根据权利要求4至6中任一项所述的组合物,其中,所述两亲性物质与所述益生菌与所述油的比率(w/w)的范围为约1:10:0.1至约10:1:25。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的组合物,其中,所述组合物形成脂质膏且所述两亲性物质作为所述益生菌的载体。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的组合物,其中,所述益生菌是乳酸片球菌。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中,所述益生菌是乳酸片球菌NRRL B-50517。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的组合物,其中,所述两亲性物质包括卵磷脂、花生酱、杏仁黄油、大豆黄油或饼干黄油。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中,所述热是干热。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中,所述干热为至少50℃。

13. 根据权利要求11至12中任一项所述的组合物,其中,所述干热的范围为50℃至100℃。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的组合物,其中,所述组合物立即受热,然后立即从热中去除。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的组合物,其中,所述组合物受热至少约10分钟。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的组合物,其中,所述组合物在第一温度下受干热,接着使所述组合物在第二温度下受干热。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其中,所述第一温度为约65℃,以及所述第二温度为约85℃。

18. 根据权利要求16至17中任一项所述的组合物,其中,所述组合物在所述第一温度下受热至少约1秒至至少过夜,并在所述第二温度下受热至少约1秒至至少约30分钟。

19. 根据权利要求16至17中任一项所述的组合物,其中,所述组合物在所述第一温度下受热约30分钟,并在所述第二温度下受热约10分钟。

20. 根据权利要求16至17中任一项所述的组合物,其中,所述组合物在所述第一温度下受热约30分钟,并在所述第二温度下受热约30分钟。

21. 根据权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中,所述热为液体热。

22. 根据权利要求21所述的组合物,其中,所述液体热为至少约65℃。

23. 根据权利要求21所述的组合物,其中,所述液体热为至少约80℃。

24. 根据权利要求21所述的组合物,其中,所述液体热为至少约82℃。
25. 根据权利要求21至24中任一项所述的组合物,其中,所述组合物受所述液体热至少约1秒。
26. 根据权利要求21至24中任一项所述的组合物,其中,所述组合物受所述液体热至少约5分钟。
27. 根据权利要求21至24中任一项所述的组合物,其中,所述组合物受所述液体热至少约10分钟。
28. 根据权利要求1至27中任一项所述的组合物,其中,所述生存能力与缺乏有效量的两亲性物质的组合物相比增强至少约2倍。
29. 根据权利要求1至27中任一项所述的组合物,其中,所述生存能力与缺乏有效量的两亲性物质的组合物相比增强至少约10倍。
30. 根据权利要求1至29中任一项所述的组合物,其中,所述两亲性物质是向日葵卵磷脂。
31. 根据权利要求1至30中任一项所述的组合物,其中,所述两亲性物质与所述益生菌的比率(w/w)的范围为约1:10至约25:1。
32. 根据权利要求1至31中任一项所述的组合物,其中,所述两亲性物质与所述益生菌的比率(w/w)的范围为约1:1至约10:1。
33. 根据权利要求1至32中任一项所述的组合物,其中,所述两亲性物质与所述益生菌的比率(w/w)为约5:1。
34. 根据权利要求1至32中任一项所述的组合物,其中,所述两亲性物质与所述益生菌的比率(w/w)为约10:1。
35. 一种容器,适用于容纳包含根据权利要求1-34中任一项所述的组合物的食物产品。
36. 根据权利要求35所述的容器,其中,所述容器由包括玻璃、塑料、纸/纸盒、铝或干植物果壳的物质制成。
37. 根据权利要求35至36中任一项所述的容器,其中,所述组合物被涂覆在所述容器的表面或部分上。
38. 根据权利要求35至37中任一项所述的容器,其中,还包括食物产品。
39. 根据权利要求38所述的容器,其中,所述食物产品包括油,醋,酸奶,水果产品,苹果酱,乳制品,饮料,糖果,零食,果汁,用作甜点的食品如饼干、蛋糕、果冻、水果棒、水果奶油冻或提拉米苏。
40. 一种容器,适用于容纳食物产品,其中,所述容器的一部分或表面涂覆有有效量的酸乳片球菌。
41. 根据权利要求40所述的容器,其中,所述乳酸片球菌为NRRL B-50517菌株。
42. 根据权利要求40或41所述的容器,其中,所述容器由包括玻璃、塑料、纸/纸盒和铝的物质制成。
43. 根据权利要求40至43中任一项所述的容器,其中,所述乳酸片球菌被涂覆在所述容器的内表面上。
44. 根据权利要求40至43中任一项所述的容器,还包括食物产品。
45. 根据权利要求44所述的容器,其中,所述食物产品包括油、醋、酸奶、水果产品、苹果

酱、乳制品、饮料、糖果、零食和果汁。

46. 一种增强受热组合物中的益生菌生存能力的方法, 包括:

- i) 将有效量的两亲性物质加入到包括益生菌的组合物中; 以及
- ii) 使组合物受热,

从而, 在受热的所述组合物中所述益生菌的生存能力增强。

47. 根据权利要求46所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌的冻干发酵培养物混合。

48. 根据权利要求46至47中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质为干粉形式。

49. 根据权利要求46至48中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌和油混合。

50. 根据权利要求49所述的方法, 其中, 所述油包括花生油、玉米油、植物油、豆油或橄榄油。

51. 根据权利要求49至50中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌与所述油的比率 (w/w) 的范围为约1:10:0.1至约10:1:25。

52. 根据权利要求46至50中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质形成脂质膏并作为载体。

53. 根据权利要求46至52中任一项所述的方法, 其中, 所述益生菌是乳酸片球菌。

54. 根据权利要求46至52中任一项所述的方法, 其中, 所述益生菌是乳酸片球菌NRRL B-50517。

55. 根据权利要求46至54中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质包括卵磷脂、花生酱、杏仁黄油、大豆黄油或饼干黄油。

56. 根据权利要求46至55中任一项所述的方法, 其中, 所述热是干热。

57. 根据权利要求56所述的方法, 其中, 所述干热为至少50℃。

58. 根据权利要求55至56中任一项所述的方法, 其中, 所述干热的范围为50℃至100℃。

59. 根据权利要求46至58中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物立即受热, 然后立即从热中去除。

60. 根据权利要求46至59中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物受热至少约10分钟。

61. 根据权利要求46至60中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物在第一温度下受干热, 接着使所述组合物在第二温度下受干热。

62. 根据权利要求61所述的方法, 其中, 所述第一温度为约65℃, 和所述第二温度为约85℃。

63. 根据权利要求61至62中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物在所述第一温度下受热至少约1秒至至少约30分钟, 并在所述第二温度下受热至少约1秒至至少约30分钟。

64. 根据权利要求61至63中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物在所述第一温度下受热约30分钟, 并在所述第二温度下受热约10分钟。

65. 根据权利要求61至63中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物在所述第一温度下受热约30分钟, 并在所述第二温度下受热约30分钟。

66. 根据权利要求46至55中任一项所述的方法, 其中, 所述热为液体热。

67. 根据权利要求66所述的方法, 其中, 所述液体热为至少约50℃。

68. 根据权利要求66所述的方法, 其中, 所述液体热为至少约80℃。

69. 根据权利要求66所述的方法, 其中, 所述液体热为至少约82℃。

70. 根据权利要求66至69中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物立即受热, 然后立即从热中去除。

71. 根据权利要求66至70中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物受热至少约5分钟。

72. 根据权利要求66至70中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物受热至少约10分钟。

73. 根据权利要求46至72中任一项所述的方法, 其中, 所述生存能力与缺乏有效量的两亲性物质的组合物相比增强至少约2倍。

74. 根据权利要求46至72中任一项所述的方法, 其中, 所述生存能力与缺乏有效量的两亲性物质的组合物相比增强至少约10倍。

75. 根据权利要求46至74中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质是向日葵卵磷脂。

76. 根据权利要求46至75中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌的比率(w/w)的范围为约1:10至约25:1。

77. 根据权利要求46至76中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌的比率(w/w)的范围为约1:1至约10:1。

78. 根据权利要求46至77中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌的比率(w/w)为约5:1。

79. 根据权利要求46至77中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌的比率(w/w)为约10:1。

80. 根据权利要求46至79中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物与食物产品接触, 并与所述食物产品一起受热。

81. 根据权利要求46至79中任一项所述的方法, 其中, 步骤ii)的使所述组合物受热的步骤包括使所述组合物与食物产品接触, 其中所述食物产品在接触所述组合物之前已经预先受热。

## 包括益生菌的组合物及其使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明的领域涉及包括乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 细菌的益生菌的组合物和使用。

### 背景技术

[0002] 益生菌是人类和动物胃肠 (GI) 道中天然存在的有益微生物。2001年,世界卫生组织将益生菌定义为“活的微生物,当施用足量时,其赋予宿主健康益处”(Joint FAO/WHO Expert Consultation Report, 2001)。已经报道了许多与益生菌相关的健康益处,如减少抗生素引起的腹泻、急性腹泻、旅行者腹泻、过敏、呼吸道和泌尿道感染、炎症性肠病、肠易激综合征、结肠癌和膀胱癌以及类风湿性关节炎的症状。传统上,双歧杆菌和乳酸菌是商业上可获得的益生菌。然而,这些细菌对空气接触、体温升高和胃酸都很敏感。

[0003] 乳酸片球菌是一种基于植物的益生菌,广泛应用于人类食用的香肠制品和改善动物健康的动物饲料添加剂。此外,据报道,乳酸片球菌能够刺激针对肉鸡球虫病的寄生虫感染的抗体的产生和接种了卵蛋白的马中卵白蛋白抗体的产生 (Furr et al., Journal of Equine Veterinary Science, 34:1156-1163 (2014))。在饲喂基于乳酸片球菌的益生菌 (其是乳酸片球菌和布拉氏酵母菌的混合物) 的大鼠中检测到T细胞和B细胞两者的增殖。

[0004] 制备在施用给受试者的食品和药物/保健品中的益生菌制剂的挑战之一是与产品以及生产产品的工艺 (特别是在苛刻条件诸如加热的情况下的巴氏灭菌或处理) 不相容。苛刻条件会导致益生菌的生存能力严重损失。不能在生存能力没有显著损失的情况下有效地对存在益生菌的产品进行巴氏灭菌导致了制造工艺的附加工艺步骤,这增加了复杂性和成本。

[0005] 因此,需要包含益生菌例如乳酸片球菌的新组合物和方法,特别是当受热时增强益生菌生存能力的方法。

[0006] 本背景资料只用于信息的目的。既未必意指允许也不应解释为上述任何信息构成针对本发明的现有技术。

### 发明内容

[0007] 应理解,实施例的上述一般描述和以下详细描述两者是示例性的,因此不限制实施例的范围。

[0008] 根据非限制性示例实施例,一个方面,本发明提供了一种组合物,该组合物包括益生菌和有效量的两亲性物质的混合物,所述两亲性物质在所述组合物受热时增强所述组合物中的益生菌的生存能力。

[0009] 另一方面,本发明提供一种容器,所述容器适用于容纳一种食物产品,所述食物产品包含包括益生菌和有效量的两亲性物质的混合物的组合物,所述两亲性物质在所述组合物受热时增强所述组合物中的益生菌的生存能力。

[0010] 另一方面,本发明提供一种适用于容纳食物产品的容器,其中所述容器的一部分

或表面涂覆有有效量的乳酸片球菌。

[0011] 另一方面,本发明提供一种增强受热组合物中的益生菌的生存能力的方法,所述方法包括:

[0012] i) 向包括益生菌的组合物中加入有效量的两亲性物质;以及

[0013] ii) 使所述组合物受热,

[0014] 从而在受热的所述组合物中所述益生菌的生存能力增强。

[0015] 另一方面,本发明提供一种治疗有需要的受试者的特征为炎症的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文描述的有效量的乳酸片球菌益生菌组合物。

[0016] 在一些实施例中,乳酸片球菌益生菌的施用使所述受试者的抗炎M2巨噬细胞的数量增多,从而治疗所述疾病或病症。在一些实施例中,乳酸片球菌益生菌的施用使所述受试者的IL-10产生增多,从而治疗所述疾病或病症。在一些实施例中,乳酸片球菌益生菌的施用使受试者的IL-6和/或IL-23的水平降低,从而治疗所述疾病或病症。

[0017] 在一些实施例中,特征为炎症的所述疾病或病症选自:恶性肿瘤(癌症)、关节炎、心血管疾病、肝炎、感染、伤口愈合、胰腺炎、胃食管返流疾病、糖尿病、炎症性肠病、消化性溃疡、支气管炎、胆囊炎、阑尾炎、滑囊炎、皮炎、哮喘、自身免疫性疾病、盆腔炎、痛风、创伤、异物感染、烧伤、牙科工作(dental work)、肌腱炎、鼻炎、粘膜炎,以及暴露于诸如化学品和酒精的毒素。

[0018] 在一些实施例中,所述乳酸片球菌益生菌是NRRL B-50517菌株。在一些实施例中,所述受试者是人。

[0019] 在一些实施例中,所述受试者被施用大于 $1.0 \times 10^9$ cfu的益生菌。在一些实施例中,所述受试者被施用大于 $4.0 \times 10^9$ cfu的益生菌。

[0020] 在一些实施例中,所述受试者被施用一种或更多种另外的治疗剂。在一些实施例中,所述受试者被组合施用乳酸片球菌益生菌与一种或更多种化疗(抗癌)剂和/或放疗。

[0021] 在一些实施例中,所述受试者不被施用另一种治疗剂。在一些实施例中,所述受试者不被施用另一种益生菌。

[0022] 另一方面,本发明提供一种包括乳酸片球菌益生菌的组合物。在一些实施例中,所述乳酸片球菌是菌株NRRL B-50517。在一些实施例中,所述组合物是一种药物组合物。

[0023] 应理解,上述一般描述和以下详细描述两者是示例性的,因此不限制本发明的范围。本发明的其他目的、特征和优点将根据以下详细描述而变得明显。然而,应理解,在说明本发明的具体实施方案时,仅通过说明的方式给出详细描述和具体示例,因为根据这些详细描述,在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对本领域技术人员来说将变得明显。

## 附图说明

[0024] 技术人员将理解,下面描述的附图只用于说明的目的。这些附图并不意在以任何方式限制当前教导的范围。

[0025] 图1. 乳酸片球菌5051益生菌对体脂%的影响。

[0026] 图2. 乳酸片球菌5051益生菌对IL-23活性的影响。

[0027] 图3. 乳酸片球菌5051益生菌对IL-6活性的影响。

[0028] 图4. 基于乳酸片球菌的益生菌对患有胰腺炎的狗的影响。14岁的雌性、卵巢切除、

患有胰腺炎的贵宾犬在时间点一天两次用100mg KAMOSTAAL100处理(红点),处理在约2<sup>1/2</sup>个月停止(红色方框)。施用基于乳酸片球菌的益生菌(绿点),并在约一个月后停止(绿色方框)。复发后,再次施用基于乳酸片球菌的益生菌(绿色圆圈),并持续一段时间(绿色箭头)。

[0029] 图5.乳酸片球菌NRRL B-50517生产工艺总结流程图。

[0030] 图6.用于包含益生菌组合物的食物产品的示例性容器。

## 具体实施方案

[0031] 本发明部分地基于以下令人惊讶的发现:当与有效量的两亲性物质组合时,益生菌(诸如乳酸片球菌)在所述组合物受热时的生存能力可以得到增强。本发明部分地也基于以下令人惊讶的发现:有效量的乳酸片球菌益生菌的施用能够治疗特征为炎症的疾病或病症。

[0032] 现在将详细参考本发明的实施例,其与附图和以下示例一起用于解释本发明的原理。这些实施方案足够详细地描述以使本领域技术人员能够实践本发明,并且应当理解,可以利用其他实施方案,并且可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下进行结构、生物和化学变化。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0033] 出于解释本说明书的目的,将应用以下定义,并且在任何适当的时候,以单数使用的术语也将包括复数,反之亦然。如果下面列出的任何定义与任何其他文件(包括通过引用并入本文的任何文件)中的该词的使用相冲突,则下文所述的定义应始终控制以出于解释本说明书及其相关权利要求的目的,除非明确意指相反的含义(例如在最初使用该术语的文档中)。当与权利要求和/或说明书中的术语“包括”结合使用时,使用词语“一个”或“一种”可以表示“一”,但它也与“一个或多个”、“至少一”、和“一或多于一”的含义一致。权利要求中的术语“或”用于表示“和/或”,除非明确指出仅指替代方案或替代方案是相互排斥的,但是本公开支持仅指替代方案的定义和“和/或”。如在本说明书和权利要求中所使用的,词语“包括(comprising)”(和任何形式的包括,例如“包括(comprise)”和“包括(comprises)”、“具有(having)”(和任何形式的具有,例如“具有(have)”和“具有(has)”、“包含(including)”(和任何形式的包含,例如“包含(includes)”和“包含(include)”或“含有(contains)”(和任何形式的含有,例如“含有(contains)”和“含有(contain)”都是包含的或开放式的并且不排除其他未列举的元素或方法步骤。此外,在一个或多个实施方案的描述使用术语“包括”的情况下,本领域技术人员将理解,在一些特定情况下,可以使用语言“基本上由.....组成”和/或“由.....组成”来替代地描述一个或多个实施方案。如本文所用,术语“约”是指其使用数量的数值的至多±10%。

[0034] 关于本文讨论的已知技术或等同技术的详细描述,本领域技术人员可以参考一般参考文献。这些文献包括例如分子生物学现代方法(Current Protocols in Molecular Biology)(Ausubel et.al.,eds.John Wiley&Sons,N.Y.及其增补)、免疫学现代方法(Current Protocols in Immunology)(Coligan et al.,eds.,John Wiley St Sons,N.Y.及其增补)、药理学现代方法(Current Protocols in Pharmacology)(Enna et al.,eds.John Wiley&Sons,N.Y.及其增补)和雷明顿:药学的科学与实践(Remington:The



Science and Practice of Pharmacy) (Lippincott Williams&Wilkins, 2Vt edition (2005))。

[0035] 耐热益生菌组合物和制备方法

[0036] 在一个实施方案中,本发明提供一种组合物,其包含益生菌与有效量的两亲性物质的混合物,所述两亲性物质在组合物受热时增强组合物中的益生菌的生存能力。该组合物当适合施用于受试者时包含有效量的益生菌。

[0037] 在另一个实施方案中,本发明包括制备对热具有改善的生存能力的益生菌组合物的方法,包括向包含益生菌的组合物中加入有效量的两亲性物质。

[0038] 在另一个实施方案中,本发明包括增强受热组合物中的益生菌的生存能力的方法,包括:

[0039] i) 向包含益生菌的组合物中加入有效量的两亲性物质;以及

[0040] ii) 使该组合物受热,

[0041] 由此增强了受热组合物中的益生菌的生存能力。

[0042] 益生菌没有特别限制。在一些实施方案中,益生菌作为冷冻干燥的发酵培养物与两亲性物质混合。在一些实施方案中,益生菌是乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)。可以根据本发明使用的乳酸片球菌益生菌不是限制性的。在一些实施方案中,乳酸片球菌是在65°C以上存活、能够在需氧和厌氧条件下以及在1至6.2的pH范围内生长的菌株。在一些实施方案中,乳酸片球菌是保藏在农业研究院(ARS)专利培养物保藏中心的菌株NRRL B-50517。菌株NRRL B-50517描述于美国申请第13/676,579号中,其通过引用并入本文。

[0043] 在一些实施方案中,可以针对对高温、低pH值和需氧和厌氧条件具有耐受性来选择用于本发明的乳酸片球菌。

[0044] 在一些实施方案中,组合物包含大于约 $1.0 \times 10^9$ cfu的益生菌。在一些实施方案中,组合物包含大于 $4.0 \times 10^9$ cfu的益生菌。

[0045] 两亲性分子是在其结构中具有极性和非极性部分的分子。两亲性分子通常具有分子的疏水部分(其朝向疏水相)和亲水部分(其朝向水相)。

[0046] 以这些分子为特征的一些化合物对于许多生物和工业过程都是必不可少的。在一些实施方案中,两亲性物质包含卵磷脂、花生酱、杏仁黄油、大豆黄油或饼干黄油作为益生菌(例如乳酸片球菌NRRL B-50517发酵培养物)的载体。在一些实施方案中,过量的两亲性物质被使用并且可以保护乳酸片球菌NRRL B-50517发酵培养物免受苛刻的干热或湿热处理。卵磷脂是一种磷脂酰胆碱,可以包含来自植物和/或动物来源的中性和极性脂质的天然混合物。它在水中溶解度低,但是是一种优异的乳化剂。在水溶液中,其磷脂可以形成脂质体、双层片、胶束或层状结构,这取决于水合作用和温度。这导致一种通常被归类为两亲性的表面活性剂。

[0047] 在一些实施方案中,两亲性物质是脂质。亲水性特征源于极性或带电基团的存在,例如碳水化合物、磷酸根、羧基、硫酸根、氨基、巯基、硝基、羟基和其他类似基团。疏水性可以通过包括非极性基团来赋予,非极性基团包括但不限于,长链饱和和不饱和脂族烃基和被一个或更多个芳族、脂环族或杂环基团取代的这种基团。两亲性化合物的实例包括但不限于,磷脂质、氨脂质和鞘脂。磷脂质的代表性实例包括但不限于,磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(*palmitoyl*oleoyl

phosphatidylcholine)、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱或二亚油酰磷脂酰胆碱

(dilinoleoylphosphatidylcholine)。缺乏磷的其他化合物,例如鞘脂、鞘糖脂类、二酰基甘油和 $\beta$ -酰氨基酸,也在被称为两亲性脂质的组中。

[0048] 在一些实施方案中,两亲性物质包括卵磷脂、花生酱、杏仁黄油、大豆黄油或饼干黄油。在一些实施方案中,两亲性物质是向日葵卵磷脂。

[0049] 本文所述的两亲性物质的“有效量”是与不存在两亲性物质时益生菌的存活力相比响应于热能够增强益生菌的存活能力的量。在一些实施方案中,与缺乏有效量的两亲性物质的组合物相比,益生菌的生存能力增强至少约2倍。在一些实施方案中,生存能力增强至少约25%、50%、75%、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在一些实施方案中,与缺乏有效量的两亲性物质的组合物相比,生存能力增强至少约10倍。

[0050] 在一些实施方案中,两亲性物质与益生菌的比率(w/w)为约1:10至约25:1。在一些实施方案中,两亲性物质与益生菌的比率(w/w)为约1:1至约10:1。在一些实施方案中,两亲性物质与益生菌的比率(w/w)为约5:1。在一些实施方案中,两亲性物质与益生菌的比率(w/w)为约10:1。在一些实施方案中,两亲性物质的比率可以高于25:1。例如,在一些实施方案中,花生酱粉末和/或卵磷脂可以作为糖载体。在一些实施方案中,可以生产出达到1份益生菌对于25份卵磷脂或花生酱,但是这个比例可以和人们将益生菌与糖载体混合的意愿一样高。这意味着,一份益生菌可以与100份(或甚至更高)的卵磷脂或花生酱粉末混合而没有问题。

[0051] 在一些实施方案中,两亲性物质与益生菌混合为干燥粉末。在一些实施方案中,两亲性物质用作载体并且可以与益生菌和油组合,形成使益生菌更耐热例如干热处理或液体热处理(例如用于食物处理的巴氏灭菌法)的脂质膏。油没有特别限制,并可以包括食用油。在一些实施方案中,油可以包括来自植物来源的油诸如橄榄油、棕榈油、大豆油、鱼油、向日葵油、菜籽油(菜子油)、玉米油、花生油和其他植物油,以及基于动物的油,诸如黄油和猪油。在一些实施方案中,油是橄榄油。在一些实施方案中,两亲性物质与益生菌与油的比率(w/w)的范围为约1:10:0.1至约10:1:25。在一些实施方案中,两亲性物质与油的比率(w/w)为约1:0.5至约0.5:1。在一些实施方案中,两亲性物质与油的比率(w/w)为约1:1。

[0052] 热的性质不是必要限制性的,并可以包括干热、水蒸汽和液体热处理。液体加热意味着产品浸没在诸如水的热液体中,并且与液体一起进行热处理。

[0053] 在一些实施方案中,组合物受干热。干热处理可以在没有水和水蒸气的情况下施用烘箱或热板来完成。在一些实施方案中,加热可以在第一温度下开始并在所期望的第二温度下结束。在一些实施方案中,组合物在期望的温度下立即受干热而无需加热步骤。在一些实施方案中,干热的期望温度为至少50°C。在一些实施方案中,干热为至少约50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C、95°C或100°C。在一些实施方案中,干热的范围为65°C至100°C。该组合物也可以在第一温度下受干热一段时间,然后在一个或多个不同温度下暴露于一次或更多次热处理一段时间。

[0054] 暴露于热的持续时间没有特别限制。在一些实施方案中,组合物立即暴露于热,然后立即从热中移除。在一些实施方案中,组合物受热至少约1秒。在一些实施方案中,组合物

受热至少约1秒、2秒、3秒、4秒、5秒、6秒、7秒、8秒、9秒、10秒、20秒、30秒、40秒、50秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟或至少两个小时。在一些实施方案中,组合物受热至少约10分钟。在一些实施方案中,组合物在第一温度下受干热,接着在第二温度下受干热。在一些实施方案中,第一温度为约50℃至65℃,第二温度为约85℃或更高。在一些实施方案中,组合物在第一温度下受热至少约1秒至至少约2小时,并在第二温度下受热至少约1秒至至少约2小时。在一些实施方案中,组合物受第一温度过夜。在一些实施方案中,组合物受第二温度过夜。在一些实施方案中,组合物在第一温度下受热约30分钟,并在第二温度下受热约10分钟。在一些实施方案中,组合物在第一温度下受热约30分钟,并在第二温度下受热约30分钟。在一些实施例,在不同温度下的多次热处理的目的是确保对于第二温度处理样品处于适合的温度下,因为材料从室温加热到例如85℃可能需要一些时间。在一些实施方案中,组合物在65℃下预处理30分钟至过夜,然后转移至85℃持续所述处理时间以实现适合的温度的热处理。

[0055] 在一些实施方案中,组合物受液体热。在一些实施方案中,液体热为至少约50℃、51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃、90℃或95℃。在一些实施方案中,液体热为至少约50℃至65℃。在一些实施方案中,液体热的范围为约65℃至约95℃。在一些实施方案中,液体热为至少约70℃、75℃或80℃。在一些实施方案中,液体热为至少约81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃或95℃。

[0056] 在一些实施方案中,组合物立即暴露于液体热,然后立即从热中移除。在一些实施方案中,组合物受液体热至少约一秒。在一些实施方案中,组合物受液体热至少约1秒至约1小时。在一些实施方案中,组合物受液体热至少约1秒、2秒、3秒、4秒、5秒、6秒、7秒、8秒、9秒、10秒、20秒、30秒、40秒、50秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟或至少一个小时。在一些实施方案中,组合物受热至少约5分钟。在一些实施方案中,组合物受热至少约10分钟。

[0057] 在一些实施方案中,组合物与食品、药物或营养品产品接触并与这些产品一起受热。在一些实施方案中,将已加热的食品、药物或营养产品分配到包含所述组合物的容器或以其他方式与所述组合物组合。在一些实施方案中,在热处理后非常短暂地接触已经加热的食品、药物或营养产品,在将这些产品与益生菌组合物组合之前没有明显的冷却阶段。因此,在一些实施方案中,步骤ii)的使组合物受热的步骤包括使组合物与食品、药物或营养产品接触,其中食品、药物或营养产品在接触组合物之前已经先受热。在一些实施方案中,组合物将存在于其内分配有加热的食品、药物或营养产品的容器内。

[0058] 容器

[0059] 在一些实施方案中,本发明还提供适用于容纳食品、药物或营养产品的容器,所述食品、药物或营养产品包含如本文所述的组合物。在一些实施方案中,容器由包含玻璃、塑料、纸/纸箱、铝或干植物果壳的物质制成。如若它适合于容纳食品、药物或营养产品,容器的组成和形状不受限制。在一些实施方案中,容器涂覆有如本文所述的益生菌组合物。

[0060] 在一些实施方案中,容器涂覆有有效量的乳酸片球菌。在一些实施方案中,乳酸片

球菌是菌株NRRL B-50517。在一些实施方案中,将包含益生菌例如乳酸片球菌(包括菌株NRRL B-50517)和两亲性物质(例如本文提供的向日葵卵磷脂)的组合物涂覆在容器的表面或部分上。在一些实施方案中,容器还包含食品、营养或药物产品。在一些实施方案中,食品产品包括油,醋,酸奶,水果产品,苹果酱,乳制品,饮料,糖果,零食,果汁,或者用作甜点的食品如饼干、蛋糕、果冻、水果棒、水果奶油冻或提拉米苏。在一些实施方案中,将加热的食品、营养或药物产品分配到涂覆的容器中,接着密封容器。

#### [0061] 治疗方法

[0062] 根据非限制性实例实施方案,在一个方面,本发明提供治疗有需要的受试者中特征为炎症的疾病或病症的方法,包括向受试者施用有效量的乳酸片球菌益生菌。在一些实施方案中,向受试者施用如本文所述的组合物。在一些实施方案中,该组合物包括如本文所述的益生菌和两亲性物质。

[0063] 如本文所用,“治疗(treat)”及其所有形式和时态(包括例如“治疗(treating)”、“治疗(treated)”和“治疗(treatment)”)是指治疗性治疗。在本发明的某些方面,需要治疗的那些包括已经具有本发明的病理性疾病或状态(包括例如癌症)的那些,在这种情况下,治疗是指向受试者(包括例如,需要治疗的人或其它哺乳动物)施用治疗有效量的组合物,使得所述受试者在本发明病理状态的体征或症状方面具有改善。改善可以是任何可观察或可测量的改善。因此,本领域技术人员认识到治疗可以改善患者的病症,但可能不是该疾病或病理状态的完全治愈。

[0064] 本文中待治疗的受试者不是限制性的。在一些实施方案中,待治疗的受试者是哺乳动物、鸟类、爬行动物或鱼类。可以根据本发明治疗的哺乳动物包括但不限于人、狗、猫、马、小鼠、大鼠、豚鼠、绵羊、牛、猪、猴、猿等,其具有以炎症为特征的疾病或其他病理状态。术语“患者”和“受试者”可互换使用。在一些实施方案中,受试者是人。

[0065] 乳酸片球菌益生菌可以每天施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12次。在一些实施方案中,乳酸片球菌益生菌每天施用4次、每天施用2次或每天施用一次。在一些实施方案中,乳酸片球菌益生菌每2小时、每4小时、每6小时、每8小时、每10小时、每12小时或每24小时施用。在一些实施方案中,乳酸片球菌益生菌每天施用一次。

[0066] 乳酸片球菌益生菌的施用持续时间可以根据个体情况和要治疗的疾病或病症针对要治疗/施用的每个个体而变化。在一些实施方案中,乳酸片球菌益生菌可以在数天、数周、数月或数年的治疗期持续施用,或者可以间歇地施用,其中个体施用乳酸片球菌益生菌一段时间、接着一段时间内不治疗、然后一段时间内根据需要恢复治疗以治疗疾病或病症。例如,在一些实施方案中,待治疗的个体每天、每隔一天、每三天、每四天、每周2天、每周3天、每周4天、每周5天或每周7天施用本发明的乳酸片球菌益生菌。在一些实施方案中,向个体施用乳酸片球菌益生菌1周、2周、3周、4周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9月、10个月、11个月、1年或更长时间。

[0067] 在一些实施方案中,乳酸片球菌益生菌的施用使受试者的抗炎M2巨噬细胞的数量增加,从而治疗疾病或病症。在一些实施方案中,抗炎M2巨噬细胞相对于未治疗的水平增加约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约125%、约150%、约175%、约200%、约250%、约300%、约350%、约400%、或约450%、约500%、600%、约700%、约800%、约900%或约1000%或更多。

[0068] 在一些实施方案中,乳酸片球菌益生菌的施用使受试者的IL-10产生增加,从而治疗疾病或病症。在一些实施方案中,IL-10产生相对于未治疗的水平增加约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约125%、约150%、约175%、约200%、约250%、约300%、约350%、约400%、或约450%、约500%、600%、约700%、约800%、约900%或约1000%或更多。

[0069] 在一些实施方案中,乳酸片球菌益生菌的施用使受试者的IL-6和/或IL-23的水平降低,从而治疗疾病或病症。在一些实施方案中,IL-6和/或IL-23的水平相对于未治疗的水平降低约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约100%。

[0070] 在一些实施方案中,乳酸片球菌益生菌的施用使受试者的抗炎M2巨噬细胞的数量增加,同时使IL-10的产生增加,并任选地降低受试者的IL-6和/或IL-23。

[0071] 在一些实施方案中,以炎症为特征的疾病或病症选自:恶性肿瘤(癌症)、关节炎、心血管疾病、肝炎、感染、伤口愈合、胰腺炎、胃食管返流疾病、糖尿病、炎症性肠病、消化性溃疡、支气管炎、胆囊炎、阑尾炎、滑囊炎、皮炎、哮喘、自身免疫性疾病、盆腔炎、痛风、创伤、异物感染、烧伤、牙科工作、肌腱炎、鼻炎、粘膜炎,以及暴露于诸如化学物质和酒精的毒素。

[0072] 如本文所用,“癌症”是指病理生理学状态,其中细胞的特征在于失调和/或增殖性的细胞生长和诱导所述生长的能力,包括但不限于:癌和肉瘤,例如,诸如,急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、肾上腺皮质癌、AIDS相关癌症、AIDS相关淋巴瘤、肛门癌、星形细胞瘤(包括,例如,小脑星形细胞瘤和大脑星形细胞瘤)、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑干胶质瘤、脑肿瘤(包括,例如,室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层、视觉通路和下丘脑胶质瘤)、脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤、乳腺癌、支气管腺瘤/类癌、伯基特淋巴瘤、类癌瘤(包括,例如,胃肠道类癌瘤)、未知原发部位癌、中枢神经系统淋巴瘤、宫颈癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性骨髓增生性疾病、结肠癌、结直肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤文氏肿瘤家族、肝外胆管癌、眼癌(包括,例如,眼内黑色素瘤,视网膜母细胞瘤)、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞瘤(包括,例如,颅内生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞瘤、卵巢生殖细胞瘤)、妊娠滋养细胞瘤、胶质瘤、毛细胞白血病、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、胰岛细胞癌(包括,例如,内分泌胰腺癌)、卡波西氏肉瘤、喉癌、白血病、唇癌和口腔癌、肝癌、肺癌(包括,例如,非小细胞肺癌)、淋巴瘤、巨球蛋白血症、骨/骨肉瘤恶性纤维组织细胞瘤、黑色素瘤、梅克尔(Merkel)细胞癌、间皮瘤、原发隐匿性转移性颈部鳞状癌、口腔癌(mouth cancer)、多发性内分泌瘤综合征、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、蕈样真菌病、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、骨髓瘤、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌(oral cancer)、口腔癌(oral cavity cancer)、骨肉瘤、口咽癌、卵巢癌(包括,例如,卵巢上皮癌、生殖细胞瘤)、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体瘤、浆细胞肿瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、妊娠和乳腺癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、软组织肉瘤、子宫肉瘤、塞扎里(Sézary)综合征、皮肤癌(包括,例如,非黑色素瘤或黑色素瘤)、小肠癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、T细胞淋巴瘤、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤(thymoma, thymoma, thymic

carcinoma)、甲状腺癌、肾盂和输尿管的移行细胞癌、滋养细胞瘤(包括,例如,妊娠期滋养细胞瘤)、儿童和成人的罕见癌症、尿道癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、阴道癌、病毒诱发的癌症(包括,例如,HPV诱发的癌症)、外阴癌、Waldenstrom巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、维尔姆斯肿瘤(Wilms'Tumor)和女性癌症。

[0073] 可以根据本发明使用的乳酸片球菌益生菌不是限制性的。在一些实施方案中,乳酸片球菌是在65℃以上存活的、能够在需氧和厌氧条件下以及在1至6.2的pH范围内生长的菌株。在一些实施方案中,乳酸片球菌是保藏在农业研究院(ARS)专利培养物保藏中心的菌株NRRL B-50517。菌株NRRL B-50517描述于美国申请第13/676,579号中,其通过引用并入本文。

[0074] 在一些实施方案中,可以针对对高温、低pH值以及需氧和厌氧条件具有耐受性来选择用于本发明的乳酸片球菌。

[0075] 根据本发明的治疗方法,向受试者施用“治疗有效量”或“有效量”。如本文所用,“治疗有效量”或“有效量”是足以降低、抑制或改善与疾病或病症相关的一种或更多种症状的量。在一些实施方案中,受试者被施用大于 $1.0 \times 10^9$ cfu的益生菌。在一些实施方案中,受试者被施用大于 $4.0 \times 10^9$ cfu的益生菌。

[0076] 在一些实施方案中,受试者被施用一种或更多种附加的治疗剂。在一些实施方案中,一种或更多种附加的治疗剂是通常用于治疗以炎症为特征的疾病或病症的那些。

[0077] 在一些实施方案中,与抗炎药联合施用给受试者。在一些实施方案中,施用的乳酸片球菌和抗炎药协同作用。在一些实施方案中,抗炎药是非甾体抗炎药(NSAID)。在一些实施方案中,抗炎药选自:安他唑啉(Antazoline)、巴柳氮(Balsalazide)、倍氯米松(Beclometasone)、倍他米松(Betamethasone)、布地奈德(Budesonide)、塞来昔布(Celecoxib)、秋水仙碱(Colchicine)、地夫可特(Deflazacort)、地塞米松(Dexamethasone)、右旋布洛芬(Dexibuprofen)、双氯芬酸(Diclofenac)、依那西普(Etanercept)、依托度酸(Etodolac)、联苯乙酸(Felbinac)、非诺洛芬(Fenoprofen)、氟米松(Flumetasone)、氟米龙(Fluorometholone)、氟比洛芬(Flurbiprofen)、氟替卡松(Fluticasone)、庆大霉素(Gentamicin)、氢化可的松(Hydrocortisone)、布洛芬(Ibuprofen)、吲哚美辛(Indometacin)、酮洛芬(Ketoprofen)、氯替泼诺(Loteprednol)、甲芬那酸(Mefenamic acid)、美洛昔康(Meloxicam)、美沙拉嗪(Mesalazine)、甲基强的松龙(Methylprednisolone)、莫米松(Mometasone)、纳布美通(Nabumetone)、萘普生(Naproxen)、奈帕芬胺(Nepafenac)、奥沙拉嗪(Olsalazine)、泼尼松龙(Prednisolone)、利美索龙(Rimexolone)、柳氮磺胺吡啶(Sulfasalazine)、舒林酸(Sulindac)、替诺昔康(Tenoxicam)、噻洛芬酸(Tiaprofenic acid)、曲安奈酮(Triamcinolone),及其组合。

[0078] 在一些实施方案中,一种更或多种抗癌剂和/或放疗与乳酸片球菌益生菌组合施用给受试者以治疗受试者的癌症。

[0079] 在一些实施方案中,抗癌剂选自:乙酸阿比特龙(Abiraterone Acetate)、阿维哌酯(Abitrexate)(甲氨蝶呤(Methotrexate))、白蛋白结合型紫杉醇(Abraxane)(紫杉醇白蛋白稳定的纳米颗粒制剂(Paclitaxel Albumin-stabilized Nanoparticle Formulation))、ABVD、ABVE、ABVE-PC、AC、AC-T、Adcetris(本妥昔单抗(Brentuximab Vedotin))、ADE、Ado-曲妥珠单抗(Ado-Trastuzumab Emtansine)、阿霉素(Adriamycin)(盐

酸多柔比星(Doxorubicin Hydrochloride))、氟尿嘧啶(Adrucil)(氟二氧嘧啶(Fluorouracil))、马来酸阿法替尼(Afatinib Dimaleate)、癌伏妥(Afinitor)(依维莫司(Everolimus))、艾特乐(Aldara)(咪喹莫特(Imiquimod))、阿地白介素(Aldesleukin)、阿伦单抗(Alemtuzumab)、爱宁达(Alimta)(培美曲塞二钠(Pemetrexed Disodium))、阿乐喜(Aloxi)(盐酸帕洛诺司琼(Palonosetron Hydrochloride))、Ambochlorin(苯丁酸氮芥(Chlorambucil))、氨基乙酰丙酸(Aminolevulinic Acid)、阿那曲唑(Anastrozole)、阿瑞吡坦(Aprepitant)、阿可达(Aredia)(帕米膦酸二钠(Pamidronate Disodium))、瑞宁得(Arimidex)(阿那曲唑(Anastrozole))、阿诺新(Aromasin)(依西美坦(Exemestane))、奈拉滨(Arranon,Nelarabine)、三氧化二砷、奥法木单抗(Arzerra,Ofatumumab)、门冬酰胺酶菊欧文氏菌(Asparaginase Erwinia chrysanthemi)、阿瓦斯丁(Avastin)(贝伐单抗(Bevacizumab))、阿西替尼(Axitinib)、阿扎胞苷(Azacitidine)、BEACOPP、卡氮芥(Becenum)(卡莫司汀(Carmustine))、贝利司他(Beleodaq,Belinostat)、盐酸苯达莫司汀(Bendamustine Hydrochloride)、BEP、贝伐单抗、贝沙罗汀(Bexarotene)、贝克沙(Bexxar)(托西莫单抗(Tositumomab)和I 131碘托西莫单抗(I 131Iodine Tositumomab))、比卡鲁胺(Bicalutamide)、BiCNU(卡莫司汀(Carmustine))、博来霉素(Bleomycin)、博纳吐单抗(Blinicyto,Blinatumomab)、硼替咪唑(Bortezomib)、博舒替尼(Bosulif,Bosutinib)、本妥昔单抗(Brentuximab Vedotin)、白消安(Busulfan)、白舒非(Busulfex,Busulfan)、卡巴他赛(Cabazitaxel)、苹果酸卡博替尼(Cabozantinib-S-Malate)、CAF、阿伦单抗(Campath)(阿伦珠单抗(Alemtuzumab))、开普拓(Camptosar)(伊立替康盐酸盐(Irinotecan Hydrochloride))、卡培他滨(Capecitabine)、CAPOX、卡铂(Carboplatin)、卡铂-紫杉醇、卡非佐咪(Carfilzomib)、卡莫司汀(Carmubris,Carmustine)、卡莫司汀植入剂(Carmustine Implant)、康士得(Casodex)(比卡鲁胺(Bicalutamide))、CeeNU(洛莫司汀(Lomustine))、色瑞替尼(Ceritinib)、柔红霉素(Cerubidine)(盐酸柔红霉素(Daunorubicin Hydrochloride))、希瑞适(Cervarix)(重组HPV二价疫苗(Recombinant HPV Bivalent Vaccine))、西妥昔单抗、苯丁酸氮芥、氯苄嘧啶、CHOP、顺铂、Clafen(环磷酰胺)、氯法拉滨(Clofarex,Clofarabine,Clofar)、CMF、苹果酸卡博替尼(Cabozantinib-S-Malate)、COPP、COPP-ABV、更生霉素(Cosmegen,Dactinomycin)、克唑替尼(Crizotinib)、CVP、环磷酰胺(Cyclophosphamide)、Cyfos(异环磷酰胺)、雷莫芦单抗(Cyramza,Ramucirumab)、阿糖胞苷(Cytarabine,Cytarabine)、脂质体、阿糖胞苷-U(阿糖胞苷)、环磷酰胺(Cytoxan)(环磷酰胺(Cyclophosphamide))、达拉菲尼(Dabrafenib)、达卡巴嗪(Dacarbazine)、达克金(Dacogen)(地西他滨(Decitabine))、放线菌素D(Dactinomycin)、达沙替尼、盐酸柔红霉素、地西他滨、地加瑞克(Degarelix)、地尼白介素(Denileukin Diftitox)、狄诺塞麦(Denosumab)、DepoCyt(脂质体阿糖胞苷(Liposomal Cytarabine))、DepoFoam(脂质体阿糖胞苷)、盐酸右雷佐生(Dexrazoxane Hydrochloride)、多西紫杉醇(Docetaxel)、阿霉素脂质体(Doxil)(盐酸多柔比星脂质体(Doxorubicin Hydrochloride Liposome))、盐酸多柔比星、盐酸阿霉素脂质体、Dox-SL(盐酸多柔比星脂质体)、DTIC-Dome(达卡巴嗪)、氟尿嘧啶(氟二氧嘧啶)、埃立特(Elitek)(拉布立酶(Rasburicase))、表阿霉素(Ellence)(盐酸表柔比星(Epirubicin Hydrochloride))、乐沙定(Eloxatin)(奥沙利铂(Oxaliplatin))、艾曲波帕胺(Eltrombopag Olamine)、Emend(阿瑞匹坦(Aprepitant))、恩杂鲁胺

(Enzalutamide)、盐酸表柔比星、EPOCH、爱必妥(Erbitux)(西妥昔单抗(Cetuximab))、甲磺酸艾日布林(Eribulin Mesylate)、维莫德吉(Erivedge,Vismodegib)、盐酸厄洛替尼(Erlotinib Hydrochloride)、门冬酰胺酶(Erwinaze)(天冬酰胺酶菊欧文氏菌(Asparaginase Erwinia chrysanthemi))、依托泊苷(Etopophos)(磷酸依托泊苷(Etoposide Phosphate))、依托泊苷、依托泊苷磷酸盐、阿霉素脂质体(Evacet)(盐酸多柔比星脂质体)、依维莫司、雷洛替芬(Evista)(盐酸雷洛替芬(Raloxifene Hydrochloride))、依西美坦(Exemestane)、法乐通(Fareston)(托瑞米芬(Toremifene))、氟维司群(Faslodex,Fulvestrant)、FEC、弗隆(Femara)(来曲唑(Letrozole))、非格司亭(Filgrastim)、氟达拉滨(Fludara)(氟达拉滨磷酸盐)、氟达拉滨磷酸盐、氟尿嘧啶(氟二氧嘧啶)、氟尿嘧啶、黄菲林(Folex)(甲氨蝶呤(Methotrexate))、黄菲林PFS(甲氨蝶呤)、伊立替康(FOLFIRI)、伊立替康-贝伐单抗、伊立替康-西妥昔单抗、FOLFIRINOX、FOLFOX、Folotyn(普拉曲沙(Pralatrexate))、FU-LV、氟维司群(Fulvestrant)、加德西(Gardasil)(重组HPV四价疫苗)、加德西9(重组HPV九价疫苗)、Gazyva(阿托珠单抗(Obinutuzumab))、吉非替尼(Gefitinib)、盐酸吉西他滨(Gemcitabine Hydrochloride)、吉西他滨-顺铂、吉西他滨-奥沙利铂、吉妥单抗奥唑米星(Gemtuzumab Ozogamicin)、健择(Gemzar)(盐酸吉西他滨)、阿法替尼(马来酸阿法替尼)、格列卫(Gleevec)(甲磺酸伊马替尼(Imatinib Mesylate))、Gliadel(卡莫司汀植入剂)、卡莫司汀植入剂膜剂(Gliadel wafer)(卡莫司汀植入剂)、羧肽酶(Glucarpidase)、醋酸戈舍瑞林(Goserelin Acetate)、Halaven(甲磺酸艾日布林(Eribulin Mesylate))、赫塞汀(Herceptin)(曲妥珠单抗(Trastuzumab))、重组HPV二价疫苗、重组HPV九价疫苗、重组HPV四价疫苗、拓扑替康(Hycamtin)(拓扑替康盐酸盐(Topotecan Hydrochloride))、Hyper-CVAD、Ibrance(帕博西尼(Palbociclib))、替伊莫单抗(Ibritumomab Tiuxetan)、伊鲁替尼(Ibrutinib)、ICE、普纳替尼(Iclusig)(盐酸普纳替尼(Ponatinib Hydrochloride))、伊达比星(Idamycin)(盐酸伊达比星)、盐酸伊达比星、艾代拉利司(Idelalisib)、异环磷酰胺(Ifex,Ifosfamide)、异环磷酰胺(Ifosfamidum, Ifosfamide)、甲磺酸伊马替尼、依鲁替尼、咪喹莫特(Imiquimod)、阿西替尼(Inlyta, Axitinib)、内含子A(Intron A)(重组干扰素 $\alpha$ -2b)、碘131托西莫单抗和托西莫单抗、伊匹单抗(Ipilimumab)、易瑞沙(Iressa)(吉非替尼)、盐酸伊立替康、罗米地辛(Istodax, Romidepsin)、伊沙匹隆(Ixempra,Ixabepilone)、Jakafi(磷酸鲁索替尼(Ruxolitinib Phosphate))、卡巴他赛(Jevtana,Cabazitaxel)、曲妥珠单抗(曲妥珠单抗-美坦新偶联物(Ado-Trastuzumab Emtansine))、Keoxifene(盐酸雷洛替芬)、帕利夫明(Kepivance, Palifermin)、齐内达(Keytruda)(帕博利珠单抗(Pembrolizumab))、卡非佐咪(Kyprolis, Carfilzomib)、醋酸兰瑞肽(Lanreotide Acetate)、二磺酸拉帕替尼(Lapatinib Ditosylate)、来那度胺(Lenalidomide)、甲磺酸乐伐替尼(Lenvatinib Mesylate)、Lenvima(甲磺酸乐伐替尼)、来曲唑(Letrozole)、甲酰四氢叶酸钙(Leucovorin Calcium)、瘤可宁(Leukeran)(苯丁酸氮芥(Chlorambucil))、醋酸亮丙瑞林(Leuprolide Acetate)、Levulan(氨基乙酰丙酸)、Linfolizin(苯丁酸氮芥)、LipoDox(盐酸多柔比星脂质体)、脂质体阿糖胞苷、洛莫司汀、Lupron(醋酸亮丙瑞林)、Lupron Depot(醋酸亮丙瑞林)、Lupron Depot-Ped(醋酸亮丙瑞林)、Lupron Depot-3月(醋酸亮丙瑞林)、Lupron Depot-4月(醋酸亮丙瑞林)、奥拉帕尼(Lynparza,Olaparib)、Marqibo(长春新碱硫酸盐脂质体)、Matulane



(盐酸甲基苄胍)、盐酸氮芥 (Mechlorethamine Hydrochloride)、美可治 (Megace) (醋酸甲地孕酮 (Megestrol Acetate))、醋酸甲地孕酮、Mekinist (曲美替尼 (Trametinib))、巯嘌呤 (Mercaptopurine)、美司钠 (Mesna)、美司那 (美司钠)、Methazolastone (替莫唑胺 (Temozolomide))、甲氨蝶呤、甲氨蝶呤LPF (甲氨蝶呤)、Mexate (甲氨蝶呤)、Mexate-AQ (甲氨蝶呤)、丝裂霉素C (Mitomycin C)、盐酸米托蒽醌 (Mitoxantrone Hydrochloride)、Mitozytrex (丝裂霉素C)、MOPP、Mozobil (普乐沙福 (Plerixafor))、Mustargen (盐酸氮芥 (Mechlorethamine Hydrochloride))、密吐霉素 (Mutamycin) (丝裂霉素C (Mitomycin C))、马勒兰 (Myleran) (白消安)、Mylosar (阿扎胞苷)、Mylotarg (吉妥单抗奥唑米星)、紫杉醇纳米颗粒 (紫杉醇白蛋白稳定化的纳米颗粒制剂)、诺维本 (Navelbine) (酒石酸长春瑞滨)、奈拉滨、Neosar (环磷酰胺)、Neupogen (非格司亭)、多吉美 (Nexavar) (对甲苯磺酸索拉非尼 (Sorafenib Tosylate))、尼罗替尼 (Nilotinib)、Nivolumab (纳武单抗)、Nolvadex (柠檬酸他莫昔芬 (Tamoxifen Citrate))、Nplate (罗米司亭 (Romiplostim))、奥滨尤妥珠单抗 (Obinutuzumab)、OEPA、奥法木单抗、OFF、奥拉帕尼、高三尖杉酯碱 (Omacetaxine Mepesuccinate)、Oncaspar (培加帕酶 (Pegaspargase))、Ontak (地尼白介素)、Opdivo (纳武单抗)、OPPA、奥沙利铂、紫杉醇、紫杉醇白蛋白稳定化的纳米颗粒制剂、PAD、帕博西尼、帕利夫明、盐酸帕罗诺司琼 (Palonosetron Hydrochloride)、帕米膦酸二钠 (Pamidronate Disodium)、帕尼单抗 (Panitumumab)、Paraplat (卡铂)、卡波铂 (Paraplatin) (卡铂)、盐酸帕唑帕尼 (Pazopanib Hydrochloride)、培加帕酶、PEG-内含子 (聚乙二醇干扰素 $\alpha$ -2b (Peginterferon Alfa-2b))、派姆单抗、培美曲塞二钠、帕罗嘉 (Perjeta) (帕妥珠单抗 (Pertuzumab))、帕妥珠单抗、Platinol (顺铂)、Platinol-AQ (顺铂)、普乐沙福、泊马度胺 (Pomalidomide)、Pomalyst (泊马度胺)、盐酸普纳替尼、普拉曲沙、强的松 (Prednisone)、盐酸甲基苄胍、Proleukin (阿地白介素)、Prolia (地诺单抗 (Denosumab))、艾曲波帕 (Promacta) (艾曲波帕乙醇胺 (Eltrombopag Olamine))、普列威 (Provenge, Sipuleucel-T)、巯基嘌呤 (Purinethol) (巯嘌呤)、Purixan (巯嘌呤)、镭233二氯化物、盐酸雷洛昔芬、雷莫芦单抗、拉布立酶、R-CHOP、R-CVP、重组人乳头瘤病毒 (HPV) 二价疫苗、重组人乳头瘤病毒 (HPV) 九价疫苗、重组人乳头瘤病毒 (HPV) 四价疫苗、重组干扰素 $\alpha$ -2b、瑞格非尼 (Regorafenib)、R-EPOCH、Revlimid (来那度胺 (Lenalidomide))、Rheumatrex (甲氨蝶呤)、美罗华 (Rituxan) (利妥昔单抗 (Rituximab))、利妥昔单抗、罗米地辛 (Romidepsin)、罗米司亭、红比霉素 (Rubidomycin) (盐酸柔红霉素)、磷酸鲁索替尼、司兰索 (Sclerosol) 胸膜内气雾剂 (滑石粉)、西妥西单抗 (Siltuximab)、Sipuleucel-T、醋酸兰瑞肽长效注射剂 (Somatuline Depot) (醋酸兰瑞肽)、对甲苯磺酸索拉非尼、施达赛 (Sprycel) (达沙替尼)、STANFORD V、无菌滑石粉 (滑石粉)、Steritalc (滑石粉)、Stivarga (瑞戈非尼 (Regorafenib))、苹果酸舒尼替尼 (Sunitinib Malate)、索坦 (Sutent) (苹果酸舒尼替尼)、Sylatron (聚乙二醇干扰素 $\alpha$ -2b)、Sylvant (Siltuximab)、昔诺韦 (Synovir) (萨力多胺 (Thalidomide))、Synribo (高三尖杉酯碱)、TAC、Tafinlar (达拉非尼 (Dabrafenib))、滑石粉、柠檬酸他莫昔芬、Tarabine PFS (阿糖胞苷)、特罗凯 (Tarceva) (盐酸厄洛替尼)、蓓萨罗丁 (Targretin) (贝沙罗汀)、达西纳 (Tasigna) (尼罗替尼)、紫杉醇 (Taxol) (紫杉醇 (Paclitaxel))、泰索帝 (Taxotere) (多西他赛 (Docetaxel))、Temodar (替莫唑胺 (Temozolomide))、替莫唑胺、西罗莫司 (Temsirrolimus)、沙利度胺 (Thalidomide)、撒利多

迈 (Thalomid) (沙利度胺)、噻替哌 (Thiotepa)、拓扑杀 (Toposar) (依托泊苷)、盐酸拓扑替康 (Topotecan Hydrochloride)、托瑞米芬 (Toremifene)、馱瑞赛尔 (Torisel) (替西罗莫司 (Temsilrolimus))、托西莫单抗和I 131碘托西莫单抗、Totect (盐酸右雷佐生 (Dexrazoxane Hydrochloride))、TPF、曲美替尼、曲妥珠单抗、苯达莫司汀 (Treanda) (盐酸苯达莫司汀 (Bendamustine Hydrochloride))、三氧二砷 (Trisenox) (三氧化二砷)、泰立沙 (Tykerb) (二甲苯磺酸拉帕替尼 (Lapatinib Ditosylate))、凡德他尼 (Vandetanib)、VAMP、维克替比 (Vectibix) (帕尼单抗)、VeIP、长春碱 (Velban) (硫酸长春碱 (Vinblastine Sulfate))、万珂 (Velcade) (硼替佐米 (Bortezomib))、Velsar (硫酸长春碱)、维莫非尼 (Vemurafenib)、泛必治 (VePesid) (依托泊苷)、Viadur (醋酸亮丙瑞林)、维达莎 (Vidaza) (阿扎胞苷)、硫酸长春碱、Vincasar PFS (硫酸长春新碱)、硫酸长春新碱、硫酸长春新碱脂质体、酒石酸长春瑞滨、VIP、维莫德吉、羧肽酶 (Vorinostat, Glucarpidase)、帕唑帕尼 (Votrient) (盐酸帕唑帕尼)、亚叶酸 (Wellcovorin) (甲酰四氢叶酸钙盐 (Leucovorin Calcium))、赛可瑞 (Xalkori) (克唑替尼)、希罗达 (Xeloda) (卡培他滨 (Capecitabine))、XELIRI、Xgeva (地诺单抗)、Xofigo (镭233二氯)、Xtandi (恩杂鲁胺)、Yervoy (伊匹单抗 (Ipilimumab))、Zaltrap (阿柏西普 (Ziv-Aflibercept))、Zelboraf (威罗非尼 (Vemurafenib))、泽瓦林 (Zevalin) (替伊莫单抗 (Ibritumomab Tiuxetan))、Zinecard (盐酸右雷佐生)、阿柏西普 (Ziv-Aflibercept)、诺雷得 (Zoladex) (醋酸戈舍瑞林)、唑来膦酸 (Zoledronic Acid)、伏立诺他 (Zolinza, Vorinostat)、择泰 (Zometa) (唑来膦酸)、Zydelig (艾代拉利司 (Idelalisib))、Zykadia (色瑞替尼 (Ceritinib)) 和 Zytiga (醋酸阿比特龙 (Abiraterone Acetate))。在一些实施方案中, 药物选自: 紫杉醇、姜黄素、多西紫杉醇、伊沙匹隆、长春碱、秋水仙碱、Y-27632 法舒地尔、SU6656 达沙替尼、HDAC 抑制剂、ROCK 抑制剂、小白菊内酯 (Parthenolide)、木香烃内酯 (Costunolide) 和 ML-7 Jazplakinolide。

[0080] 在一些实施方案中, 受试者不被施用另一种治疗剂, 而被施用由乳酸片球菌益生菌组成或基本上由其组成的组合物, 可选地与两亲性物质和/或食品混合。

[0081] 在一些实施方案中, 受试者被施用一种或更多种附加的益生菌。在一些实施方案中, 不被施用另一种益生菌。

[0082] 组合物

[0083] 在一些实施方案中, 本发明提供一种包含乳酸片球菌益生菌的组合物。在一些实施方案中, 该组合物包含乳酸片球菌 NRRL B-50517。在一些实施方案中, 该组合物包含有效量的乳酸片球菌 (包括乳酸片球菌 NRRL B-50517)。在一些实施方案中, 本发明提供一种包含乳酸片球菌益生菌与有效量的两亲性物质和任选的如本文所述的油的混合物的组合物。在一些实施方案中, 该组合物包含与乳酸片球菌益生菌和有效量的两亲性物质和任选的油的混合物组合的食品、药物或营养产品。

[0084] 在一些实施方案中, 该组合物是药物组合物。在一些实施方案中, 该组合物是包含有效量的能够治疗一种或更多种以炎症为特征的疾病或病症的乳酸片球菌 (包括乳酸片球菌 NRRL B-50517) 的药物组合物。在一些实施方案中, 该组合物是包含有效量的乳酸片球菌 (包括乳酸片球菌 NRRL B-50517, 并且能够治疗一种或更多种以炎症为特征的疾病或病症) 与有效量的两亲性物质和任选的油的混合物的药物组合物。

[0085] 在一些实施方案中, 该药物组合物包含一种或更多种药学上可接受的载体或赋形

剂。药学上可接受的载体和赋形剂是与制剂中的其他成分相容并且是生物学上可接受的那些。乳酸片球菌可以与药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂组合提供。合适的载体、赋形剂和/或稀释剂包括但不限于：制药级淀粉、甘露醇、乳糖、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖(或其他糖)、碳酸镁、明胶、油、醇、洗涤剂、乳化剂或水(最好是无菌的)。该组合物可以是组合物的混合制剂，或者可以是用于同时、分开或顺序使用(包括施用)的组合制剂。乳酸片球菌也可以小袋施用，其必须加入一杯水然后饮用。

[0086] 在一些实施方案中，该组合物适合口服施用。在一些实施方案中，该组合物是片剂、胶囊剂、丸剂、糖衣丸、悬浮液、锭剂、乳液、水溶液、液体、凝胶或糖浆。在一些实施方案中，该组合物可以以功能性食品和/或饮料的形式以及以各种补充剂的形式递送。

[0087] 适于口服施用的本发明的制剂可以作为离散单位存在，例如胶囊剂、扁囊剂或片剂，每个含有预定量的乳酸片球菌；作为粉末或颗粒存在，在一些实施方案中，其可以是可润湿的、喷雾干燥的或冷冻干燥的；作为水性或非水性液体中的溶液或悬浮液存在；或作为水包油液体乳液或油包水液体乳液存在。

[0088] 在一些实施方案中，片剂可以通过压缩或模压制备，任选地含有一种或更多种辅助成分。压缩片剂可以通过在合适的机器中压缩任选地与粘合剂(例如，聚维酮、明胶、羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如，淀粉羟乙酸钠、交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂混合、处于自由流动形式的活性成分如粉末或颗粒来制备。模压片剂可以通过在合适的机器中模压用惰性液体稀释剂润湿的粉末化合物的混合物来制备。片剂可以任选地被包衣或刻痕，并且可以配制成使其中的活性成分缓慢或控制释放，例如使用不同比例的羟丙基甲基纤维素以提供所需的释放曲线。片剂可任选地具有肠溶包衣，以提供在除胃之外的肠道部分中的释放。

[0089] 在一些实施方案中，该组合物包含以下一种或更多种：片剂、丸剂、胶囊剂、胚珠(ovules)、溶液或悬浮液，其可以含有调味剂或着色剂，用于速释、迟释、调释、缓释、脉冲释放或控释应用。

[0090] 对于水性悬浮液和/或酏剂，本发明的组合物可以与各种甜味剂或调味剂、着色剂或色素，与乳化剂和/或悬浮剂以及与稀释剂如水、丙二醇和甘油，以及它们组合组合。

[0091] 在一些实施方案中，为了便于施用和剂量均匀，本发明的组合物以单位剂量形式配制。如本文所用的术语“单位剂量形式”是指适合于待治疗个体的单位剂量的物理上离散的单位。在一些实施方案中，组合物被配制成离散的剂量单位，每个剂量单位含有经计算可与所需药物的载体结合产生所需效果的预定的“单位用量”或“单位剂量”的一种或更多种活性化合物。

[0092] 在一些实施方案中，该组合物包含明胶胶囊。在一些实施方案中，明胶胶囊包含有效量的乳酸片球菌NRRL B-50517发酵培养物和桃果粉，剂量为约10至40亿CFU。

[0093] 虽然根据本发明可以单独施用乳酸片球菌，但是乳酸片球菌通常作为产品的一部分辅助施用，特别是作为食物产品、膳食补充剂或药物制剂的组分。这些产品通常含有本领域技术人员熟知的其他组分。在一个实施方案中，该组合物包含乳酸片球菌益生菌与有效量的两亲性物质的混合物和任选的油的混合。

[0094] 在一个实施方案中，乳酸片球菌根据本发明用于食物产品中，例如食品补充剂、饮料或基于牛奶的粉末。这里，术语“食物”在广义上使用-包括人类食物以及动物食物(即饲

料)。在一个实施方案中,食物供人食用。

[0095] 根据使用和/或应用方式和/或施用方式,食物可以是溶液形式或固体形式。

[0096] 当用作食品(例如功能性食品)或用于制备食品时,本发明的组合物可以与以下中的一种或更多种结合使用:营养上可接受的载体、营养上可接受的稀释剂、营养上可接受的赋形剂、营养上可接受的佐剂、营养上可接受的活性成分。

[0097] 举例来说,本发明的组合物可用作以下中的成分:软饮料、果汁或饮料,包括乳清蛋白、保健茶、可可饮料、牛奶饮料、酸奶和饮用酸奶;奶酪,冰淇淋,水冰和甜点,糖果,饼干蛋糕和蛋糕混合物,休闲食品,均衡食品和饮料,水果馅料,保护上光料,巧克力面包馅,奶酪蛋糕风味馅,水果风味蛋糕馅,蛋糕和甜甜圈糖,即食烘焙馅霜,饼干馅料,即食面包馅,低卡路里灌装,成人营养饮料,酸化大豆/果汁饮料,无菌/蒸馏巧克力饮料,条状混合物,饮料粉,钙强化大豆/普通和巧克力牛奶,钙强化咖啡饮料。

[0098] 该组合物可进一步用作食物产品中的成分,例如美国奶酪酱,用于磨碎和切碎的奶酪的防结块剂,薯片蘸料,奶油奶酪,干拌植脂鲜奶油无脂酸奶油,冷冻/解冻乳制鲜奶油,冷冻/解冻稳定鲜奶油,低脂肪和轻质天然切达干酪,低脂瑞士风味酸奶,充气冷冻甜点,硬包装冰淇淋,标签了友好、改善经济和享受的硬包装冰淇淋,低脂冰淇淋:霜淇淋,烧烤酱,奶酪酱,干酪酱,干混阿尔弗雷多酱,混合奶酪酱,干拌番茄酱等。

[0099] 如本文所用的术语“乳制品”意在包括含有动物和/或植物来源的乳的媒质。作为动物来源的乳,可以提到牛奶、羊奶、山羊奶或水牛(buffalo)奶。作为植物来源的乳,可以提到任何可以根据本发明使用的植物来源的发酵物质,特别是源自大豆、大米或谷物的发酵物质。

[0100] 在一些实施方案中,根据本发明使用的食物产品是发酵乳或人源化乳。

[0101] 在一些实施方案中,该组合物可以与酸奶产品结合使用,例如发酵的酸奶饮料、酸奶、饮用酸奶、奶酪、发酵奶油、基于乳的甜点等。

[0102] 合适地,该组合物可进一步用作一种或更多种奶酪应用、肉类应用或包含保护性培养物的应用中的成分。

[0103] 本发明还提供了制备一种食物或食物成分的方法,该方法包括将根据本发明的组合物与另一种食物成分混合。

[0104] 在一些实施方案中,本发明涉及已与本发明的组合物(和任选地与其他组分/成分)接触的产品,其中该组合物以能够改善产品的营养和/或健康益处的量使用。

[0105] 如本文所用,术语“接触”是指本发明的组合物间接或直接应用于产品。可以使用的应用方法的实例包括但不限于,在包含该组合物的材料中处理产品,通过将该组合物与产品混合来直接应用,将该组合物喷到产品表面上或将产品浸入到组合物的配置品中。

[0106] 当本发明的产品是食料时,本发明的组合物优选与产品混合。或者,组合物可以包含在食料的乳液或原料中。在另一个替代方案中,该组合物可以作为调味料、上光料、着色剂混合物等。

[0107] 对于一些应用,重要的是组合物可应用在待作用/处理的产品的表面上或应用到其表面上。这允许组合物具有一种或更多种以下有利特征:营养和/或健康益处。

[0108] 本发明的组合物可以用于散布、涂覆和/或浸渍具有受控量的活微生物的产品。

[0109] 在一些实施方案中,该组合物用于具有蔗糖和/或麦芽糖的发酵乳或蔗糖强化乳

或乳酸媒质,其中含有组合物的所有组分(即,根据本发明的所述微生物)的组合媒质可以作为成分以合适的浓度添加到酸奶中,从而例如在最终产品中提供 $10^6$ – $10^{10}$ cfu的日剂量的浓度。根据本发明的微生物可以在酸奶发酵之前或之后使用。

[0110] 在一些方面,根据本发明的微生物用作或用于制备动物饲料,例如家畜饲料,特别是家禽(例如鸡)饲料、宠物食品或宠物零食。

[0111] 在一些实施方案中,当产品是食物产品时,乳酸片球菌应该直至正常的“销售期限”或“截止日期”都保持有效,在此期间,该食物食品由零售商提供销售。优选地,有效时间应该延长超过这些日期,直到食物腐败变得明显的正常新鲜期结束。所需的时间长度和正常的保质期将会根据不同的食料而变化,并且本领域普通技术人员将认识到保质期将根据食料的类型、食料的大小、储存温度、加工条件、包装材料和包装设备而变化。

[0112] 在一些实施方案中,本发明的组合物可以用作食物成分和/或饲料成分。如本文所用,术语“食物成分”或“饲料成分”包括是或可作为营养补充剂添加到功能性食品或食料中的配方。食物成分可以是溶液形式或固体形式,取决于使用和/或应用方式和/或施用方式。

[0113] 在一些实施方案中,本发明的组合物可以是或可以添加到食品补充剂(在本文中也称为膳食补充剂)中。

[0114] 在一些实施方案中,本发明的组合物可以是或可以添加到功能性食品中。如本文所用,术语“功能性食品”是指不仅能够提供营养效果而且还能够为消费者递送其他有益效果的食品。因此,功能性食品是其中掺入有赋予食物除了纯粹的营养作用之外的特定功能(例如,医学或生理学上的益处)的组分或成分(例如本文所述的那些)的普通食品。虽然对功能性食品没有法律定义,但对该领域感兴趣的大多方都认为它们是具有超出基本营养功效的特定健康功效的市售食品。一些功能性食品是营养保健品。这里,术语“营养保健品”是指不仅能够提供营养功效和/或味道满足,而且还能够向消费者递送治疗(或其他有益)功效的食品。营养保健品跨越食品和药物之间的传统分界线。

[0115] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含乳酸片球菌(例如乳酸片球菌NRRL B-50517)和食用油的组合物。在一些实施方案中,食用油选自橄榄油、玉米油、EVOO、LT00、花生油和植物油。在一些实施方案中,组合物中油与益生菌的比率(w/w)的范围为1:1至10:1。在一些实施方案中,益生菌在油组合物中表现出耐热性。

[0116] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含糖(例如蔗糖或乳糖)与乳酸片球菌(例如乳酸片球菌NRRL B-50517)组合的组合物。在一些实施方案中,糖的浓度范围为溶液的0.1%至50%。

[0117] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含盐溶液(例如NaCl)与乳酸片球菌(例如乳酸片球菌NRRL B-50517)组合的组合物。在一些实施方案中,盐的浓度范围为溶液的0.1%至20%。

[0118] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含花生酱与乳酸片球菌(例如乳酸片球菌NRRL B-50517)组合的组合物。在一些实施方案中,花生酱与益生菌的比率(w/w)的范围为1:1至10:1。

[0119] 样品实施方案

[0120] 该部分描述了本发明的示例性组合物和方法,以一系列段落而非限制性地给出,其中的一些或全部可以为了清楚和有效而以字母数字指定。这些段落中的每一个可以以任

何合适的方式与一个或更多个其他段落组合,和/或与本申请中其他地方的公开内容组合,包括以引用方式并入的材料。以下一些段落明确地参考并进一步限制其他段落,提供但不限于一些合适组合的实例。

[0121] 1. 一种组合物,其包含有效量的益生菌与有效量的两亲性物质的混合,所述两亲性物质在组合物受热时增强组合物中益生菌的生存能力。

[0122] 2. 根据段落1所述的组合物,其中益生菌作为冷冻干燥的发酵培养物与两亲性物质混合。

[0123] 3. 根据段落1至2中任一项所述的组合物,其中两亲性物质作为干粉与益生菌混合。

[0124] 4. 根据段落1至3中任一项所述的组合物,其还包含与两亲性物质和益生菌混合的油。

[0125] 5. 根据段落4所述的组合物,其中油是橄榄油。

[0126] 6. 根据段落4至6中任一项所述的组合物,其中两亲性物质与益生菌与油的比率(w/w)的范围为约1:10:0.1至约10:1:25。

[0127] 7. 根据段落1至6中任一项所述的组合物,其中两亲性物质形成脂质膏并用作载体。

[0128] 8. 根据段落1至7中任一项所述的组合物,其中益生菌是乳酸片球菌。

[0129] 9. 根据段落1至8中任一项所述的组合物,其中益生菌是乳酸片球菌NRRL B-50517。

[0130] 10. 根据段落1至9中任一项所述的组合物,其中两亲性物质包括卵磷脂、花生酱、杏仁黄油、大豆黄油或饼干黄油。

[0131] 11. 根据段落1至10中任一项所述的组合物,其中热是干热。

[0132] 12. 根据段落11所述的组合物,其中干热为至少65℃。

[0133] 13. 根据段落11至12中任一项所述的组合物,其中干热的范围为65℃至95℃。

[0134] 14. 根据段落1至13中任一项所述的组合物,其中组合物受热至少1秒。

[0135] 15. 根据段落1至14中任一项所述的组合物,其中组合物受热至少约10分钟。

[0136] 16. 根据段落1至15中任一项所述的组合物,其中组合物在第一温度下受干热,接着使组合物在第二温度下受干热。

[0137] 17. 根据段落16所述的组合物,其中第一温度为约65℃,第二温度为约85℃。

[0138] 18. 根据段落16-17中任一项所述的组合物,其中组合物在第一温度下受热至少约1秒至至少约30分钟,并在第二温度下受热至少约1秒至至少约30分钟。

[0139] 19. 根据段落16至17中任一项所述的组合物,其中组合物在第一温度下受热约30分钟,并在第二温度下受热约10分钟。

[0140] 20. 根据段落16至17中任一项的组合物,其中组合物在第一温度下受热约30分钟,并在第二温度下受热约30分钟。

[0141] 21. 根据段落1至10中任一项所述的组合物,其中热是液体热。

[0142] 22. 根据段落21所述的组合物,其中液体热为至少约65℃。

[0143] 23. 根据段落21所述的组合物,其中液体热为至少约80℃。

[0144] 24. 根据段落21所述的组合物,其中液体热为至少约82℃。

- [0145] 25. 根据段落21至24中任一项所述的组合物,其中组合物受液体热至少约1秒。
- [0146] 26. 根据段落21至24中任一项所述的组合物,其中组合物受热至少约5分钟。
- [0147] 27. 根据段落21至24中任一项所述的组合物,其中组合物受热至少约10分钟。
- [0148] 28. 根据段落1至27中任一项所述的组合物,其中生存能力与缺乏有效量的两亲性物质的组合物相比增强至少约2倍。
- [0149] 29. 根据段落1至27中任一项所述的组合物,其中生存能力与缺乏有效量的两亲性物质的组合物相比增强至少约10倍。
- [0150] 30. 根据段落1至29中任一项所述的组合物,其中两亲性物质是向日葵卵磷脂。
- [0151] 31. 根据段落1至30中任一项所述的组合物,其中两亲性物质与益生菌的比率(w/w)的范围为约1:10至约25:1。
- [0152] 32. 根据段落1至31中任一项所述的组合物,其中两亲性物质与益生菌的比率(w/w)的范围为约1:1至约10:1。
- [0153] 33. 根据段落1至32中任一项所述的组合物,其中两亲性物质与益生菌的比率(w/w)为约5:1。
- [0154] 34. 根据段落1至32中任一项所述的组合物,其中两亲性物质与益生菌的比率(w/w)为约10:1。
- [0155] 35. 一种容器,其适于容纳包含根据段落1至34中任一项所述的组合物的食物产品。
- [0156] 36. 根据段落35所述的容器,其中容器由包括玻璃、塑料、纸/纸盒或铝的物质制成。
- [0157] 37. 根据段落35至36中任一项所述的容器,其中组合物涂覆在容器的表面或部分上。
- [0158] 38. 根据段落35至37中任一项所述的容器,还包括食物产品。
- [0159] 39. 根据段落38所述的容器,其中食物产品包括油、醋、酸奶、水果产品、苹果酱、乳制品、饮料、糖果、零食和果汁。
- [0160] 40. 一种适于容纳食物的容器,其中所述容器的一部分或表面涂覆有有效量的乳酸片球菌。
- [0161] 41. 根据段落40所述的容器,其中所述乳酸片球菌是菌株NRRL B-50517。
- [0162] 42. 根据段落40或41中任一项所述的容器,其中所述容器由包括玻璃、塑料、纸/纸盒和铝的物质制成。
- [0163] 43. 根据段落40至43中任一项所述的容器,其中,所述乳酸片球菌涂覆在容器的内表面上。
- [0164] 44. 根据段落40至43中任一项所述的容器,还包括食物产品。
- [0165] 45. 根据段落44所述的容器,其中,所述食品包括油、醋、酸奶、水果产品、苹果酱、乳制品、饮料、糖果、零食和果汁。
- [0166] 46. 一种增强受热的组合物中的益生菌的生存能力的方法,包括:
- [0167] iii) 向包括益生菌的组合物中加入有效量的两亲性物质;以及
- [0168] iv) 使所述组合物受热,
- [0169] 由此增强了所述益生菌在所述受热的组合物中的生存能力。

- [0170] 47. 根据段落46所述的方法, 其中所述两亲性物质与所述益生菌的冷冻干燥的发酵培养物混合。
- [0171] 48. 根据段落46至47中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质是干粉的形式。
- [0172] 49. 根据段落46至48中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌和油混合。
- [0173] 50. 根据段落49所述的方法, 其中, 所述油是橄榄油。
- [0174] 51. 根据段落49至50中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌与所述油的比率(w/w)的范围为约1:10:0.1至10:1:25。
- [0175] 52. 根据段落46至50中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质形成脂质膏并用作载体。
- [0176] 53. 根据段落46至52中任一项所述的方法, 其中, 所述益生菌是乳酸片球菌。
- [0177] 54. 根据段落2所述的方法, 其中, 所述益生菌是乳酸片球菌NRRL B-50517。
- [0178] 55. 根据段落46至54中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质包括卵磷脂、花生酱、杏仁黄油、大豆黄油或饼干黄油。
- [0179] 56. 根据段落46至55中任一项所述的方法, 其中, 所述热是干热。
- [0180] 57. 根据段落56所述的方法, 其中, 所述干热为至少50℃。
- [0181] 58. 根据段落55至56中任一项所述的方法, 其中, 所述干热的范围为65℃至95℃。
- [0182] 59. 根据段落46至58中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物受热至少1秒。
- [0183] 60. 根据段落46至59中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物受热至少约10分钟。
- [0184] 61. 根据段落46至60中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物在第一温度下受干热, 接着使所述组合物在第二温度下受干热。
- [0185] 62. 根据段落61所述的方法, 其中, 所述第一温度为约65℃, 所述第二温度为约85℃。
- [0186] 63. 根据段落61至62中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物在所述第一温度下受热至少约1秒至至少约30分钟, 并在所述第二温度下受热至少约1秒至至少约30分钟。
- [0187] 64. 根据段落61至63中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物在所述第一温度下受热约30分钟, 并在所述第二温度下受热约10分钟。
- [0188] 65. 根据段落61至63中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物在所述第一温度下受热约30分钟, 并在所述第二温度下受热约30分钟。
- [0189] 66. 根据段落46至55中任一项所述的方法, 其中, 所述热是液体热。
- [0190] 67. 根据段落66所述的方法, 其中, 所述液体热为至少约50℃。
- [0191] 68. 根据段落66所述的方法, 其中, 所述液体热为至少约80℃。
- [0192] 69. 根据段落66所述的方法, 其中, 所述液体热为至少约82℃。
- [0193] 70. 根据段落66至69中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物受热至少约1秒。
- [0194] 71. 根据段落66至70中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物受热至少约5分钟。
- [0195] 72. 根据段落66至70中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物受热至少约10分钟。
- [0196] 73. 根据段落46至72中任一项所述的方法, 其中, 所述生存能力与缺乏有效量的两亲性物质的组合物相比增强至少约2倍。
- [0197] 74. 根据段落46至72中任一项所述的方法, 其中, 所述生存能力与缺乏有效量的两



亲性物质的组合物相比增强至少约10倍。

[0198] 75. 根据段落46至74中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质是向日葵卵磷脂。

[0199] 76. 根据段落46至75中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌的比率(w/w)的范围为约1:10至约25:1。

[0200] 77. 根据段落46至76中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌的比率(w/w)的范围为约1:1至约10:1。

[0201] 78. 根据段落46至77中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌的比率(w/w)为约5:1。

[0202] 79. 根据段落46至77中任一项所述的方法, 其中, 所述两亲性物质与所述益生菌的比率(w/w)为约10:1。

[0203] 80. 根据段落46至79中任一项所述的方法, 其中, 所述组合物与食物产品接触并与所述食物产品一起受热。

[0204] 81. 根据段落46至79所述的方法, 其中, 步骤ii)的使所述组合物受热的步骤包括使所述组合物与食物产品接触, 其中所述食物产品在接触所述组合物之前已经预先受热。

[0205] 82. 一种治疗有需要的受试者的以炎症为特征的疾病或病症的方法, 包括向受试者施用有效量的乳酸片球菌益生菌。

[0206] 83. 根据段落82所述的方法, 其中, 所述方法包括向所述受试者施用权利要求1至34中任一项所述的组合物。

[0207] 84. 根据段落83的所述方法, 其中, 所述组合物还包括食物、营养或药物产品。

[0208] 85. 根据段落82至84中任一项所述的方法, 其中, 所述疾病或病症选自: 恶性肿瘤(癌症)、关节炎、心血管疾病、肝炎、感染、伤口愈合、胰腺炎、胃食管返流疾病、糖尿病、炎症性肠病、消化性溃疡、支气管炎、胆囊炎、阑尾炎、滑囊炎、皮炎、哮喘、自身免疫性疾病、盆腔炎、痛风、创伤、异物感染、烧伤、牙科工作、肌腱炎、鼻炎、粘膜炎, 以及暴露于诸如化学品的和酒精的毒素。

[0209] 86. 根据段落82至85中任一项所述的方法, 其中, 所述乳酸片球菌益生菌是菌株NRRLB-50517。

[0210] 87. 根据段落82至86中任一项所述的方法, 其中, 所述受试者是人。

[0211] 88. 根据段落82至87中任一项所述的方法, 其中, 所述受试者被施用大于 $1.0 \times 10^9$ cfu的益生菌。

[0212] 89. 根据段落82至88中任一项所述的方法, 其中, 所述受试者被施用大于 $4.0 \times 10^9$ cfu的益生菌。

[0213] 90. 根据段落82至89中任一项所述的方法, 其中, 所述受试者被施用一种或更多种另外的治疗剂。

[0214] 91. 根据段落82至89中任一项所述的方法, 其中, 所述受试者不被施用另一种治疗剂。

[0215] 92. 根据段落82至91中任一项所述的方法, 其中, 所述乳酸片球菌益生菌使所述受试者的抗炎M2巨噬细胞的数量增多。

[0216] 93. 根据段落82至92中任一项所述的方法, 其中, 所述受试者表现出IL-10的产生

增多。

[0217] 94. 根据段落82至93中任一项所述的方法, 其中, 所述受试者表现出降低的IL-6和/或IL-23水平。

[0218] 95. 根据段落82至94中任一项所述的方法, 其中, 所述疾病是癌症。

[0219] 96. 根据段落95所述的方法, 其中, 所述受试者被组合施用乳酸片球菌益生菌与一种或更多种化学治疗剂和/或放疗。

[0220] 97. 根据段落82至94中任一项所述的方法, 其中, 所述疾病是胰腺炎。

[0221] 98. 一种组合物, 其包含有效量的乳酸片球菌益生菌, 用于第82至97段中任一项所述的方法。

[0222] 99. 根据段落98所述的组合物, 其中, 所述乳酸片球菌益生菌被配制成片剂。

[0223] 100. 根据段落98所述的组合物, 其中, 所述乳酸片球菌益生菌被配制成胶囊剂。

[0224] 101. 根据段落98至100中任一项所述的组合物, 其包含桃果粉作为食用香料。

[0225] 102. 根据段落98至101中任一项所述的组合物, 其中, 所述乳酸片球菌益生菌是菌株NRRL B-50517。

[0226] 通过以下实施例进一步说明本发明。提供这些实施例是为了帮助理解本发明, 而不应解释为对其的限制。

[0227] 实施例

[0228] 实施例1-乳酸片球菌的施用刺激动物的先天免疫应答

[0229] 该实施例描述了施用乳酸片球菌对大鼠先天免疫应答的影响。

[0230] 表1. 对用基于乳酸片球菌的益生菌喂养的大鼠巨噬细胞活性的刺激

[0231]

	MAC*
对照	4.0±0.3
低	4.0±0.5
中	6.0±1.6
高	7.2±1.5

[0232] \*: 喂食斯普拉-道来氏 (Sprague Dawley) 大鼠 (9周), 哈伦 (Harlan) #7012大鼠自由采食。益生菌是基于乳酸片球菌的益生菌 (Imagilin, Frederick, MD)。共有4组 (n=10): 对照组 (无益生菌); 低剂量组 ( $1 \times 10^9$  cfu); 中剂量组 ( $2 \times 10^9$  cfu); 和高剂量组 ( $10 \times 10^9$  cfu)。动物在上午11点给予2克与益生菌混合的食物。然后从晚上8点到早上11点, 随意提供食物。24小时随意饮水。分析尾部血液样品的全血细胞计数。

[0233] 当大鼠每天施用  $2.0 \times 10^9$  至  $10 \times 10^9$  cfu 基于乳酸片球菌的益生菌15天时, 与不用益生菌的大鼠相比, 巨噬细胞的量增多150%至180%。巨噬细胞的增多表明基于乳酸片球菌的益生菌能刺激大鼠先天免疫应答。有趣的是, 当给大鼠喂食少量 ( $1.0 \times 10^9$ ) 基于乳酸片球菌的益生菌时, 巨噬细胞的数量与来自对照的巨噬细胞的数量相仿。这表明需要足够量的基于乳酸片球菌的益生菌来刺激先天免疫应答, 例如使巨噬细胞的数量增多。

[0234] 实施例2-乳酸片球菌的施用刺激人受试者的细胞因子的产生。

[0235] 该实施例描述了施用乳酸片球菌对人受试者细胞因子的产生的影响。

[0236] 对于先天免疫应答, 巨噬细胞大致分为两组: 促炎M1巨噬细胞和抗炎M2巨噬细胞。

M2巨噬细胞还指在如伤口愈合和组织修复的构建过程中起作用的巨噬细胞,以及那些通过产生如白细胞介素-10 (IL-10) 的抗炎细胞因子来截断破坏性的免疫系统激活的巨噬细胞。  
[0237] 表2.以乳酸片球菌益生菌治疗的人类志愿者受试者白细胞介素-10 (IL-10) 的增多。

[0238]

IL-6 的检测				IL-10 的检测		
参与者 ID	用乳酸片球菌益生菌治疗之前	用乳酸片球菌益生菌治疗之后	用乳酸片球菌益生菌治疗之后的	用乳酸片球菌益生菌治疗之前	用乳酸片球菌益生菌治疗 45 天之后	用乳酸片球菌益生菌治疗之后的
AB01	0.50	0.29	58%	1.99	3.99	200%
AB02	1.77	0.93	53%	4.44	8.16	183%
AB03	1.94	1.72	89%	5.66	8.95	158%
AB04	0.72	0.93	129%	4.44	8.79	198%
AB05	0.12	0.19	158%	0.77	3.25	422%
平均				97.4%	平均	232%

[0239] \*:在施用乳酸片球菌NRRL B-50517益生菌之前和在每天施用40亿cfu的乳酸片球菌益生菌45天后从五名志愿者收集血清样品。使用基于液相芯片 (Luminex) 的多因子检测 (EMD Millipore;Milliplex) 分析血清样品,所述检测被设计为测量与促炎IL-6和抗炎IL-10相关的生物标志物。

[0240] 在施用乳酸片球菌益生菌45天后,所有五名志愿者表现出显著增加的抗炎IL-10活性(增加158%至422%)。相反,对促炎IL-6的影响显示出不一致的结果,其表现出在三名志愿者中活性降低和两名志愿者中活性增加。这些结果表明,在人受试者中施用乳酸片球菌益生菌可以使抗炎IL-10的活性增加两倍以上。这些结果以及显示基于乳酸片球菌的益生菌治疗的大鼠的巨噬细胞增多的结果表明基于乳酸片球菌的益生菌能增强人和动物的先天免疫。用乳酸片球菌治疗的人和动物的先天免疫应答表现为M2巨噬细胞和抗炎IL-10的增多。

[0241] 实施例3-乳酸片球菌NRRL B-50517补充剂在体重管理中的作用:对照、随机、双盲试验

[0242] 该体重管理研究以对照、随机、双盲试验评估了12周补充乳酸片球菌NRRL B-50517益生菌菌株对30名成年参与者的作用。使用生物电阻抗分析(BIA) 在试验开始和结束时测量体脂百分比。使用在试验开始前和结束后收集的血液样品测定促炎生物标志物白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素-23 (IL-23) 的水平。使用每周问卷调查在整个研究中监测食欲、能量水平、排便、粪便质量、腹胀和气体(gas)。这里首次描述了乳酸片球菌的特定体重减轻和抗炎作用。每日补充40亿CFU乳酸片球菌导致:益生菌组体脂平均损失0.86±0.42%,而对照组平均增加0.28%±0.19,p=0.0264。益生菌组和对照组的促炎IL-6比率不同,分别为0.61±0.22和3.06±0.87(p=0.0295);益生菌组中促炎IL-23比率为0.65±0.14,对照组为1.71±0.38,p=0.0068。

### [0243] 方法和材料

[0244] 该研究的参与者是在志愿者的基础上选出的;治疗组的年龄、性别和BMI的分布相等。在研究期间,没有指示志愿者改变他们的常规饮食模式或锻炼惯例。在如下分组受试者中测试益生菌:20%正常体重状态(18.5-24.99),47%超重(25-29.99)和33%肥胖(>30)。

[0245] 在补充期开始之前,参与者接受了大量的身体检查(包括生物电阻抗分析)以确定体脂百分比以及血液检查(blood work)以量化IL-6和IL-23水平。在研究结束时重复相同的检查程序。在12周的过程中,30名参与者每日一次施用2粒含有乳酸片球菌NRRL B-50517发酵培养物和桃果粉的复合物的明胶胶囊(相当于40亿CFU乳酸片球菌益生菌/天的剂量)或者施用2粒仅含桃果粉的胶囊的安慰剂治疗。根据对食欲、能量水平、排便、粪便质量、腹胀和气体的影响来分析益生菌的安全性。作为每周问卷的一部分,要求参与者从1到5根据主观衡量标准对他们对这些症状的体验打分,1是最不严重的,5是最严重的。

### [0246] 结果

[0247] 本结果首次表明,益生菌乳酸片球菌NRRL B-50517对超重和肥胖个体的饮食的补充改变了体脂储存并影响与肥胖病理学相关的炎症生物标志物的浓度。在研究结束时在安慰剂组和5051治疗组之间观察到的在体脂%、IL-6水平和IL-23水平之间的明显差异表明,在没有传统的饮食改变或运动的情况下,益生菌具有支持体重减轻的作用。结果显示在图1至图3中。所有三个图的误差条反映了安慰剂治疗组和益生菌治疗组的体脂百分比、IL-6和IL-23的相应值都不在彼此的一个标准偏差内,因此表明两者之间存在显著差异。

[0248] 图1中所示是乳酸片球菌5051益生菌对体脂%的作用。参与者每日一次施用2粒含有乳酸片球菌NRRL B-50517发酵培养物和桃果粉的复合物的明胶胶囊(相当于40亿CFU乳酸片球菌益生菌/天的剂量)或者施用2粒仅含桃果粉的胶囊。通过生物电阻抗分析(BIA)测试确定体脂百分比。数值基于对30名志愿者进行3个月乳酸片球菌益生菌治疗的双盲现场评估。 $P=0.0264$ ,  $t=2.4073$ ,安慰剂平均值 $=0.280\pm0.190$  (SEM);NutriLots™平均值 $=-0.864\pm0.418$  (SEM)。治疗3个月后与安慰剂组相比,益生菌治疗组(NutriLots)中观察到的体脂百分比显著更高的差异支持乳酸片球菌NRRL B-50517补充剂可以在饮食或运动模式无变化的情况下导致加速的体重减轻。

[0249] 乳酸片球菌-益生菌补充对炎症生物标志物IL-6和IL-23的影响。

[0250] 图2中所示是乳酸片球菌5051益生菌对IL-23的作用。在研究开始之前和治疗期结束后从用安慰剂或益生菌的每个参与者收集血液样品以确定IL-6和IL-23存在的变化。在乳酸片球菌-益生菌治疗组中观察到IL-6和IL-23均显著降低。数值基于对30名志愿者进行3个月乳酸片球菌益生菌治疗的双盲现场评估。 $P=0.0295$ ,  $t=2.4239$ ,安慰剂平均值 $=3.058\pm0.867$  (SEM);NutriLots™平均值 $=-0.612\pm0.221$  (SEM)。益生菌治疗组(NutriLots)中IL-23的较低比率表明5051能够减少与肥胖相关的炎症。

[0251] 图3中所示是乳酸片球菌5051益生菌对IL-6的作用。数值基于对30名志愿者进行3个月乳酸片球菌益生菌治疗的双盲现场评估。 $P=0.0068$ ,  $t=3.0194$ ,安慰剂平均值 $=1.714\pm0.377$  (SEM);NutriLots™平均值 $=-0.648\pm0.137$  (SEM)。益生菌治疗组(NutriLots)中IL-6的比率下降表明5051能够减少与肥胖相关的炎症。

### [0252] 讨论

[0253] 在本研究中,12周的乳酸片球菌NRRL B-50517益生菌治疗在施用给不同BMI的参

与者时,使体脂百分比、白细胞介素6和23显著降低(图1、图2和图3)。各方面一致的结果表明,乳酸片球菌作用方式并不仅限于肥胖体重状态的个体,也适用于BMI较低的个体。大多数先前的研究已经证明,LAB益生菌治疗对单纯性肥胖受试者的功效。当其他益生菌菌株对于减少肥胖相关炎症的存在无效时,与安慰剂组相比,5051降低了白细胞介素6和23的水平。

[0254] 在与本研究一起进行的单独发表的研究中证实了益生菌的安全性。在安慰剂或益生菌治疗组的试验开始和结束之间,没有在食欲、排便、腹胀、粪便质量、能量水平或气体方面观察到参与者打分的显著差异。

[0255] 这些发现对未来治疗和预防代谢疾病具有重大意义。由于很大比例的慢性疾病如心血管疾病(CVD)和2型糖尿病病例伴随肥胖而发生,因此改善这种疾病的管理有可能大大降低对公共健康的其他几种突出威胁的发生率。

[0256] 虽然以前认为仅作为甘油三酯形式的过量卡路里的储存容器,但已发现脂肪细胞在代谢、免疫和癌症中发挥复杂作用(Calabro P,Yeh ETH.2007.Obesity,Inflammation, and Vascular Disease:the role of the adipose tissue as an endocrine organ.Subcellular Biochemistry.42:63-91)。白色脂肪细胞分泌包括细胞因子和激素样因子如脂联素、瘦素和抵抗素的蛋白质;由于这些分子参与血管和代谢并发症,因此这种现象特别令人感兴趣(Calabro P,Yeh ETH.2007.Obesity,Inflammation,and Vascular Disease:the role of the adipose tissue as an endocrine organ.Subcellular Biochemistry.42:63-91)。在大多数肥胖患者中,由先天免疫的慢性激活导致的白色脂肪组织(WAT)的低度炎症造成糖尿病倾向的胰岛素抵抗、葡萄糖耐量降低和最终发展的可能性增加(Bastard JP,Maachi M,Lagathu C,Kim MJ,Caron M,Vidal H,Capeau J,Feve B.2006.Recent advances in the relationship between obesity,inflammation,and insulin resistance.Eur.Cyt.Net. 17(1):4-12)。肥胖WAT的巨噬细胞浸润充当促炎细胞因子的来源,进一步促成胰岛素抵抗的发病机理。同时,脂联素(一种在WAT中高度表达的胰岛素增敏效应子)的循环水平在肥胖受试者中比在正常体重受试者中低。这些个体中的WAT过量产生并分泌增加水平的许多炎症分子,包括IL-6(另一种胰岛素敏感性调节剂)。因此,肥胖的促炎发病机制和胰岛素抵抗的全身发展密切相关,通过WAT的调节联系。

[0257] 从饮食物质中提取的卡路里的调节可被认为可能是关于这里显示的结果的益生菌作用机制。由于其在营养物获取以及能量收获和调节中的关键作用,人肠道微生物群的组成一直被认为是体重的决定因素(Tennyson CA,Friedman G.2008.Microecology, obesity,and probiotics.Curr.Opin.Endocr.Diab.Obes.15(5):422-7;DiBaise JK,Zhang H,Crowell MD,Krajmalnik-Brown R,Decker GA,Rittmann BE.2008.Gut microbiota and its possible relationship with obesity.Mayo Clinic Proceedings.83(4):460-69.)。有理由相信,通过引入益生菌的靶向微生物群落调节可能具有作为代谢疾病治疗中的新型治疗剂的潜力。有意识地编辑微生物菌群可能是调和导致肥胖状态的能量摄入与消耗之间的不平衡的关键。

[0258] 安慰剂治疗组和益生菌治疗组两者中关于食欲的报告评分未变,表明饮食模式没有潜在的改变或不对饱腹感激素瘦素有影响。

[0259] 关于降低体脂百分比同时降低血清IL-6浓度,可以推测乳酸片球菌5051可以增加

胰岛素敏感性并全面降低全身炎症,因此有助于降低2型糖尿病的风险。由于IL-6也与肥胖个体的血管损伤有关,因此该细胞因子的血清水平降低可能会降低CVD的风险 (Calabro P, Yeh ETH.2007.Obesity,Inflammation,and Vascular Disease:the role of the adipose tissue as an endocrine organ.Subcellular Biochemistry.42:63-91)。肥胖个体的炎症活动(随着WAT巨噬细胞浸润而增加)可以假设随体脂减少而减少。

[0260] 这里显示的结果反映了在病态肥胖个体的术后结果分析中观察到的结果。在减肥手术后,显示患者在与BMI相关的IL-6、甘油三酯、胆固醇、LDL、葡萄糖和胰岛素方面具有临床相关的降低,证实体重与炎症特征之间存在关系,并进一步阐明BMI与慢性代谢和血管疾病的生化参数之间的关系 (Illan-Gomez F,Gonzalvez-Ortega M,Orea-Soler I,Alcaraz-Tafalla MS,Aragon-Alonso A,Pascual-Diaz M,Perez-Paredes M,Lozano-Almela ML.2012.Obesity and inflammation:change in C-reactive protein,tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6after bariatric surgery.Obes.Surg.22:950-55)。

[0261] 在益生菌治疗组中观察到的IL-23浓度的显著降低也是降低疾病风险的有力标志。IL-23/IL-17与导致肿瘤形成的信号通路的激活和致癌途径密切相关。由于在肥胖女性中观察到与腹部脂肪、胰岛素抵抗、瘦素或MIF水平的增加无关的IL-23/IL-17轴的刺激,因此可以合理地假设与肥胖症发展(而不是肥胖状态本身)相关的饮食和行为模式可能是有责任的 (Sumarac-Dumanovic M,Stevanovic D,Ljubic A,Jorga J,Simic M,Stamenkovic-Pejkovic D,Starcevic V,Trajkovic V,Micic D.2009.Increased activity of interleukin-23/interleukin-17proinflammatory axis in obese women.Int.J.Obes.33:151-56)。

[0262] 结论

[0263] 总之,益生菌乳酸片球菌NRRL B-50517对体脂百分比、IL-6和IL-23显示降低的作用,表明其对体重控制和代谢疾病的有益影响。根据本研究中提供的证据,乳酸片球菌NRRLB-50517可以被证明在降低寻求减少体重的那些个体的体脂和炎症方面是有效的。

[0264] 实施例4-基于乳酸片球菌的益生菌对患有胰腺炎的狗和猫的作用

[0265] 一只14岁切除卵巢的带有明显腹痛、呕吐和食欲下降的雌性玩具贵宾犬被诊断为可能患有胰腺炎。超声图像显示从胃到十二指肠具有高脂肪回声,并且血清分析的结果显示具有432 $\mu$ g/L的spec cPL(特异性犬胰脂肪酶)。尽管将该犬改为低脂肪饮食并立即每天两次用100mg KAMOSTAAL100治疗,但spec cPL仍然高于400 $\mu$ g/L并且在约2.5个月后达到610 $\mu$ g/L,伴有腹泻和呕吐。此时,连同低脂肪饮食和每天两次100毫克KAMOSTAAL100的当前治疗,该犬每天两次用200mg基于乳酸片球菌的益生菌治疗。有趣的是,不仅腹泻和呕吐停止,spec cPL在约6周内恢复到正常值163 $\mu$ g/L。因此,停止用基于乳酸片球菌的益生菌和KAMOSTAAL100治疗。然而,大约三个月后,该犬复发,spec cPL增加至276 $\mu$ g/L。这时,该犬仅每天两次用基于乳酸片球菌的益生菌200mg治疗。治疗持续约7个月,良好控制了腹泻、呕吐和食欲不振,并且spec cPL显示正常为108 $\mu$ g/L(图4)。

[0266] spec cPL(特异性犬胰脂肪酶)和spec fPL(特异性猫胰脂肪酶)是犬的正常spec cPL,并且是用于狗和猫的胰腺炎的公认测定。在健康的狗和猫中,spec cPL<200 $\mu$ g/L,spec fPL为0.7 $\mu$ g/L至3.5 $\mu$ g/L。当spec cPL大于400 $\mu$ g/L且猫spec fPL>5.4 $\mu$ g/L时,狗和猫被认为患有胰腺炎。基于此标准,我们将基于乳酸片球菌的益生菌应用于患有胰腺炎的两只狗

和一只猫,其中两只狗的spec cPL>600ug/L,并且该猫的spec fPL为50ug/L。所有这些狗和猫,不仅呕吐和腹泻停止,而且spec cPL和spec fPL得到控制并恢复正常。此外,还治疗了两只可能患有胰腺炎的狗,因为它们具有升高的spec cPL (303ug/L和205ug/L)。

[0267] 实施例5-基于乳酸片球菌的益生菌对接受化疗的患有癌症的狗的作用

[0268] 四只患有各种癌症且正在接受化疗的狗用乳酸片球菌益生菌的剂量治疗。在用乳酸片球菌益生菌进行短期治疗后,狗的症状得到改善。

[0269] \*:化疗治疗和基于乳酸片球菌的益生菌施用治疗在Daktari动物医院中心、Torri和Yaizu进行。

[0270]

年龄	体重	性别	癌症	化疗药物	治疗前的副作	乳酸片球菌剂量	治疗时间	效果
16	6	被切除卵巢	乳腺癌-第三次手术	panriifu (抗乳腺癌药物: 他莫昔芬)	腹泻、食欲不振	20 亿 cfu/天	3 天	施用基于乳酸片球菌的益生菌与抗癌药 3 天后,
5	16.2	被阉割	淋巴瘤	阿霉素	一般临床情况	40 亿 cfu/天	7 天	良好
12	15.7	被阉割	肛门囊	卡铂	软便	40 亿 cfu/天	3 天	良好
10	35	雌性	淋巴瘤	L-门冬酰胺酶(左旋门冬酰胺酶)、苯丁酸氮芥、	呕吐、腹泻	80 亿 cfu/天	4 天	治疗 4 天后良好, 腹泻恢复。

[0271] 实施例6-乳酸片球菌NRRL B-50517的制备

[0272] 首先,发酵过程所需的菌株选自在-70℃冰箱冷冻的细菌。在无菌培养基瓶中生长培养物。生长时,取出样品以验证清洁度和基本的表型纯度。如果确定是干净的并且细胞与初始革兰氏染色涂片相匹配,则批准制备用于罐的培养基(发酵液)。在接种之前,接种罐用苛性碱和酸溶液进行CIP'd(就地清洁)。我们对罐进行消毒,然后用液体发酵成分填充罐,所述液体发酵成分被倒入、混合并灭菌。取决于罐的容积,罐培养基在220°F至250°F的温度下灭菌30分钟至一个半小时。然后将温度降至85°F至95°F,用接种物播种罐。当接种罐生长时,我们将罐冷却到55°F至65°F。冷却时,取样进行重复纯度检查。如果批准放行,我们重复罐准备和接种的步骤。生产将使用生长和批准的接种瓶接种罐。在所有所需的罐生长之后,我们重复纯度检查,然后准备离心机并将细胞浓缩成浓缩液体。将浓缩的液体培养物放入无菌储罐中。我们将无菌液体冷冻保护剂溶液加入离心培养物中。

[0273] 它通过搅拌器在储罐中均质化。当均质时,将培养物泵入无菌釜(其为产品的用于冷冻或造粒的功能性等分试样)中,以在液氮桶中造粒。完成后,将冷冻的颗粒冻干或冷冻干燥。干燥后,将冷冻干燥的颗粒研磨成细粉。我们将取出磨成粉的培养物并使其均质化以确保在对培养基进行取样用于根据形态学、生理学、16S rRNA DNA序列和高温应力测定的

质量保证检测之前的均一性。将产品从用于均质化材料的搅拌器中取出,然后将其包装并储存在室温阴凉区域。

[0274] 实施例7-食品中的乳酸片球菌NRRL B-50517的配制和检测

[0275] 随着对益生菌健康益处的认识的传播以及对加入益生菌的食品的需求不断增加,因为开始与生物技术公司合作,所以食品公司面临着新的挑战。首先,他们必须从过多的可用选择中选择一种或更多种益生菌菌株。理想情况下,所选择的细菌需要:1.在任何制造压力诸如高温处理下存活,2.与所需食物基质的化学和物理性质具有相容性,3.一旦掺入在产品保质期间在食物中保持生存能力,以及4.抵抗消化机制的破坏,以赋予宿主健康益处。

[0276] 在商业的补充剂中受欢迎的许多益生菌菌株(例如乳杆菌和双歧杆菌)不能充分地满足这些要求,因此不适合工业化的食品生产。由于缺乏在新近巴氏灭菌的食品中存活所必需的临界高热耐受性,这两种乳酸菌(LAB)的应用在这方面受到严重限制。这些菌株在室温下的不稳定性将给食品零售商和潜在消费者带来运输和储存方面的额外的困难。作为兼性厌氧菌和专性厌氧菌,乳酸杆菌和双歧杆菌在任何暴露于氧气的情况下都特别容易丧失生存能力,进一步降低其掺入食品的可能性。需要更通用、可靠的菌株来配制有效的加入益生菌的食品。

[0277] 乳酸片球菌NRRL B-50517是一种由能够承受温度、渗透压和氧气暴露的巨大变化的细菌菌株组成的单一配方的粉末。作为最初从植物材料中分离出的耐久性微生物,益生菌已被证明能够在各种环境条件和热处理程序下在各种食品中存活。

[0278] 乳酸片球菌NRRL B-50517在浓度范围为10%至50%的蔗糖溶液中存活指示益生菌的渗透压耐受性(表3)。当较弱的细菌可能会在具有相对高渗透压的溶液中失去生存能力时,乳酸片球菌NRRL B-50517即使在最高测试浓度下也能保持非常稳定的细胞计数。在9天的过程中,在相同浓度范围内的乳糖溶液中获得了可比较的结果(表4)。在无菌水溶液、0.1%至20%NaCl以及NaCl和蔗糖的组合溶液中,乳酸片球菌NRRL B-50517在所有测定样品中保持显著的细胞生存能力长达一周,显示益生菌适应多种化学环境的能力(表5)。

[0279] 表3. 在室温下储存的高浓度蔗糖溶液中培养的乳酸片球菌NRRL B-50517的存活率

[0280] 室温下在蔗糖溶液中不同培养时间后的乳酸片球菌NRRL B-50517活细胞的数量

[0281]	%蔗糖溶液	对照	1 天	3 天
	10%	3. 00E+08	5. 20E+09	N/A
[0282]	20%	3. 50E+08	3. 00E+08	1. 40E+08
	30%	3. 30E+08	2. 10E+08	1. 50E+08
	40%	5. 10E+08	3. 70E+08	3. 10E+08
	50%	6. 50E+08	4. 70E+08	3. 30E+08



[0283] \*:将0.2g 10亿 (1B) CFU/g乳酸片球菌NRRL B-50517加入到20mL的各蔗糖溶液中并在室温下储存。通过用0.1%盐水连续稀释蔗糖+乳酸片球菌NRRL B-50517溶液,铺在MRS上并在培养过夜后对平板计数来进行生存能力检测。\*\*板在第三天被污染,阻止对稳定性的持续检测。

[0284] 结论:乳酸片球菌NRRL B-50517在浓度范围为10%至50%的蔗糖溶液中保持生存能力,表明乳酸片球菌NRRL B-50517对高渗透压环境的耐受性。

[0285] 表4.在室温下储存的高浓度乳糖溶液中培养的乳酸片球菌NRRL B-50517的存活率

[0286] 室温下在乳糖溶液中不同培养时间后的乳酸片球菌NRRL B-50517活细胞的数量

[0287]

%乳糖	对照	1天	3天	7天	9天
10%	1.20E+08	2.10E+08	1.90E+08	2.00E+08	8.00E+07
20%	1.80E+08	1.40E+08	2.40E+08	2.10E+08	2.00E+08
30%	2.30E+08	1.60E+08	4.30E+08	2.00E+08	1.60E+08
40%	4.90E+08	3.70E+08	3.30E+08	3.67E+09	4.00E+08
50%	1.80E+08	7.00E+07	1.00E+08	1.00E+09	1.50E+08

[0288] \*:将0.2g 1B/g乳酸片球菌NRRL B-50517加入到20mL的各乳糖溶液中并在室温下储存。通过用0.1%盐水连续稀释蔗糖+乳酸片球菌NRRL B-50517溶液,铺在MRS上并在培养过夜后对平板计数来进行生存能力检测。

[0289] 结论:在9天的时间内,乳酸片球菌NRRL B-50517在10%至50%的乳糖溶液中保持高度稳定的活细胞计数。

[0290] 表5.在室温下储存的高盐溶液中培养的乳酸片球菌NRRL B-50517的存活率

[0291] 室温下在盐溶液中不同培养时间后乳酸片球菌NRRL B-50517活细胞的数量

[0292]

溶液	5 分钟	30 分钟	120 分钟	7 天	14 天	22 天	35 天
仅无菌 H <sub>2</sub> O	4.13E+08	4.31E+08	4.03E+08	1.01E+08	4.90E+0 5	0.00E+00	0.00E+00
0.1% NaCl	3.88E+08	3.82E+08	3.72E+08	1.82E+08	9.80E+0 7	1.60E+07	1.10E+05
1% NaCl	4.38E+08	3.98E+08	3.51E+08	1.82E+08	2.90E+0 7	9.00E+04	5.00E+03
2.5% NaCl	4.98E+08	3.87E+08	4.02E+08	2.21E+08	5.70E+0 7	1.00E+04	0.00E+00
5% NaCl	4.85E+08	3.40E+08	3.87E+08	1.39E+08	1.25E+0 8	2.90E+07	1.01E+06
7.5% NaCl	3.82E+08	3.72E+08	4.60E+08	6.70E+07	4.20E+0 7	2.90E+07	7.12E+06
10% NaCl	4.32E+08	4.08E+08	4.96E+08	4.70E+07	7.00E+0 6	3.00E+06	2.60E+05
20% NaCl	4.53E+08	3.62E+08	5.36E+08	1.03E+08	5.10E+0 7	3.20E+07	4.52E+06
25% 蔗糖、10% NaCl	3.92E+08	3.68E+08	4.80E+08	9.00E+07	5.60E+0 7	9.00E+06	1.56E+06

[0293] \*:将0.2g 1B/g乳酸片球菌NRRL B-50517加入到20mL的不同浓度的NaCl或蔗糖+NaCl溶液中并在室温下储存。通过用0.1%盐水连续稀释NaCl+乳酸片球菌NRRL B-50517溶液,铺到MRS上,并在培养过夜后对平板计数来进行生存能力检测。

[0294] 当全面测定生存能力时,5051\*在掺入到室温下储存的花生酱后保留活细胞计数(CFU/g)长达113天,表明高的储存稳定性(表6)。当在花生酱中加热至85℃并且此后在室温下储存时,益生菌显示出类似的成功结果。当益生菌掺入到加热到85℃的布丁时,稳定性同样是恒定的;在冰箱储存的情况下,细胞计数在29天的时间内保持在一个数量级内(表7)。

[0295] 表6.乳酸片球菌NRRL B-50517合并到商业花生酱中

[0296] 在将乳酸片球菌NRRL B-50517合并到在不同温度下储存的花生酱后的活细胞的数量\*:通过将6g 100B/g的乳酸片球菌NRRL B-50517粉末与20g花生酱混合,然后在室温(23℃)或37℃下储存来制备乳酸片球菌NRRL B-50517和花生酱的样品。通过将0.1g混合物加入到

[0297]

储存天数	室温	存活%	37℃	存活%
对照	3.15E+10	100.00	3.15E+10	100.00
0	2.78E+10	88.18	n/a	n/a
7	1.34E+10	42.68	1.63E+10	51.85
14	2.33E+10	74.07	1.78E+10	56.44
22	2.91E+10	92.24	1.49E+10	47.27
113	4.78E+09	15.17	2.00E+07	0.06

[0298] 5mL 0.1%盐水中,连续稀释溶液用于铺在MRS上,并在45℃过夜培养后对平板计数来进行稳定性检测。将存活百分比计算为乳酸片球菌NRRL B-50517+盐水对照(在室温下将0.2g100B/g乳酸片球菌NRRL B-50517加入到10mL 0.1%盐水中)的分数。

[0299] 结论:在113天内,乳酸片球菌NRRL B-50517在室温下花生酱中显示高的细胞计数(CFU/g),表明含有两种成分的产品将保持高储存稳定性。即使在37℃下储存,花生酱和乳酸片球菌NRRL B-50517混合物在22天内也表现出相似的高生存能力,在22天和113天生存能力检测之间下降。

[0300] 表7.高温(85℃)处理后花生酱中乳酸片球菌NRRL B-50517的存活率

[0301] 在85℃下对合并到花生酱中的乳酸片球菌NRRL B-50517热处理并在室温下储存后的活细胞数量

[0302]

花生酱	第1天	存活%	第7天	存活%	第14天	存活%
对照	3.15E+10	100.00	3.15E+10	100.00	3.15E+10	100.00
PB 1	7.98E+09	25.33	1.01E+09	3.22	2.22E+09	7.04
PB 2	1.38E+10	43.83	3.17E+09	10.05	3.67E+09	11.66
榛子酱	2.53E+08	0.80	7.66E+08	2.43	8.11E+08	2.57

[0303] \*:通过将1.2g 100B/g的乳酸片球菌NRRL B-50517粉末混合到3.8g花生酱中来制备乳酸片球菌NRRL B-50517和花生酱的样品。将空管加热至85℃,然后加入0.5g花生酱和乳酸片球菌NRRL B-50517混合物并将其留在热板上5分钟。冷却10分钟后,向每个管中加入10mL 0.1%盐水。通过连续稀释到盐水中,铺在MRS上并在45℃下培养过夜后对平板计数来进行生存能力检测。将存活百分比计算为乳酸片球菌NRRL B-50517+盐水对照(在室温下将0.2g 100B/g乳酸片球菌NRRL B-50517加入到10mL 0.1%盐水中)的分数。

[0304] 结论:在高热处理后的两周内,乳酸片球菌NRRL B-50517在花生酱中保持高生存能力,支持乳酸片球菌NRRL B-50517与商业生产的坚果产品的相容性。

[0305] PB1成分:烤花生、糖、防止分离的氢化植物油(棉籽油、大豆油和菜籽油)、盐。

[0306] 榛子酱成分:糖、植物油(棕榈油和菜籽油)、榛子、可可粉、脱脂牛奶、乳清、乳糖、向日葵卵磷脂(乳化剂)、天然香草香精。

[0307] 在五种类型的高热处理油(玉米油、EV00、LT00、花生油和植物油)中测试乳酸片球菌NRRL B-50517产生的结果类似于在花生酱中观察到的结果。两种油,EV00和玉米油(表8),即使在连续暴露于85℃30分钟后也显示出令人印象深刻的存活率(表9和表10)。益生菌在油中明显的耐久性特别有利于其在涉及热的传统食品制备技术中的使用。

[0308] 表8. 高温 (85℃) 处理后商业油中的乳酸片球菌NRRL B-50517的存活率

[0309] 在对合并到不同类型的油中的乳酸片球菌NRRL B-50517热处理后的活细胞的数量

[0310]

油类型	室温	存活%	直到85℃	存活%	85℃下5分钟	存活%
对照	2.75E+08	100.00	2.75E+08	100.00	2.75E+08	100.00
玉米油	6.75E+07	24.52	4.55E+07	16.53	6.00E+06	2.18
EV00	9.70E+07	35.23	4.20E+07	15.25	1.10E+07	4.00
LT00	5.90E+07	21.43	3.60E+07	13.08	5.30E+07	19.25
花生油	1.68E+08	61.02	2.30E+07	8.35	0.00E+00	0.00
植物油	1.06E+08	38.50	4.70E+07	17.07	6.00E+06	2.18

[0311] \*: 将900uL油在热板上加热至85℃, 然后加入0.1g 1B/g乳酸片球菌NRRL B-50517, 然后放置指定的时间。然后取出管并使其冷却至少10分钟, 然后用0.1%盐水连续稀释并铺在MRS上。将平板在45℃下培养过夜并在第二天计数。将存活百分比计算为盐水+乳酸片球菌NRRL B-50517对照 (0.2g 1B/g乳酸片球菌NRRL B-50517在室温下加入到20mL 0.1%盐水中) 的分数。

[0312] 结论: 乳酸片球菌NRRL B-50517在室温下和高温处理后在各种商业油中保持高的活细胞计数 (CFU/g)。

[0313] 表9. 在高温 (85℃) 下处理不同时间后对乳酸片球菌NRRL B-50517在橄榄油中的存活率的影响

[0314]

不同温度下的 EV00	在对合并到橄榄油中的乳酸片球菌 NRRL B-50517 热处理后的活细胞数量	存活%
室温	1.18E+08	100.00
直到 85℃	7.80E+07	66.10
85℃, 5 分钟	1.90E+07	16.10
85℃, 15 分钟	3.00E+05	0.25
85℃, 30 分钟	2.00E+05	0.17

[0315] \*: 将900uL油在热板上加热至85℃, 然后加入0.1g的乳酸片球菌NRRL B-50517, 然后放置指定的时间。从热源中取出管并使其冷却至少10分钟, 然后连续稀释并铺在MRS上。将平板在45℃下培养过夜并在第二天计数。在每个热处理长度下的存活百分比计算为室温下EV00中存活的分数。

[0316] 结论: 乳酸片球菌NRRL B-50517在EV00中经过高温处理后仍存活, 即使在85℃下30分钟后也能产生高的活细胞数。益生菌可能与各种食物制备技术兼容, 包括涉及加热的那些。

[0317] 表10. 在高温 (85℃) 下处理不同时间后对乳酸片球菌NRRL B-50517在玉米油中的存活率的影响

[0318]	玉米油温度	在对合并到玉米油中的乳酸片球菌 NRRL B-50517 热处理后的活细胞数量	存活%
	室温	6.50E+07	100.00
	直到 85℃	6.30E+07	96.92
	85℃, 5 分钟	4.00E+06	6.15
	85℃, 15 分钟	5.30E+05	0.82
	85℃, 30 分钟	3.00E+04	0.05

[0319] \*: 将900μL油在热板上加热至85℃, 然后加入0.1g的乳酸片球菌NRRL B-50517, 然后放置指定的时间。从热源中取出管并使其冷却至少10分钟, 然后连续稀释并铺在MRS上。将平板在37℃下培养过夜并在第二天计数。将每个热处理长度的存活百分比计算为室温下玉米油中存活的分数。

[0320] 结论: 乳酸片球菌NRRL B-50517在玉米油中经过高温处理后仍存活, 即使在85℃下30分钟后也能产生高的活细胞数。益生菌可能与各种食物制备技术兼容, 包括涉及加热的那些。

[0321] 乳酸片球菌NRRL B-50517可以在模拟食品工业中使用的灭菌程序的85℃热处理后的不同食物产品中存活 (表11和表12), 所述食物产品分配到具有乳酸片球菌NRRL B-50517的不同的容器中, 并且乳酸片球菌NRRL B-50517在具有不同理化性质的产品中保留生存能力数周或数月。这提供了将活益生菌引入食物中的新方法。

[0322] 表11. 高温 (85℃) 处理后布丁中乳酸片球菌NRRL B-50517的存活率

[0323] 在乳酸片球菌NRRL B-50517合并到热处理后的不同类型的布丁中之后的活细胞数

[0324]

85℃处理后的天数	香草布丁	巧克力布丁
1	3.55E+07	4.70E+07
2	6.90E+07	2.65E+07
3	6.05E+07	5.10E+07
6	3.60E+07	1.93E+07
14	3.55E+07	7.75E+06
29	6.10E+07	4.00E+06

[0325] \*: 将一杯100mL的Shiny Spoon布丁倒入两个50mL管中, 并加热至85℃保持20分钟。原始容器用肥皂和水清洗, 干燥, 并用2g 10B/g乳酸片球菌NRRL B-50517填充。然后将加热的布丁倒回原始容器中, 冷却20分钟, 然后在冰箱中储存过夜。第二天将布丁混合并通过首先用5mL盐水稀释2g布丁, 然后连续稀释以铺在MRS上来测定生存能力。将平板培养过

夜并在第二天计数。

[0326] 结论:在合并到在与巴氏杀菌相似的条件加热至85℃的香草布丁或巧克力布丁之后,当在冰箱温度下储存时,乳酸片球菌NRRL B-50517保持高度稳定的细胞计数约一个月。

[0327] 表12. 高温 (85℃) 处理后的商业食物产品中的乳酸片球菌NRRL B-50517的存活率

[0328]	食物产品	85℃处理后乳酸片球菌 NRRL B-50517 的存活 CFU/g	存活%
	对照	2. 75E+08	100
	番茄酱	9. 83E+07	35. 68
	水果杯	8. 19E+07	29. 75
	EV00	7. 55E+07	27. 42
[0329]	Great Value 油	2. 43E+07	8. 81
	2. 5%乳糖	2. 33E+07	8. 46
	草莓糖浆	1. 40E+07	5. 09
	橘子汁	1. 04E+07	3. 79

[0330] \*:样品如下制备:

[0331] 1. 将10mL番茄酱在85℃下加热20分钟,然后与0.4g 1B/g乳酸片球菌NRRL B-50517和5mL无菌水混合,并使其冷却20分钟,然后检测生存能力。

[0332] 2. 将100g水果杯混合物在85℃下加热45分钟,然后倒回到原始容器中倒在1g 1B/g乳酸片球菌NRRL B-50517上并检测其生存能力。

[0333] 3. 将含有5mL EV00和Great Value油的管在85℃下加热20分钟,然后加入到0.2g 1B/g乳酸片球菌NRRL B-50517并检测其生存能力。

[0334] 4. 将含有5mL 2.5%乳糖的管在85℃下加热20分钟,然后加入到含有0.2g 1B/g乳酸片球菌NRRL B-50517的15mL管中。使管冷却20分钟,然后检测生存能力。

[0335] 5. 将283g草莓糖浆混合物倒入烧杯中,在85℃下加热30分钟,然后倒回到原始容器中倒在2g 1B/g乳酸片球菌NRRL B-50517上。冷却20分钟后,检测混合物的生存能力。

[0336] 6. 将5mL橙汁加热至85℃保持20分钟,然后加入到0.1g 1B/g乳酸片球菌NRRL B-50517中,冷却20分钟并检测生存能力。

[0337] \*\*所有生存能力检测通过用0.1%盐水连续稀释乳酸片球菌NRRL B-50517+热处理的食物混合物,铺在MRS上并在培养过夜后对平板计数来进行。存活百分比计算为盐水+乳酸片球菌NRRL B-50517对照(0.2g 1B/g乳酸片球菌NRRL B-50517在室温下加入20mL 0.1%盐水中)的分数。

[0338] 结论:乳酸片球菌NRRL B-50517在高温处理后的各种液体和固体基质中保持生存能力,表明在巴氏杀菌或其他类似的高温灭菌程序后掺入到许多不同食物的高相容性。

[0339] 实施例8-通过应用两亲性产品作为载体增加益生菌在热处理下的生存能力

[0340] 两亲性分子是在其结构中具有极性和非极性部分的分子。以这些分子为特征的化合物对许多生物和工业过程都是必要的。

[0341] 在这项研究中,我们应用两亲性产品,诸如卵磷脂、花生酱、杏仁黄油、大豆黄油和饼干黄油作为乳酸片球菌NRRL B-50517发酵培养物的可选载体。过量的两亲性产品可以保护乳酸片球菌NRRL B-50517发酵培养物免受苛刻的干热或湿热处理。将两亲性产品的干燥粉末和细菌冷冻干燥的发酵培养物的干燥粉末与油混合后,两亲性产品的独特性质可以形成脂质膏,并且起到乳酸片球菌发酵培养物的载体的作用,以经受住干热处理或与用于食品处理的巴氏灭菌过程类似的热水处理。

[0342] 有几种方法将益生菌包括在巴氏灭菌的食物/饲料产品中。理想的方法是将益生菌一起包括在食物/饲料成分中,然后进行巴氏灭菌过程,其可以包括热水处理。或者,可以在巴氏灭菌后将食物/饲料成分分配到益生菌组合物中。这可以通过在果汁/液体温度达到规定的巴氏灭菌温度后移除热水处理过的果汁/液体,并立即将其与益生菌和两亲性产品的混合物混合来证明。因此,当热水/液体达到理想的温度时,以下实验将热水热处理应用于益生菌和两亲性产品的混合物立即、5分钟和10分钟,然后进行测定以确定这些热处理之后活益生菌的数量。在这些努力中,我们可以证明两亲性产品与益生菌一起能够经历热处理,例如巴氏灭菌过程。

[0343] 卵磷脂被定义为磷脂酰胆碱,代表来自植物和动物来源的中性和极性脂质的天然混合物。它在水中溶解度低,但是是一种优异的乳化剂。在水溶液中,其磷脂可以形成脂质体、双层片、胶束或层状结构,这取决于水合作用和温度。这导致一种通常被归类为两亲性的表面活性剂。

[0344] 在这项研究中,我们应用两亲性产品,诸如卵磷脂、花生酱、杏仁黄油、大豆黄油和饼干黄油作为乳酸片球菌NRRL B-50517发酵培养物的可选载体。过量的两亲性产品能够保护乳酸片球菌NRRL B-50517发酵培养物免受苛刻的干热或湿热处理。将两亲性产品的干燥粉末和细菌冷冻干燥的发酵培养物的干燥粉末与油混合后,两亲性产品的独特性质能够形成脂质膏并承载乳酸片球菌发酵培养物以使其更耐热,例如热水处理。

[0345] 表13. 卵磷脂与乳酸片球菌发酵培养物的混合物的干热处理

[0346]

益生菌	高温处理	#活的乳酸片球菌 (cfu/g) *	乳酸片球菌的存活%
乳酸片球菌 NRRL B-50517	对照 (室温)	$1.68 \times 10^8$	100%
	65°C 30 分钟	$3.4 \times 10^7$	20.24%
	65°C 30 分钟+ 85°C 10 分钟	$4.0 \times 10^6$	2.38%
	65°C 30 分钟+ 85°C 30 分钟	$7.6 \times 10^5$	0.45%
乳酸片球菌 NRRL B-50517+卵磷脂	对照(室温)	$1.23 \times 10^8$	100%
	65°C 30 分钟	$1.00 \times 10^8$	81.63%
	65°C 30 分钟+ 85°C 10 分钟	$1.45 \times 10^7$	11.84%
	65°C 30 分钟+ 85°C 30 分钟	$6.00 \times 10^6$	4.90%

[0347] \*:将0.2g以麦芽糊精为载体的乳酸片球菌NRRL B-50517冷冻干燥发酵培养物(10亿cfu/g)用于这些测试。所有加热的样品。用数字探针验证温度。将样品在65°C下预热30分钟,然后加入到85°C的干热中适当的时间。将粉末从加热中取出并在室温下放置冷却10分钟。将干燥粉末加入5ml盐水中,混合并置于盐水中5分钟,然后铺在MRS平板上,在37°C培养箱中过夜并计数生存能力。

[0348] 将1.75g向日葵卵磷脂和1.75g乳酸片球菌NRRL B-50517(10亿cfu/g)粉末中的0.2g(5亿cfu/g)粉末转移到称重纸上。将样品在65°C下加热30分钟,然后冷却10分钟。将其其他65°C处理过的样品转移到85°C10分钟和30分钟,然后冷却10分钟。用数字探针验证温度。溶解于5ml盐水中,然后进行所需稀释,并将100 $\mu$ l铺于MRS琼脂平板上,并在37°C下培养过夜以进行生存能力计数。

[0349] 结果:

[0350] 与仅热处理的乳酸片球菌冻干发酵培养物相比,将卵磷脂作为乳酸片球菌冻干发酵培养物的载体使在不同热处理下细菌的存活率提高了5至10倍。

[0351] 表14. 卵磷脂与乳酸片球菌发酵培养物的混合物的湿热处理



[0352]

热处理温度	培养时间	活的乳酸片球菌的# (cfu/g) *	存活%
80℃	立即	$1.18 \times 10^8$	37.11%
	5 分钟	$4.16 \times 10^7$	13.08%
	10 分钟	$2.38 \times 10^6$	0.75%
82℃	立即	$2.58 \times 10^7$	8.11%
	5 分钟	$1.28 \times 10^6$	0.40%
	10 分钟	$3.00 \times 10^4$	0.01%
室温	—	$3.18 \times 10^8$	100%

[0353] \*:将0.5g样品[1.4g乳酸片球菌NRRL B-50517冷冻干燥发酵培养物(100亿cfu/g)+8g向日葵卵磷脂+9mL橄榄油]转移至含有1ml蒸馏水的Eppendorf管中并在80℃或82℃水浴中培养不同时间-在管内蒸馏水达到80℃或82℃后立即,继续在80℃或82℃下培养5分钟或10分钟,从水浴中取出管并使其冷却10分钟,进行所需的稀释,并将100μl铺于MRS琼脂平板上,并在37℃下培养过夜以进行生存能力计数。用数字探针验证温度。

[0354] 结果:将乳酸片球菌NRRL B-50517和向日葵卵磷脂的混合物用橄榄油重新悬浮为膏状物,浸没在水中,在80℃和82℃下进行热处理。当加热的细菌膏状物在达到80℃时从热水温度中移出时,将处理过的细菌膏状物转移到室温进行冷却过程,检测到超过37%的活细菌。类似地,热处理高达82℃,检测到约8.0%的活细胞。这些热处理过程是在产品通过巴氏灭菌过程后应用益生菌,并将这些热产物直接分配到容器中具有两亲性产物的乳酸片球菌发酵培养物中。

[0355] 表15. 在室温和37℃培养箱中储存的卵磷脂和乳酸片球菌混合物的稳定性

[0356]

储存天数	室温* ( $\times 10^8$ cfu/g)	37℃* ( $\times 10^8$ cfu/g)
第 1 天	5.96	9.93
第 2 天	5.59	8.33
第 7 天	4.93	2.24

[0357]	第 14 天	5.06	4.78
	第 28 天	8.41	5.74
	第 44 天	12.80	13.0
	第 60 天	5.03	3.63
	第 91 天	5.90	2.48

[0358] \*:每个样品具有1.4g 10B/g 5051混入7g向日葵卵磷脂粉末中(1.67B cfu/g)。制备4个样品:在室温下的A和B,以及放置在37℃培养中的不同的A和B。添加到干燥剂包中。使用0.2g粉末在5mL盐水中的稀释液,通过涡旋均匀混合30秒,并用盐水进行一系列稀释,并将100μl理想的稀释液铺在MRS平板上在37℃下过夜并对各菌落进行计数,进行检测。

[0359] 结果:卵磷脂和乳酸片球菌冷冻干燥的发酵培养物的混合物保存在室温或37℃下保持稳定超过90天。通过在室温和37℃下储存,乳酸片球菌的生存能力保持相似量的活细胞。

[0360] 表16. 卵磷脂对于提高80℃热处理后乳酸片球菌NRRL B-50517在酱油中的存活率的作用

[0361]

在80℃水浴中的培养时间	活乳酸片球菌的#(cfu/g)*	存活%
立即	$2.00 \times 10^8$	75.19%
5分钟	$2.06 \times 10^7$	7.74%
10分钟	$3.32 \times 10^6$	1.25%
对照(无热处理)	$2.66 \times 10^8$	100%
对照(无热处理)	$3.06 \times 10^8$	100%

[0362] \*:将0.5g膏状物(包括0.7g乳酸片球菌NRRL B-50517(100亿cfu/g),3.5g向日葵卵磷脂和4.5mL橄榄油)转移到装有1mL酱油的Eppendorf管中,并在80℃水浴中培养。当酱油温度达到80℃时,1)立即;2)在80℃下培养5分钟;3)在80℃下培养10分钟,然后从水浴中取出管,通过涡旋均匀混合30秒,并用盐水进行一系列稀释,并将100μl理想的稀释液铺在MRS平板上,在37℃下过夜,并对各菌落进行计数。用数字探针验证温度。

[0363] 表17. 卵磷脂对于提高80℃热处理后乳酸片球菌NRRL B-50517在不同汁液中的存活率的作用

[0364]

汁液	80℃水浴中的 培养时间	活乳酸片球菌的 NRRL B-50517# (cfu/g)*	存活%
V8 汁	立即	$6.40 \times 10^7$	42.95%
	5 分钟	$9.28 \times 10^6$	6.23%
	10 分钟	$1.07 \times 10^7$	7.18%
	对照(无热处理)	$1.49 \times 10^8$	100%
柠檬水	立即	$1.92 \times 10^8$	42.11%
	5 分钟	$1.04 \times 10^7$	2.28%
	10 分钟	$4.64 \times 10^6$	1.02%
	对照(无热处理)	$4.56 \times 10^8$	100%
蔓越莓汁	立即	$6.00 \times 10^7$	37.50%
	5 分钟	$1.10 \times 10^7$	6.88%
	10 分钟	$5.84 \times 10^5$	0.37%
	对照(无热处理)	$1.60 \times 10^8$	100%
梨汁	立即	$7.92 \times 10^7$	13.38%
	5 分钟	$5.60 \times 10^6$	0.95%
	10 分钟	$6.56 \times 10^6$	1.11%
	对照(无热处理)	$5.92 \times 10^8$	100%

[0365] \*:将0.5g膏状物(3.5g卵磷脂与0.7g乳酸片球菌NRRL b-50517 10B/g和4.5mL橄榄油混合物混合)转移到1mL液体汁中,在80℃的水浴中热处理指定的时间。管内温度探针用于确定内部温度何时达到80℃。当汁液的温度达到80℃时,1) 立即;2) 在80℃下培养5分钟;3) 在80℃下培养10分钟,然后从水浴中取出管,通过涡旋均匀混合30秒,并用盐水进行一系列稀释,并将100μl理想的稀释液铺在MRS平板上,在37℃下过夜,并对各菌落进行计数。用数字探针验证温度。

[0366] 表18.用益生菌和卵磷脂制备燕麦粉后用热水重新悬浮后检测活益生菌。

[0367]

益生菌	在 80℃水浴中的 培养时间	活乳酸片球菌的# (cfu/g)*	存活%
乳酸片球菌 NRRL B-50517+卵磷脂	82℃	$2.78 \times 10^8$	34.69%
	88℃	$1.88 \times 10^7$	2.35%
	93℃	$5.88 \times 10^7$	7.35%
乳酸片球菌 NRRL B-50517	88℃	$1.39 \times 10^6$	0.14%

[0368] \*:将28g燕麦称入热压处理过的玻璃碗中。1.4g 10B/g 5051与7g NOW向日葵卵磷脂和9mL橄榄油混合。1.1g 10B/g 5051与10g Skippy花生酱混合。向每个燕麦碗(每个3个)中加入1g卵磷脂(0.8B cfu)、PB(1B cfu)或普通1B/g 5051。将118mL水在微波炉中煮沸,在82℃、88℃和93℃下加入到每个碗中。用数字探针验证温度。将1g燕麦片混合物用5mL盐水稀释,稀释并铺在MRS上。

[0369] 实施例9-不同两亲性产品作为益生菌载体对热处理的影响

[0370] 在该实施例中,测试了不同两亲性产品的增强乳酸片球菌的耐热性的作用。

[0371] 表19.花生酱作为两亲性产品对于热处理后益生菌存活率的影响。

[0372]

热处理温度	热处理时间	乳酸片球菌的存活%
85℃	1 分钟	96.30%
	2.5 分钟	98.10%
	5 分钟	24.10%
	10 分钟	19.30%
	20 分钟	2.30%
95℃	1 分钟	26.90%
	2.5 分钟	29.20%
	5 分钟	0.52%
	10 分钟	0.11%

[0373] 将0.5g (10亿cfu/g)花生酱和乳酸片球菌NRRL B-50517的混合物置于Eppendorf

管中,并置于95℃下定时1分钟、2.5分钟、5分钟和10分钟,或置于85℃下定时1分钟、2.5分钟、5分钟、10分钟和20分钟。用数字探针验证温度。加入500 $\mu$ l盐水,涡旋,稀释并将100 $\mu$ l理想的稀释液在涂MRS平板上,在37℃下过夜,用于生存能力计数。通过将热处理下的活细胞数除以室温下(未进行热处理)的活细胞数来获得存活率。

[0374] 表20.花生酱作为两亲性产品对湿热处理后益生菌存活率的影响。

[0375]

80℃热水处理的时间	乳酸片球菌的存活%
立即	69.00%
1分钟	54.70%
2.5分钟	20.80%
5分钟	20.71%

[0376] 将0.5g (10亿cfu/g) 乳酸片球菌NRRL B-50517发酵培养物与花生酱的混合物置于含有1ml蒸馏水的1.5ml管中。将1.5ml管置于加热板上。时间为5分钟或直到温度达到80℃,然后时间为1分钟、2.5分钟和5分钟。用数字探针验证温度。热处理后,涡旋样品,稀释并将100 $\mu$ l理想的稀释液铺到MRS平板上,在37℃下过夜,进行生存能力计数。通过将热处理下的活细胞数除以室温下(未进行热处理)的活细胞数来获得存活率。

[0377] 表21.干热处理后不同两亲性产品对益生菌存活率的影响。

[0378]

两亲性产品	乳酸片球菌的存活%*
有大块的花生酱	9.7%
花生酱	14.5%
有机花生酱	15.49%
杏仁酱	24.05%
榛子酱	3.68%
饼干黄油	17.65%
巧克力用黄油	2.60%

[0379] \*:将空管在热板上预热至85℃。用数字探针验证温度。一旦空管加热,加入0.5mL (~0.5g花生酱和乳酸片球菌NRRL B-50517混合物(10亿cfu/g))。将混合物在85℃的热板上放置5分钟。加热后,将管放置在室温下~10分钟以冷却。一冷却,将混合物加入10mL盐水中。进行稀释,并将100 $\mu$ l理想的稀释液铺于MRS平板上,在37℃下过夜,计数生存能力。通过将热处理下的活细胞数除以室温下(未进行热处理)的活细胞数得到存活率。

[0380] 表22.花生酱对于提高80℃热处理后不同汁液中乳酸片球菌NRRL B-50517存活率的作用

[0381]

汁液	乳酸片球菌的存活率% *		
	立即	80℃下 5 分钟	80℃下 10 分钟
梨	3.46%	0.14%	0.13%
酱油	40.71%	14.18%	0.31%
V8 汁	4.06%	0.22%	0.03%
黑醋 (Balsamic Vinaigrette)	25.96%	0.41%	0.15%
Lemonade	12.24%	5.80%	0.64%
鹤樱(Crane Cherry)	7.36%	7.16%	1.00%

[0382] \*:0.5g乳酸片球菌NRRL B-50517发酵培养物和卵磷脂的混合物[通过将3.5g卵磷脂与0.7g乳酸片球菌NRRL B-50517 (100亿cfu/g) 和4.5mL橄榄油混合制备]。将0.5g混合物称入1mL液体中,在80℃的水浴中热处理指定的时间。管内温度探针用于确定内部温度何时达到80℃。立即:在温度达到后立即将管从水浴中取出。加热后,将管在室温下放置~10分钟以冷却。一冷却,将混合物加入10mL盐水中。进行稀释并将100μl理想的稀释液铺在MRS平板上,在37℃下过夜以进行生存能力计数。通过将热处理下的活细胞数除以室温下(未进行热处理)的活细胞数来获得存活率。

[0383] 虽然已经示出并描述了目前被认为是本发明的优选实施方式的内容,但是本领域技术人员将认识到,在不脱离本申请中描述的本发明的精神和范围的情况下,可以做出其他和进一步的实施方式。并且本申请包括在本文阐述的权利要求的预期范围内的所有这些修改。本文提及和/或引用的所有专利和出版物通过引用并入本文,其程度如同每个单独的出版物被具体和单独地指示已通过引用整体并入。

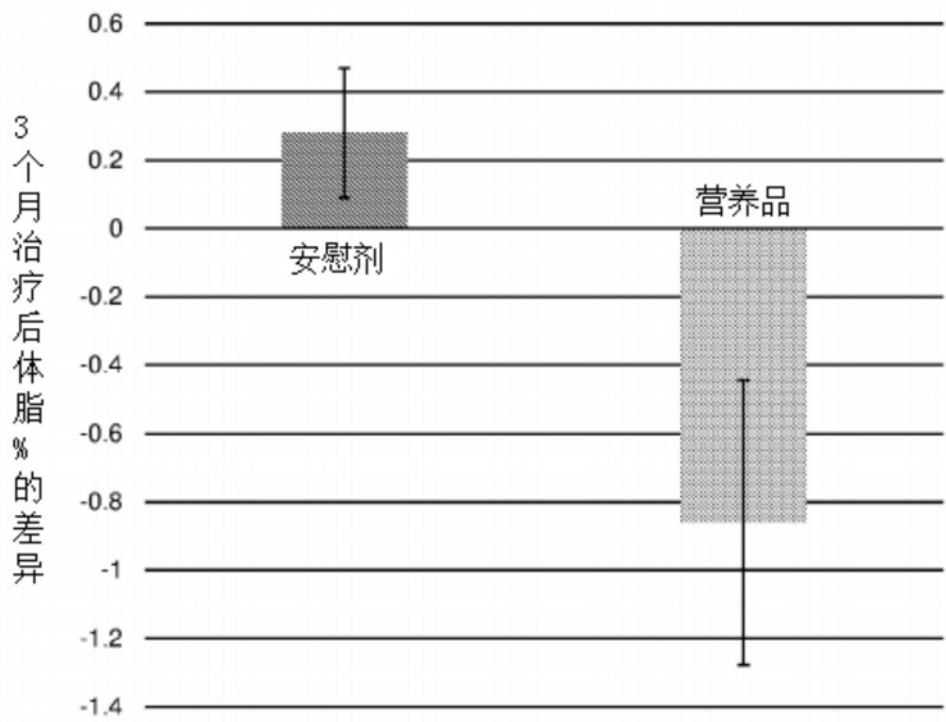


图1

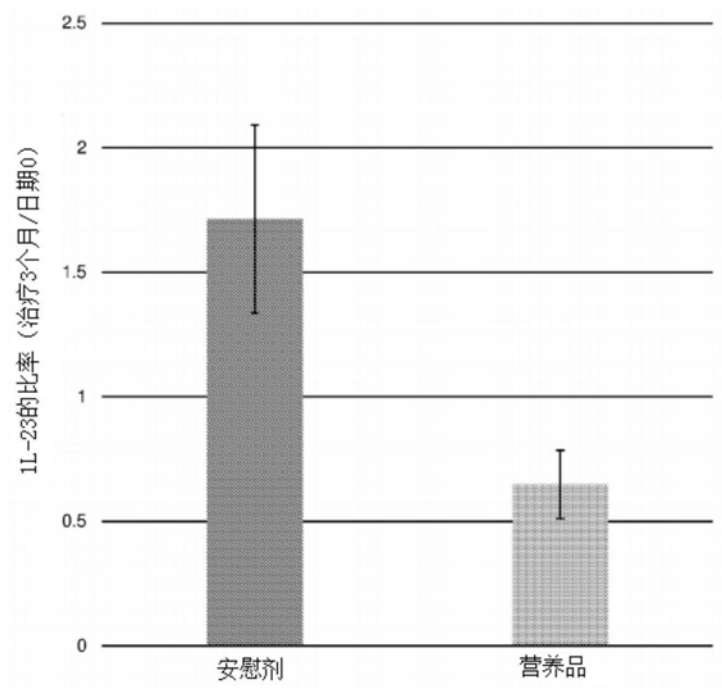


图2

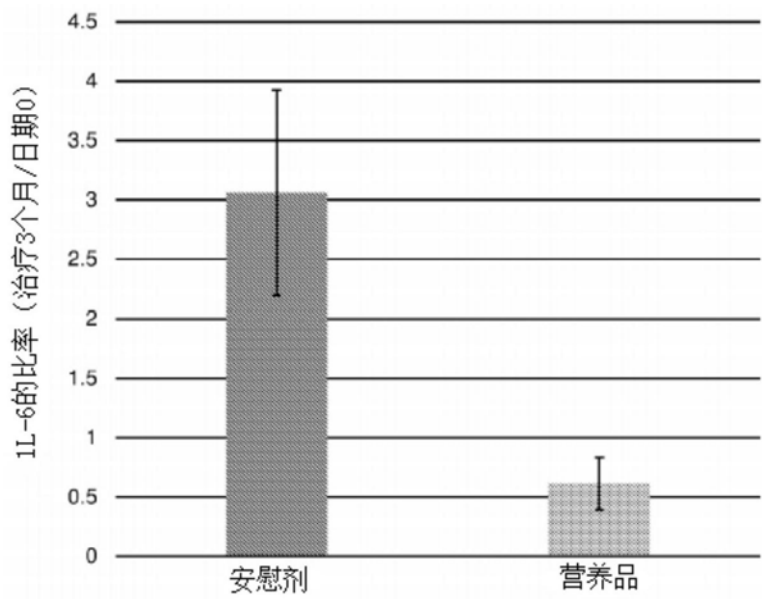


图3

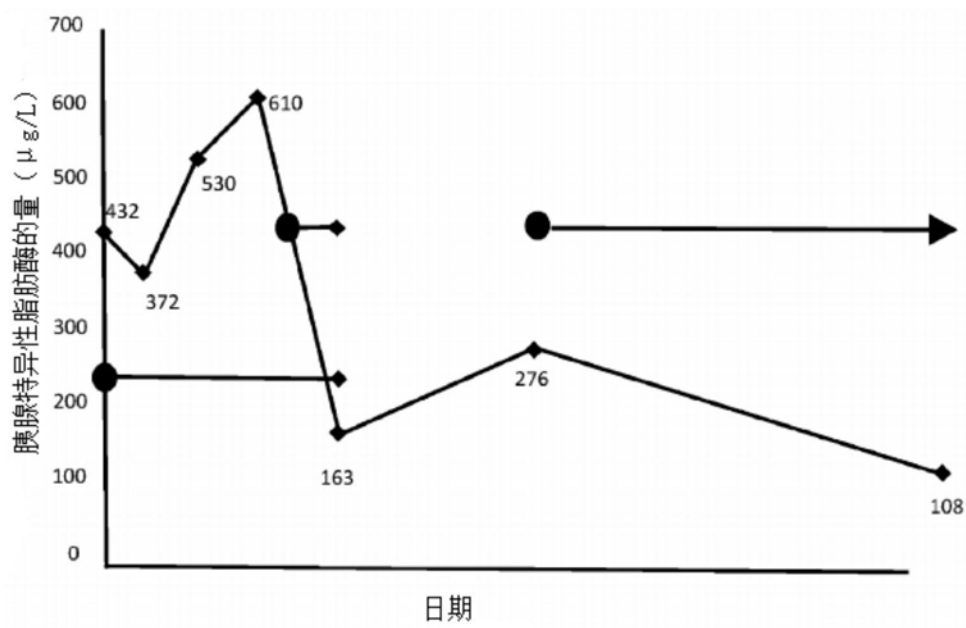


图4





图5

玻璃：油、醋

铝：饮品、零食



塑料：酸奶、奶制品、  
苹果酱、OTC物品

纸/纸盒：汁、孩子饮品

图6