

(1)

九、發明說明

本申請案主張 2005 年六月 1 日提出申請的美國臨時申請案 60/686,390 之優先權，其全文以引用方式納入本文中。

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關一種在嬰兒中模擬人乳寡糖的功能性屬性之方法。

【先前技術】

嬰兒腸道微生物相 (microflora) 在出生後第一個數星期內就快速地建立了。此種腸殖生的本質初期係由早期暴露於環境微生物來源以及嬰兒的健康所決定。嬰兒餵母乳或餵配方也對腸細菌數量具有強烈影像。

於餵母乳的嬰兒中，在諸腸細菌中主要為雙歧桿菌屬 (*Bifidobacterium* spp.)，而以鏈球菌屬 (*Streptococcus* spp.) 和乳桿菌屬 (*Lactobacillus* spp.) 為較不常見的貢獻者。相反地，餵配方的嬰兒之腸微生物相更為多樣性，含有雙歧桿菌屬和擬桿菌屬 (*Bacteroides* spp.) 以及更具致病性生物，葡萄球菌 (*Staphylococcus*)，大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 和梭菌 (*Clostridium*)。此外，在餵母乳嬰兒和餵配方嬰兒兩者的糞便中雙歧桿菌變種也彼此不同。

雙歧桿菌通常被認為是“有益”細菌且已知可對抗病原

(2)

性細菌的殖生。此可能透過對細胞表面受體的競爭，對必需養分的競爭，抗微生物劑的產生，及抑制性化合物的產生（包括可減低糞便 pH 及潛在地抑制病原性細菌之短鏈脂肪酸（SCFA））等而發生。雙歧桿菌也與兒童和嬰兒對胃腸道（GI）和呼吸感染的抗性以及增強的免疫功能相關聯。所以，以雙歧桿菌為主宰的腸內環境之促進已經變成餵配方的嬰兒所用營養調合物開發中的目標。

人乳（HM）含有許多種因子可能有助於嬰兒腸道微生物相中的雙歧桿菌生長及數量。於此等因子中，有超過 130 種不同的寡糖之複雜混合物，彼等達到高達 8-12 克／升在過渡奶和成熟奶中之含量。Kunz, *et al.*, *Oligosaccharides in Human Milk: Structure, Functional, and Metabolic Aspects*, *Ann. Rev. Nutr.* 20:699-722 (2000)。此等寡糖對上胃腸道中的酵素作用具有抗性且可完整地到達結腸，於該處彼等可用為結腸發酵所用基質。

HM 寡糖據信可誘發結腸微生物相中雙歧桿菌數目之增加，同時減少潛在致病性細菌的數目。Kunz, *et al.*, *Oligosaccharides in Human Milk: Structure, Functional, and Metabolic Aspects*, *Ann. Rev. Nutr.* 20:699-722 (2000); Newburg, *Do the Binding Properties of Oligosaccharides in Milk Protect Human Infants from Gastrointestinal Bacteria?*, *J. Nutr.* 217:S980-S984 (1997)。HM 寡糖可能增加雙歧桿菌數目及減少潛在致病性細菌數目的一種方式為經由作為競爭性受體及抑制病原

(3)

對細胞表面的結合。Rivero-Urgell, *et al.*, *Oligosaccharides: Application in Infant Food*, *Early Hum. Dev.* 65(S): 43-52 (2001)。

除了減少病原性細菌的數目及促進雙歧桿菌數量之外，當 HM 寡糖發酵之時，彼等會產生 SCFAs 諸如乙酸、丙酸和丁酸。此等 SCFA 類經認為有助益於熱值含量，作為腸表皮的主要能源，刺激在結腸內的鈉和水之吸收，以及增強小腸的消化和吸收。此外，SCFA 經認為可經由調制胃腸發育和免疫功能而助益整體胃腸健康。

HM 寡糖發酵也可減低糞便氨、胺、和酚濃度，彼等業經指出為糞便的主要臭味成分，且為具毒性者。Cummings & Macfarlane, *The Control and Consequences of Bacterial Fermentation in the Human Colon*, *J. Appl. Bacteriol.* 70:443-459 (1991); Miner & Hazen, *Ammonia and Amines: Components of Swine-Building Odor* *ASAE* 12:772-774 (1969); Spoelstra, *Origin of Objectionable Components in Piggery Wastes and the Possibility of Applying Indicator Components for Studying Odour Development*, *Agric. Environ.* 5:241-260 (1980); O'Neill & Phillips, *A Review of the Control of Odor Nuisance from Livestock Buildings: Part 3. Properties of the Odorous Substances which have been Identified in Livestock Wastes or in the Air Around them* *J. Agric. Eng. Res.* 53:23-50 (1992)。

(4)

由於 HM 內含有寡糖之結果，餵母奶的嬰兒之 SCFA 含量分佈與餵配方的嬰兒非常地不相同。例如，哺母奶嬰兒實質上不產生丁酸，其總 SCFA 產量中約 96% 為乙酸。Lifschitz, et al., *Characterization of Carbohydrate Fermentation in Feces of Formula-Fed and Breast-Fed Infants*, *Pediatr. Res.* 27:165-169 (1990); Siigur, et al., *Faecal Short-Chain Fatty Acids in Breast-Fed and Bottle-Fed Infants*. *Acta. Paediatr.* 82:536-538 (1993); Edwards, et al., *Faecal Short-Chain Fatty Acids in Breast-Fed and Formula-Fed Babies*, *Acta. Paediatr.* 72:459-462 (1994); Parrett & Edwards, *In Vitro Fermentation of Carbohydrates by Breast Fed and Formula Fed Infants*, *Arch. Dis. Child* 76:249-253 (1997)。相反地，雖然餵配方嬰兒也以乙酸（74%）為糞便中的主要 SCFA，彼等也含有顯著量（23%）的丙酸及少量（3%）的丁酸。此種在哺母奶嬰兒與餵配方嬰兒之間的 SCFA 含量分佈差異可能影像餵配方嬰兒的能量、消化及整體健康。

因為牛奶及以牛奶為基底的市售嬰兒配方僅提供微量的寡糖，所以常使用益生菌（prebiotics）來補充餵配方嬰兒的食譜。益生菌業經定義為“不可消化性食物成分，其經由選擇性地刺激在結腸中可改善宿主健康的一或有限數目的細菌之生長及／或活性而有益地影響宿主”。Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B., *Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota-Introducing the Concept of*

(6)

綜上所述，有益者為提供一種益生性物質，其可模擬人奶寡糖在嬰兒體內的功能屬性，諸如增加嬰兒腸道內有益細菌的數量和物種及類似於哺母乳嬰兒的 SCFA 分佈型態之產生。此外，該益生性物質須為嬰兒可耐受者且必須不會產生過多的氣體、腹部膨脹、氣脹或腹瀉。

【發明內容】

發明總論

所以，概述之，本發明係關於一種新穎的於食用配方的嬰兒中模擬人乳寡糖的功能性屬性之方法，該方法包括給該嬰兒投予治療有效量的聚右旋糖（polydextrose）（PDX）。

本發明也有關一種新穎的增加食用配方的嬰兒體內有益細菌的數量和物種之方法，該方法包括給該嬰兒投予治療有效量的 PDX。

於另一方面中，本發明係有關一種新穎的在食用配方的嬰兒體內產生類似於對食用人乳的嬰兒者的短鏈脂肪酸（SCFA）之方法，該方法包括給該嬰兒投予治療有效量的 PDX。特定言之，PDX 可造成 SCFA 分佈型態具有增加的乙酸含量及減低的丁酸含量。

於又另一方面中，本發明係關於一種新穎的減低食用配方的嬰兒腸道內益生素發酵的速率和程度之方法，該方法包括給該嬰兒投予治療有效量的 PDX。更特別者，本發明可減少嬰兒腸道內的總氣體產生以及二氧化碳產生。

(7)

於本發明達到的數項優點之中，其可為嬰兒良好的耐受且模擬人乳寡糖在嬰兒體內的功能屬性，諸如增加嬰兒腸道內的有益細菌之數量和物種，使糞便特性最優化，及產生類似於食用母乳的嬰兒之 SCFA 分佈型態。

較佳具體實例之詳細說明

至此要詳細參照本發明具體實例，下面敘述一或多個實施例。每一實施例係經提出用以解說本發明，而非限制本發明。事實上，諳於此技者皆明白可於本發明中做出各種修飾和變異而不違離本發明旨意或範圍。例如，可以使用作為一具體實例的部份所示出或說明的特徵於另一具體實例中而產生又另一具體實例。

如此，本發明理應將此等修飾和變異涵蓋在後附申請專利範圍的範圍及彼等的等效範圍之內。本發明的其他目的、特徵和方面皆揭示於下面詳細說明中或可從彼獲得明白。諳於此技者皆了解本討論僅為示範具體實例的說明，且無意用以限制本發明的更廣方面。

定義

在用於本文中之時，術語“益生菌”意指不可消化的食物成分，其可經由選擇性地刺激結腸內可能改善宿主健康的一或有限數目的細菌之生長及／或活性而有益地影響宿主。

術語“益生菌”(probiotic)意指具有低或不具病原性

(8)

，對宿主健康施發有益效應之微生物。

於用在本文中時，術語“嬰兒”意指小於約一歲的人類。

“治療有效量”於用在本申請案中，意指可提供對象體內益生菌性效用之量。

術語“模擬”，於用在中係意指具有或採取形式或外觀，或具有或產生相似微狀。

術語“功能性屬性”意指會引起某些事情發生的內在品質或特性。本發明人乳寡糖所具功能性屬性之例子可包括有益細菌的數量和物種之增加，高乙酸和低丁酸含量的 SCFA 分佈型態之產生，及益生菌在腸道內的緩慢發酵速度和低發酵程度之產生。

於用在本文中之時，術語“嬰兒配方”意指取代人乳以滿足嬰兒營養要求之組成物。於美國內，嬰兒配方的含量係由 21 C.F.R. Sections 100, 106, 和 107 中所述聯邦法規所指定。此等法規界定出巨量養分、維生素、礦物質、和其他成分之含量以期模擬人乳的營養和其他性質。

發明

根據本發明，發現一種新穎的模擬人乳寡糖在食用配方的嬰兒體內所具功能性屬性之方法。該方法包括提供治療有效量的 PDX 給嬰兒。PDX 的投予產生類似於食用人乳的嬰兒的 SCFA 分佈型態且為嬰兒身體所良好耐受者。

PDX 為一種不可消化的醣，係從無規交聯的葡萄糖和

(9)

山梨糖醇所合成。其在上 GI 道中不被消化且在下 GI 道中只部份發酵，使其成為消化性健康的有益成分。PDX 的生理效益包括增加糞便體、減短移行時間、降低糞便 pH 及減低結腸中腐敗性物質的濃度。於成人中，PDX 攝取也經證明有助於腸中有益細菌的促進和生長及 SCFA 之產生。

PDX 業經根據其在 GI 道中的功能而鑑定為成人的益生性物質。例如，Mayra-Makinen 等人的美國專利申請第 20040062758 號係有關一種組成物，其包含一種益生菌及一或多種益生素，其中該益生素可為 GOS、寡宮澱糖 (palatinoseoligosaccharide)、大豆寡糖、寡龍膽糖、木糖低聚物、不可分離性澱粉、乳蔗糖、LOS、乳糖醇、甘露醇、或 PDX。類似地，給 Kan 的美國專利第 4,859,488 號係關於一種可用來治療便秘的液體食物，其包含 PDX 和寡糖。

不過，PDX 尙未經鑑定為可提供本發明效益的益生素及可給嬰兒服用。嬰兒的腸微生物相係熟知為比成人發展得較低者。雖然成人微生物相係由超過 10^{13} 微生物及近乎 500 物種所組成，不過嬰兒腸微生物相只含有一部份的彼等微生物，包括在絕對數目和物種多樣性兩者之上者。因為在嬰兒腸與成人腸之間在細菌數量和物種上有鉅大差異，所以不能假設具有對成人有益的功效之益生性物質也具有對嬰兒有益的效用。

於成人體內，PDX 攝取業經顯示會增加乙酸和丁酸的產生。因為在食用母乳的嬰兒體內未看到顯著含量的丁酸

(10)

且若在嬰兒腸內產生明顯量的丁酸都與有害效應相關聯，所以根據所觀察到的在成人 GI 系統內的作用通常都不認為 PDX 對嬰兒營養為恰當者。因此，令人訝異且預料之外者，PDX 實際上竟然係經代謝主要的乙酸和丙酸，而丁酸形成得很少。如此，不僅 PDX 對嬰兒腸道內有益細菌的數量和物種具有正面影響，而且會產生非常類似於食用人乳的嬰兒所產生且為嬰兒所極良好地耐受者之 SCFA 分佈型態。

一有關 PDX 在嬰兒服用範疇中之特別參考資料實際地教導到與本發明相反的方面。在 Rautonen 的美國專利申請案第 20030157146 號中，其斷言 PDX 可刺激嬰兒的免疫系統。不過，在該申請案中，申請人揭示，PDX 實際上會減少嬰兒腸中雙歧桿菌屬的數量（Rautonen 申請案，第 0074 段）。申請人經由提及“豐盛的雙歧桿菌也可能造成較不合宜的生理學效應諸如腸細菌性疾病及免疫壓抑”（Rautonen 申請案，第 0069 段）而證明此結果。

因為該參考資料提及 PDX 實際上會減少嬰兒腸中的雙歧桿菌數量，所以其係與本申請案的教導直接矛盾者。此外，該參考資料沒有證實 PDX 會增加乙酸的產生，減少丁酸的產生或減低諸益生菌在嬰兒腸內的發酵速率。

於本發明方法中，為了模擬人乳寡糖的功能性屬性，乃給嬰兒投予治療有效量的 PDX。PDX 的治療有效量可在每日投予下為約 1.0 克／升與 10.0 克／升之間。於另一具體實例中，每日投予時 PDX 的治療有效量可在 2.0

(11)

克 / 升與 8.0 克 / 升之間。

PDX 在商業上可得自多種來源。例如，STA-LITE® PDX 可從位於 Salt Lake City, UT.的 Honeyville Grain, Inc.取得 5 磅袋裝品。或者，可在商業上從位於英國的 Danisco Sweeteners, Ltd.取得 Litesse® Ultra™ PDX。

PDX 頗適合摻加在嬰兒配方中，因其只含 1 卡 / 克而相對者典型的維生素為 4 卡 / 克之故。所以，其在嬰兒配方中的添加不會改變該組成物的物理或味覺特性。

於本發明方法中，PDX 的投予形式不具關鍵性，只要投予治療有效量即可。最方便者，可將 PDX 補充到嬰兒配方內，就可給嬰兒食用。

用於本發明中的嬰兒配方較佳者為在營養上完全者且典型地含有適當類型和含量的脂質、醣類、蛋白質、維生素和礦物質。脂質或脂肪的含量典型地可在從約 3 至約 7 克 / 100 仟卡之間變異。蛋白質的量典型地可在從約 1 至約 5 克 / 100 仟卡之間變異。醣含量可在從約 8 至約 12 克 / 100 仟卡之間變異。蛋白質來源可為技藝中所用任何者，如脫脂奶、乳清蛋白、酪蛋白、酪蛋白性蛋白質、大豆蛋白、水解蛋白質、胺基酸、和類似者。醣將可為技藝中所用的任何者，如乳糖、葡萄糖、玉米糖漿固體、麥芽糊精、蔗糖、澱粉、玉米糖漿固體、和類似者。脂質源可為技藝中所用的任何者，例如植物油諸如棕櫚油、大豆油、棕櫚油脂、椰子油、中鏈甘油三酸酯油、高油酸葵花油、高油酸紅花油、和類似者。

(13)

PDX : GOS 組合物的治療有效量可在每日投予時為在約 1.0 克 / 升與 10.0 克 / 升。於另一具體實例中，PDX : GOS 組合物的治療有效量為每日投予約 2.0 克 / 升與 8.0 克 / 升之間。於一特別具體實例中，PDX-GOS 的治療有效量可為每日投予約 2 克 / 升的 PDX 與 2 克 / 升的 GOS。

於本發明另一特別具體實例中，係將 PDX 與 LOS 組合投予。LOS 為一種從 D-半乳糖和 D-果糖以 β -葡萄糖苷鍵聯結合成的半合成性雙糖。其可抗拒人類消化性酵素的水解，但會在小腸中發酵。其係高度可溶者且具有甜味。LOS 業經鑑定為一種益生菌且可用來投予給嬰兒（Bindels 等人美國專利申請第 20030072865 號）。LOS 可在商業上得自多種來源。

於此具體實例中，PDX 與 LOS 可用在約 9 : 1 與 1 : 9 之間的比例投予。於另一具體實例中，PDX 對 LOS 的比例可在約 5 : 1 與 1 : 5 之間。於又另一具體實例中，PDX 對 LOS 的比例可在約 3 : 1 與 1 : 3 之間。於一特別具體實例中，PDX 對 LOS 的比例可為約 5 : 5。於另一特別具體實例中，PDX 對 GOS 的比例可為約 8 : 2。

PDX : LOS 組合物的治療有效量可在每日投予時間約 1.0 克 / 升與 10.0 克 / 升之間。於另一具體實例中，PDX : LOS 組合物的治療有效量可在每日投予時約 2.0 克 / 升與 8.0 克 / 升之間。於一特別具體實例中，PDX : LOS 組合物的治療有效量可在每日投予時為約 2 克 / 升的 PDX

(14)

和 2 克 / 升的 LOS。

於本發明又另一具體實施例中，係將 PDX 組合 GOS 和 LOS 兩者後投予。於此具體實施例中，PDX : GOS : LOS 組合物可用約 50 : 33 : 17 的比例投予。或者，PDX : GOS : LOS 組合物的比例可為約 1 : 1 : 1。於一特別具體實施例中，PDX : GOS : LOS 比例可為約 1 : 1.5 : 1。

PDX : GOS : LOS 組合物的治療有效量可在每日投予時為在約 1.0 克 / 升與 10 克 / 升之間。於另一具體實施例中，PDX : GOS : LOS 組合物的治療有效量在每日投予時可在約 2.0 克 / 升與 8.0 克 / 升之間。於一具體實施例中，PDX : GOS : LOS 組合物的治療有效量可為約 2 克 / 升 PDX，2 克 / 升 GOS 和 2 克 / 升 LOS。於一特別具體實施例中，PDX : GOS : LOS 組合物的治療有效量可為每日投予約 2 克 / 升的 PDX，1.32 克 / 升的 GOS 和 2.6 克 / 升的 LOS。於另一具體實施例中，PDX : GOS : LOS 組合物的治療有效量為每日投予約 4 克 / 升的 PDX，2.64 克 / 升的 GOS 和 3.6 克 / 升的 LOS。

於本發明一具體實施例中，可將 PDX 與一或多種益生菌組合後投予給嬰兒。技藝中已知的任何益生菌都可為此具體實施例所接受。於一特別具體實施例中，該益生菌係選自雙歧桿菌屬或乳桿菌屬所組成的群組中。於一具體實施例中，該益生菌的鼠李糖乳桿菌 GG (LGG) (ATCC 編號 53103)。於另一具體實施例中，該益生菌為乳酸雙歧桿菌 (*Bifidobacterium lactis*)。於一特別具體實施例中，該益

(15)

生菌為可得自位於 Milwaukee, WI 的 Chr. Hansen Biosystems 之乳酸雙歧桿菌 Bb-12。

於本發明另一具體實例中，該嬰兒配方可包含其他活性成分，諸如長鏈多不飽和脂肪酸 (LCPUFA)。適當的 LCPUFA 包括，但不限於， α -亞麻油酸、 γ -亞麻油酸、亞麻油酸、亞麻脂酸、廿碳五烯酸 (EPA)、花生四烯酸 (ARA) 和二十二碳六烯酸 (DHA)。於一具體實例中，係將 PDX 與 DHA 組合投予。於另一具體實例中，係將 PDX 與 ARA 組合投予。於又另一具體實例中，將 PDX 同時與 DHA 和 ARA 兩者組合投予。市售含 DHA、ARA 或彼等的組合之嬰兒配方可補充 PDX 且用於本發明中。例如，含有效量 DHA 和 ARA 的 Enfamil[®] LIPIL[®] 係市面上可取得者且可補充 LGG 後用於本發明中。

於一具體實例中，將 DHA 和 ARA 兩者都與 PDX 組合投予。於此具體實例中，ARA : DHA 重量比例典型地為從約 1 : 3 至約 9 : 1。或者，此比例可為從約 1 : 2 至約 4 : 1。於又另一具體實例中，該比例可為從約 2 : 3 至約 2 : 1。於一特別具體實例中，該比例為約 2 : 1。

DHA 在本發明一具體實例中的有效量典型地為每公斤體重每日約 3 毫克至每公斤體重每日約 150 毫克。於本發明一具體實例中，該量為每公斤體重每日約 6 毫克至每公斤體重每日約 100 毫克。於另一具體實例中，該量為每公斤體重每日約 10 毫克至每公斤體重每日約 60 毫克。於又另一具體實例中，該量為每公斤體重每日約 15 毫克至

(16)

每公斤體重每日約 30 毫克。

ARA 在本發明一具體實例中的有效量典型地為每公斤體重每日約 5 毫克至每公斤體重每日約 150 毫克。於本發明一具體實例中，該量係每公斤體重每日約 10 毫克變異至每公斤體重每日約 120 毫克。於另一具體實例中，該量係每公斤體重每日約 15 毫克變異至每公斤體重每日約 90 毫克。於又另一具體實例中，該量係每公斤體重每日約 20 毫克變異至每公斤體重每日約 60 毫克。

DHA 在本發明所用嬰兒配方中的量典型地係從約 5 毫克 / 100 仟卡變異到約 80 毫克 / 100 仟卡。於本發明一具體實例中，其係從約 10 毫克 / 100 仟卡變異到約 50 毫克 / 100 仟卡；且於另一具體實例中，從約 15 毫克 / 100 仟卡至約 20 毫克 / 100 仟卡。於本發明一特別具體實例中，DHA 量為約 17 毫克 / 100 仟卡。

ARA 在本發明所用嬰兒配方中的量典型地為從約 10 毫克 / 100 仟卡變異到約 100 毫克 / 100 仟卡。於本發明一具體實例中，ARA 的量係從約 15 毫克 / 100 仟卡變異到約 70 毫克 / 100 仟卡。於另一具體實例中，ARA 量係從約 20 毫克 / 100 仟卡變異到約 40 毫克 / 100 仟卡。於本發明一特別具體實例中，ARA 量為約 34 毫克 / 100 仟卡。

用於本發明中補充含有 DHA 和 ARA 的油類之嬰兒配方可以使用技藝中已知的標準技術製造成。例如，可以經由置換一等量的通常在配方中所含的油，諸如高油酸葵花

(17)

油，而添加到配方中。就另一實施例而言，可經由置換等量的在不含 DHA 和 ARA 的配方中一般所含整體脂肪摻合物之其餘部份而在配方中添加含 DHA 和 ARA 的油。

DHA 和 ARA 的來源可為技藝中已知的任何來源。於本發明一具體實例中，DHA 和 ARA 的來源為單細胞油類，如在美國專利第 5,374,567；5,550,156；和 5,397,591 號中所教導者，彼等的揭示內容全文皆以引用方式納入本文。不過，本發明不僅限於此等油。DHA 和 ARA 可為天然或精煉形式。

於一具體實例中，DHA 和 ARA 來源實施地不含廿碳五烯酸（EPA）。例如，於本發明一具體實例中，該嬰兒配方含有少於約 16 毫克 EPA / 100 仟卡；於另一具體實例中，少於約 10 毫克 EPA / 100 仟卡；且於又另一具體實例中，少於約 5 毫克 EPA / 100 仟卡。一特別具體實例實質地不含 EPA。另一具體實例不含 EPA，其中該配方甚至不含微量的 EPA。

本發明嬰兒配方可使用技藝中已知的任何方法予以製備。於一具體實例中，係以粉末形式提供 PDX。其可與水和其他嬰兒配方成分在混合槽內混合。若配方中包括 GOS 及 / 或 LOG，彼等可用粉化或液體形式提供。然後可將混合物低溫滅菌，勻化且噴乾而製得成品粉末，或予以裝罐及甌封製成液體產品。

作為嬰兒配方投予的替代者，可將本發明維生素以不是與配方餵食整合之補品形式投予。例如，可用丸、片、

(18)

膠囊、囊片 (caplet)、粉、液體或凝膠之形式攝取 PDX。於此具體實例中，可將 PDX 與其他營養補充品諸如維生素組合攝取，或與 LCPUFA 補充品，諸如 DHA 或 ARA 組合攝取。

於另一具體實例中，可用適合於嬰兒的形式提供 PDX，該形式可為選自下列所組成的群組之中：食後配方 (follow-on formula)、飲料、奶、酸奶、果汁、以水果為基底的飲料、可咀嚼片、餅乾、脆餅、或彼等的組合。

於本發明方法中，嬰兒係食用配方者。於一具體實例中，嬰兒係自生出即食用配方。於另一具體實例中，嬰兒係從出生即哺以母乳到小於一歲的年齡，其後即食用配方，此時開始補充 PDX。

人乳寡糖可增加腸道中有益細菌的數量和物種，具有高乙酸及很低的丁酸含量之 SCFA 分佈型態，且緩慢發酵，避免過多氣體的產生。如在實施例中可看出者，PDX 單獨地或與其他益生菌組合地投予可以用來增加腸道中有益細菌的數量和物種，可將 SCFA 產生優先地偏移向更多的乙酸和丙酸產生，藉此限制丁酸產生，且可減緩腸道中的發酵速率使得氣體產生受到限制，使嬰兒的不舒適減到最小。如此，PDX 單獨地或與一或更多種其他益生菌的組合投予可以在食用配方的嬰兒模擬人乳寡糖的功能性屬性。

【實施方式】

下面的實施例係說明本發明的多個具體實例。在本發

(19)

明申請專利範圍的範圍內之其他具體實例可申請於此技者從思考本文所揭示的本發明說明書或實作而獲得明白。該說明書，與實施例一起，意欲僅視為示範性，而本發明範圍和旨意係由實施例後面的申請專利範圍所界定。於實施例中，除非另有不同的表明，否則所有百分比都是以重量為基準。

實施例 1

此實施例示範說明本發明所用的試管內 (in vitro) 糞便發酵模型。該試管內糞便發酵模型係模擬嬰兒結腸微生物區的作用。於發酵中，醣被消耗且產生 SCFA 和氣體。於發酵後，可以完成益生菌對所含微生物的數量和屬別之影響的分析。

表 1 列出所研究的個別醣類。

表 1：個別醣類

GOS : Vivinal GOS : Deb. No. 00026961 Borculo Domo Ingredients , 於 09/17/02 收到 , 純度 95.1%
LOS : Morinaga Lactulose Anhydride : MLC-A(F), Lot No. FRDL020926; Morinaga Milk Industry Co. Ltd ; 於 10/4/02 收到 ; 純度 97%
PDX : Sta-Lite III PDX : Lot No. DZ2K0351913 ; A.E. Staley
FOS : Raftilose P95 Fructo-oligosaccharides: Lot No. PCAB022B02; Raffinerie Notre-Dame/Orafti SA ; 於 9/6/02 收到 ; 純度 95.1%
PDX2 : Litesse [®] Ultra [™] PDX : 高分子量聚合物 , 最大值 22 000MW ; Danisco : Lot No. V360201
INU : Raffiline [®] HP ; 長鏈菊糖 DP≥23 (Lot no: hptoh11oh1; Orafti B.V.; 於 2002 年 10 月收到 ; D.S. 96.9% , 菊糖 99.9% , 蔗糖+果糖+葡萄糖 0.1%)

(20)

從年齡 2.5-1.3 個月的健康嬰兒收集糞樣。運作 5 個實驗組，每一實驗組使用不同的益生菌醣類組合。12 個嬰兒分配在第 1 和第 2 發酵組中，17 個嬰兒在第 3 發酵組中，19 個嬰兒在第 4 發酵組且 23 個嬰兒在第 5 發酵組中。於第 1-3 組中，只有 5 個嬰兒能夠授與可接受的樣品。分到第 1 發酵組的嬰兒的年齡分別為 4、4、4、6、6、6、8、8、9、9、9 和 10 個月大；第 2 發酵組中分別為 3、4、6、6、6、7、8、9、10、10、12 和 13 個月大；而第 3 發酵組中分別為 2、2.5、3、4、4、4、4.5、5、5、6、6、6、9、9、10、10 和 11 個月大。其樣品可用於發酵中的嬰兒之年齡為第 1 組：6、8、9、9、9 個月；第 2 組：4、8、10、12、13 個月；及第 3 組：2.5、5、6、10、11 個月。於第 4 發酵組中，10 個嬰兒（其中有一嬰兒授與二次）都能夠授與可接受的樣品。第 4 發酵組的授與者分別為年齡 2、2.5、4、5、7、9、9、10、11 和 15 個月大者。對於第 5 發酵組，有 12 個嬰兒能夠授與樣品，於其中選出 4 個最小的授與者。如此，授與者為 5、6、6.5 和 6.5 個月大者。

試管內糞便發酵係根據 Karppinen 的方法，其全部以引用方式納入本文。Karppinen S., *et al.*, *In Vitro Fermentation of Polysaccharides of Rye, Wheat, and Oat Brans and Inulin by Human Faecal Bacteria*, J. Sci. Food Agric. 80:1469-76 (2000)。

(21)

於本研究中，在 50 毫升瓶中稱取入 100 毫克醣樣品且使用 2 毫升碳酸鹽-磷酸鹽緩衝液在 pH 6.9 予以水合。將樣品保持在 5°C 厭氧條件下整夜直到製備出菌種為止。在嚴峻厭氧條件下於相同的緩衝劑中經由將剛排出的嬰兒糞便合併而製備糞便漿液（12.5%，重量／體積）。將 8 毫升的懸浮液計量到基質樣品且將瓶中密封於厭氧室內，得到 10%（重量／體積）的最後糞漿濃度。將樣品在 37 °C 下培育 1、2、4、8 或 24 小時。以類似方式在離心管中製備 0 小時樣品且使用液氮迅速冷凍。於所有發酵實驗中都包括不加醣的糞空白樣。

經由將瓶子從水溶中取出且將彼等放置在冰上而完成發酵，例外者為在氣體測量之前，將樣品保持在室溫下以立即採樣。測量氣體體積且將氣體樣品（5 毫升）注射到充氮上部空間瓶內。於採樣後將瓶子放置在冰上。將發酵樣轉移到離心管中，測量 pH 且從漿液中抽取一液份（2 毫升）供 SCFA 分析所用且用液氮迅速凍結。

實施例 2

此實施例係解說測定聚右旋糖作為食用配方的嬰兒所用益生菌之效用性時所需的材料和方法。特定言之，此實施例係示範說明分析 SCFA 和氣體所需的材料和方法。

用乙醚萃取 SCFA 且用氣體層析儀分析，如 Karppinen 等人所述者，其全文以引用方式納入本文。
Karppinen S., et al., *In Vitro Fermentation of*

(22)

Polysaccharides of Rye, Wheat, and Oat Brans and Inulin by Human Faecal Bacteria, J. Sci. Food Agric. 80:1469-76 (2000)。根據 Karppinen, 等人於上述引用資料所揭示, 以氣體層析術使用靜態上部空間技術在 30°C 下等溫地分析氣體 (氫氣、二氧化碳、甲烷、二硫化氫和氧, 作為品質管制)。

實施例 3

此實施例闡明 PDX 對於嬰兒結腸微生物區所產生的試內 SCFA 分佈型態之影響。圖 1 和 2 示出發酵速率在不同益生菌之間的變異。圖 1 示出總 SCFA (乙酸、丙酸和丁酸之總和) 的產生。圖 2 所示 pH 的減低也為 SCFA 產生的指示。

從此等圖可看出, PDX2 為可緩慢發酵的醱, 而 FOS、GOS 和 LOS 都可快速且完全地發酵。PDX2 的發酵速率可與穀類食物纖維相比。PDX2 不僅以最慢的起始速率發酵, 而且其發酵程度只稍高於糞空白樣。相反地, FOS 的發酵速率係快速得使其在第一採樣時點就幾乎完全消耗掉且在所試的諸益生菌之中產生最高量的 SCFAs。

如圖 3-5 中所示者, PDX2 發酵導致 24 小時後最高的丙酸產量及最低的丁酸產量。於 PDX 發酵中, 乙酸仍為產量最高的 SCFA, 雖然其初始速率比其他基質都遠較為慢。從 PDX2 產生丙酸的初始速率類似於其他基質者, 不過在發酵尾端時成為較高水平者。相反地, FOS、GOS 和

(26)

Bacteria Growing in the Human Large Intestine, J. Appl. Bacteriol. 75:373-380 (1993)。由於在本研究中來觀察到甲烷產生，因此假設二硫化氫係從初級氫所形成。Levitt, et al., *Gas Metabolism in the Large Intestine*, CRC Press, Boca Raton 131-154 (1995)。有可能因為在後面時點的進一步代謝成為二級氣體、二硫化氫，而沒有偵測到氫。

實施例 6

此實施例闡明測定 PDX 對於來自嬰兒結腸的微生物區之數量和物種的影響時所需的材料和方法。概述之，本實施例係利用嬰兒腸模型來評估某些益生性化合物。所用的根據成人形式之嬰兒腸試管內模型係由 2 個 100 毫升玻璃容器成串排列代表嬰兒結腸的近端區和遠端區所構成。進料流係經控制在慮及在嬰兒腸道中相對於成人腸道的較短通過時間之速率。要將結腸內的活體內 pH 差異模型化時，係乃容器 1 (V1) 控制在 pH 5.2 且將容器 2 (V2) 控制在 pH 6.7。溫度係以循環水浴控制在 37°C。進料和培養物容器都以磁棒攪拌且經由流入無氧的氮氣 (15 毫升/分) 而維持在厭氧性氣體環境之下。

在系統以嬰兒糞漿接種之後，讓兩個發酵器容器以批式模式保留 24 小時。此可使細菌數量在彼等的新環境中達到平衡且使密度增加。然後打開進料流且於其餘實驗時間中以連續培養模式運作發酵器。進料流速係經控制在 11.11 毫升/時。於此研究中，發酵器係運作 12 天，6 天

(28)

表 3. 授與者資料

授與者代碼	年齡	食物	發酵運轉
KB	16 週	SMA Gold	F1
JS	13 週	Cow & Gate	F2
F	19 週	SMA Gold 及 哺母乳	F3
AE	9½ 週	哺母乳	F4
AE	14 週	哺母乳	F5

發酵試驗所用嬰兒腸微生物菌相係由剛排出的嬰兒糞便所提供。通常需要至少 3.5 克的糞樣。將糞樣保留在紙尿布內，其在從嬰兒取出後立即由醫護員放到有打開的無氧性氣體裝的厭氧性瓶內。此要儘快（常在一小時內）收集與處理。

於實驗室中，從紙尿片取出糞便且稱重。經由將樣品勻化於無氧且預溫（在厭氧室內整夜）過的 1xPBS 中，使用勻漿器（stomacher）以中等速率進行 120 秒而製得 10%（w/v）糞便勻漿。

對每一發酵器容器接種 5 毫升的 10% w/v 糞便懸浮液。也採取一液份的糞便懸浮液（樣品 S）供分析所用。

FISH 細菌計數二重複需要 375 微升的糞便懸浮液樣品（樣品 S）或每一發酵器樣品。經由充分混合在 1.125 毫升冰冷之濾過的 4%（w/v）多聚甲醛 / PBS 溶液 pH 7.2 中將每一樣品固定且貯存在 4°C 整夜（或至少 4 小時）。

將固定好的樣品以 13,000 xg 離心 5 分鐘且丟棄上澄液。經由再懸浮於 1 毫升冷的濾過之 1xPBS 中清洗沈丸

(29)

兩次，每次都經由離心沈著細胞及丟棄上澄液。最後將沈丸充分地再懸浮於 150 微升濾過的 PBS 之中；然後於洞中混合入 150 微升 96% (v/v) 乙醇。然後將細胞製備物貯存在 -20°C 至少一小時再進一步處理。

於雜交步驟中，將 16 微升的細胞製備物（調到周溫）與 200 微升濾過且預溫熱過的 2x 雜交緩衝液（30.3mM Tris-HCl pH 7.2，1.4mM NaCl，含 15.1 毫升／升 10% (w/v) SDS）混合。將此混合物溫熱到恰當的雜交溫度，然後分別與探針（probe）（50 毫微克／微升）以 9：1 比例混合。之後將該雜交製備物送回雜交烤箱保溫整夜。

最後，將雜交後的細胞製備物收集在 0.2 微升濾器上供顯微鏡觀察所用。依細胞密度而定，將在 5 微升與 100 微升之間的細胞製備物加到經濾過，預溫（至雜交溫度）的清洗緩衝液（5-7 毫升 20mM Tris-HCl pH 7.2，0.9M NaCl）中。也於混合物中加入 20 微升的 DAPI（4',6-二脒基-2-苯基吲哚）以染色所有細胞且取得每一樣品的總細胞計數。然後將此真空過濾在 0.2m 聚碳酸酯濾器上且放置於顯微鏡載玻片上。為了減少螢光染料的褪色，乃在濾器上加一滴 SlowFade™（Molecular Probes）且用蓋玻片蓋上；然後將載玻片貯存在 4°C 黑暗中直到要用為止。使用螢光顯微術（Leitz, Wetzlar, Germany）在 550 奈米下計數帶有 Cy3 螢光探針的細菌；使用 UV 光計數經 DAPI 染色的細菌。在至少 15 個隨機選出的視域內計數細菌且使用此等的平均值來估測每毫升原樣品的總胞數。

(30)

爲了比較起見，按下表所列運作發酵試驗。

表 4. 發酵運作

發酵運作	試驗物質	
F1	FOS	
F2	人乳	PDX
F3	GOS	
F4	1:1 LOS:GOS	1:1 PDX:LOS
F5	LOS	1:1 PDX:LOS

實施例 7

此實施例闡述 PDX 對嬰兒腸道中細菌數量和物種之影響。於發酵運作 1 (F1) 中，在配方進料中添加 FOS 且在發酵器系統中運作。在傳統上認爲是良好益生性成分的 FOS 在 V1 中導致雙歧桿菌屬和梭菌屬的增加。及乳桿菌屬和擬桿菌屬的減少。於配方進料中加入 FOS 導致在 V2 中雙歧桿菌屬和乳桿菌屬含量沒有變化及梭菌屬和擬桿菌屬的增加。

於 F2 中，在平行的發酵器系統中運作 PDX 和人乳。人乳樣品係由產房提供且冷凍儲存。此等爲得自數個授與者的不定體積之早乳樣品。人乳進料係在沒有稀釋或沒有添加乳糖之下運作以維持寡糖和其他養分的可相比含量。人乳不夠與 PDX 發酵器平運作此發酵器 12 天。所以要更頻繁地在第 0、4、6 和 8 天採樣。爲了比較目的，在第 8，以及第 11 天從 PDX 發酵器採取額外樣品。

如所預期者，人乳可促進有益細菌（包括雙歧桿菌和

(32)

但也造成梭菌含量的增加。擬桿菌含量只在 V2 中增加。

整體而言，用人乳、GOS、FOS、PDX 和 PDX：GOS 組合時，V1 中相對於總細菌數量，雙歧桿菌的比例都增加，於 V2 中，GOS、PDX：GOS 組合和 LOS：GOS 組合都導致雙歧桿菌的增加。於 V1 中，梭菌相對於總數量的比例，在用人乳、GOS 和 PDX 時都減低，而在 V2 中，用人乳、PDX 和 LOS：GOS 組合時都減低。

於 V1 中，在用 LOS、PDX、人乳或 PDX 組合時，乳桿菌增加，而在 V2 中，用 LOS、PDX、人乳和 GOS 組合時，觀察到乳桿菌增加。V2 中乳桿菌百分比的增加在用 PDX 和 PDX、GOS 組合與 LOS：GOS 組合時特別顯著。

整體而言，PDX 在 V1 中可以有效地增加乳桿菌而減低梭菌和擬桿菌的含量，而使雙歧桿菌僅稍微增加。PDX：GOS 組合看起來也有利於雙歧桿菌，其在 pH 5.2 下可增加總菌數（雖則在不如四組中的百分比）且增加乳桿菌，不過其也具有增加擬桿菌數目之不利效應。

在本發明設計的模型系統中試驗人乳時，雙歧桿菌和乳桿菌的數目卻會增加，而梭菌數目減少。此種效應在使用 PDX，及 GOS，單獨者或與 LOS 和 PDX 組合者，之時，大都有一致地重複。在現行各種嬰兒配方中用到的另一種糖，FOS，在試驗下沒有產生相同的合宜結果。

實施例 8

此實施例闡述本發明嬰兒配方的一具體實例。

(34)

在高溫下加熱乳糖時會產生 LOS。所以，於本實施例中，產品含有內生的 LOS。內生 LOS 在產品中的含量為約 2 克 / 升。

實施例 9

本實施例示範說明本發明嬰兒配方的另一具體實例。

(36)

在高溫加熱乳糖時會產生 LOS。所以，在此具體實例中，產品含有加入及內生的 LOS。在產品中的 LOS 總含量，包括加入與內生 LOS 二種，為約 2.6 克 / 升。

實施例 10

此實施例示範本發明嬰兒配方的另一具體實例。

(38)

在高溫下加熱乳糖時會產生 LOS。所以，在本具體實例中，產品內包括加入與內生的 LOS。產品中 LOS 的總含量，包括加入與內生的兩 LOS，為約 3.6 克 / 升。

在本說明書中引用的所有參考資料，包括但不限於，所有論文、演示、專利、專利申請、報告、教科書、報告、手稿、小冊、書本、網際網路貼文、期刊論文、雜誌、和類似者，都以彼等的全文以引用方式納入本文。本文中對參考資料的討論僅為摘述作者所作論點而無意承認任何參考資料係構成先前技藝。申請人保留對所引參考資料的正確性和恰當性之質疑權利。

對本發明的此等和其他修飾與變異可由諳於此技者作出而不違離由後附申請專利範圍所特別敘述出之本發明旨意和範圍。此外，應了解者，各具體實例的諸方面可全部或部份地互換。再者，諳於此技者都了解前面說明部份僅為範例，且無意限制在此等後附申請專利範圍中進一步說明的本發明。所以，後附申請專利範圍的旨意和範圍應該不受其中所含較佳形式之說明所限制。

【圖式簡單說明】

為了更完全了解本發明，至此需要參照配合所附圖式之說明部份。

圖 1 示出在 GOS、LOS、PDX2 和 FOS 的發酵中之總 SCFA 產生。

圖 2 示出 GOS、LOS、PDX2 和 FOS 的發酵中之 pH

五、中文發明摘要

發明之名稱：於食用配方的嬰兒中模擬人乳寡糖的功能性屬性之方法

本發明係有關一種新穎的於食用配方的嬰兒之腸道中增加乙酸的產生、減少丁酸的產生、增加有益細菌的數量和物種數以及減緩益生元（prebiotics）的發酵速率之方法。該方法包括給嬰兒投予治療有效量的 PDX。

六、英文發明摘要

發明之名稱：

METHOD FOR SIMULATING THE FUNCTIONAL ATTRIBUTES OF HUMAN MILK OLIGOSACCHARIDES IN FORMULA-FED INFANTS

The present invention is directed to a novel method for increasing the production of acetate, decreasing the production of butyrate, increasing the population and species of beneficial bacteria and slowing the rate of fermentation of prebiotics within the gut of a formula-fed infant. The method comprises administration of a therapeutically effective amount of PDX to the infant.

七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1)圖

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

發明專利說明書

民國 98 年 9 月 修正

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：95118904

※申請日期：95年05月26日

※IPC分類：A23L 1/30

一、發明名稱：

(中) 於食用配方的嬰兒中模擬人乳寡糖的功能性屬性之方法

(英) Method for simulating the functional attributes of human milk

● oligosaccharides in formula-fed infants

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓名：(中) 美強生營養品公司

(英) MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY

代表人：(中) 1. 皮普爾 威廉

(英) 1. P'POOL, WILLIAM C.

地址：(中) 美國印地安那州艾凡士維西洛伊德高速公路 2400 號

(英) 2400 West Lloyd Expressway, Evansville, IN 47721-0001,

U.S.A.

國籍：(中英) 美國

U.S.A.

三、發明人：(共 7 人)

1. 姓名：(中) 拜昂 佩斯丘

(英) PETSCHOW, BRYON W.

國籍：(中) 美國

(英) U.S.A.

2. 姓名：(中) 羅伯特 麥克邁宏

(英) MCMAHON, ROBERT J.

國籍：(中) 美國

(英) U.S.A.

3. 姓名：(中) 格林 吉伯森

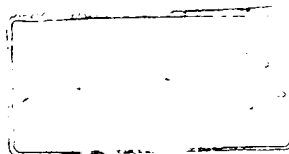
(英) GIBSON, GLENN R.

國籍：(中) 英國

(英) UNITED KINGDOM

98.94

849634



4. 姓名：(中) 羅伯 瑞史多
 (英) RASTALL, ROBERT A.
 國籍：(中) 英國
 (英) UNITED KINGDOM

5. 姓名：(中) 瑞尼亞 佐媚爾
 (英) GEMMELL, RENIA
 國籍：(中) 英國
 (英) UNITED KINGDOM

6. 姓名：(中) 瑪莉亞 沙里拉
 (英) SAARELA, MARIA
 國籍：(中) 芬蘭
 (英) FINLAND

● 姓名：(中) 安娜-瑪傑 奧拉
 (英) AURA, ANNA-MARJA
 國籍：(中) 芬蘭
 (英) FINLAND

四、聲明事項：

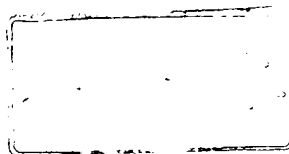
◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 ; 2005/06/30 ; 11/172,123 有主張優先權
2. 美國 ; 2005/06/01 ; 60/686,390 有主張優先權

98.94

849634



4. 姓名：(中) 羅伯 瑞史多
 (英) RASTALL, ROBERT A.
 國籍：(中) 英國
 (英) UNITED KINGDOM

5. 姓名：(中) 瑞尼亞 佐媚爾
 (英) GEMMELL, RENIA
 國籍：(中) 英國
 (英) UNITED KINGDOM

6. 姓名：(中) 瑪莉亞 沙里拉
 (英) SAARELA, MARIA
 國籍：(中) 芬蘭
 (英) FINLAND

● 姓名：(中) 安娜-瑪傑 奧拉
 (英) AURA, ANNA-MARJA
 國籍：(中) 芬蘭
 (英) FINLAND

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 ; 2005/06/30 ; 11/172,123 有主張優先權
2. 美國 ; 2005/06/01 ; 60/686,390 有主張優先權

公 告 本

修正 補充

Probiotics, J. Nutr. 125:1401-1412 (1995)。常見的益生
素包括果寡糖、半乳寡糖和乳酮糖。

在嬰兒配方中摻加多種維生素成分已經揭示過。例如 Bindels 的美國專利申請第 20030072865 號揭示具有改善蛋白質含量與至少一種維生素之嬰兒配方。該維生素性成分可為乳糖-N-四糖 (lacto-N-tetraose)、乳糖-N-岩薄五糖、乳酮糖 (LOS)、乳蔗糖、蜜三糖、半乳寡糖 (GOS)、果寡糖 (FOS)、自大豆多醣衍生物的寡糖類、甘露糖基寡糖、阿拉伯寡糖、木寡糖、異麥芽寡糖、聚葡糖、唾酸寡糖、和岩藻寡糖。

類似地，Haschke 的美國專利申請案第 20040191234 號揭示一種增強免疫反應的方法，其包括服用至少一種維生素。該維生素可為從葡萄糖、半乳糖、木糖、麥芽糖、蔗糖、乳糖、澱粉、聚木糖、半纖維素、菊糖、或彼等的混合物產生的寡糖。該維生素可存在於嬰兒穀類 (infant cereal) 中。

不過，可惜地，給餵配方嬰兒投予上述諸維生素具有某些缺點。雖然彼等可能有益地影響腸道中益生菌 (probiotics) 的數量，不過彼等不會產生類似於哺母乳嬰兒的 SCFA 分佈型態。此外，許多此等維生素物質的發酵都以非常快的速率發生，此可能產生過多的氣體、腹部膨脹、氣脹、和腹瀉。所以，在嬰兒配方中維生素性物質之選擇應該以使潛在益處最大化及使此等不希望有的副作用之目標來完成。

公告本 (12)

方便地，可以使用市售嬰兒配方。例如，可在 Enfalac、Enfamil[®]、Enfamil[®] Premature Formula、加鐵 Enfamil[®]、Lactofree[®]、Nutramigen[®]、Pregestimil[®]、或 ProSobee[®]（可得自 Mead Johnson & Company, Evansville, IN, U.S.A.）中補充適當含量的 PDX 且用在本發明方法的實施中。

於本發明一具體實例中，可將 PDX 與另一種維生素組合投予。所選維生素可為技藝中已知的任何維生素。維生素的例子包括，但不限於：FOS、菊糖、寡葡萄糖、GOS、異麥芽寡糖、木寡糖、大豆寡糖、LOS、乳蔗糖、蜜三糖、阿拉伯寡糖、聚葡萄糖、寡唾液糖、及果寡糖。

於本發明一特別具體實例中，係將 PDX 組合 GOS。GOS 為由 D-葡萄糖和 D-半乳糖組成的寡糖混合物。有時候稱為反-半乳寡糖。其係從 D-乳糖以 β -半乳糖苷酶所製成，該酶可得自米曲黴 (*Aspergillus oryzae*)。GOS 業經提出以增加成人的鈣吸收和防止骨質流失。GOS 業經鑑定為可用來投予嬰兒的維生素 (Bindels 等人美國專利申請案第 20030072865 號)。

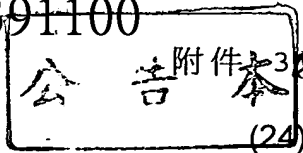
於此具體實例中，可用在約 9:1 與 1:9 之間的 PDX : GOS 比例投予 PDX 和 GOS。於另一具體實例中，PDX : GOS 比例可在約 5:1 與 1:5 之間。於又另一具體實例中，PDX : GOS 比例可在約 1:3 與 3:1 之間。於一特別具體實例中，PDX 對 GOS 的比例可為約 5:5。於另一特別具體實例中，PDX 對 GOS 比例可為約 8:2。

LOS 的發酵顯示出增加的乙酸和丁酸濃度及減低的丙酸濃度。其結果，合併的乙酸和丙酸相對比例，在用 PDX2 時遠高於用 FOS、LOS 或 GOS。此等結果也可以在表 A 中看出。此等結果證實 PDX2 為丁酸產生最少的基質且為增加丙酸相對比例的唯一基質。

此等結果與 Wang, X. & Gibson, G.R., *Effects of the In Vitro Fermentation of Oligofructose and Inulin by Bacteria Growing in the Human Large Intestine*, J. Appl. Bacteriol. 75:373-380 (1993) 所進行的試管內研究結果一致，於其中係使用得自成人授與者的糞漿液於多種醣的發酵中。不過，在試管內從 PDX 所得較高丙酸產量在中國成人的活體內 (*in vivo*) 臨床實驗中並未顯示出，Jie, Z., *et al.*, *Studies on the Effects of Polydextrose Intake on Physiological Functions in Chinese People*, Am. J. Clin. Nutr. 72:1503-09 (2000)，於其中三種不同的 PDX 濃度可增加丁酸和乙酸的含量，但不能增加丙酸的比例。來自 GOS 和 FOS 的較大丁酸產生也用經人類糞便菌相結合的大鼠予以展示出 (Djouzi, Z., *et al.*, *Compared Effects of Three Oligosaccharides on Metabolism of Intestinal Microflora in Rats Inoculated with a Human Faecal Flora*, Br. J. Nutr. 78:313-24 (1997)。

實施例 4

此實施例闡述益生菌組合物對於嬰兒結腸微生物區的



試管內發酵速率之影響。選用多種益生性醣的不同組合以期達到合宜的試管內微生物發酵速率。於此實施例中，比較不同基組合的發酵速率（總 SCFA 產生）及 pH 變化，如圖 6-7 中所示者。

在 GOS 製備物中添加 PDX 可減慢組合物的發酵速率，如經由總 SCFA 產生所測量者（圖 6）。類似地，於 LOS 製備物中添加 PDX 也減緩該組合的發酵速率。於 LOS 或 GOS 中添加 PDX 也導致 pH 更緩和的減低，如圖 7 中所示者。此種糞便內容物的較慢酸化速率可能導致腸內襯或肛門區的較低刺激，增加嬰兒耐受性。PDX 所致較慢的 pH 減低係與 GOS 和 LOS 相比的較慢的 SCFA 產生與總體試管內發酵速率相一致者。此等結果證實 PDX 可以用來減緩 PDX 與傳統益生菌諸如 GOS 或 LOS 的混合物之發酵速率。

此外也研究 PDX：GOS 比例對於總 SCFA、乙酸、丙酸和丁酸的產生之影響（圖 8-11）。圖 8 示出 8：2 的 PDX：GOS 比例導致比 5：5 的 PDX：GOS 比例所致較慢的總 SCFA 產生速率。圖 8 也確定 8：2 的 PDX：GOS 比例產生 5：5 或 1：9 的比例更少的總 SCFA。因此，此等結果證實在 PDX：GOS 混合物中更高的 PDX 含量導致較慢的試管內發酵速率。於 GOS 中添加 PDX 也具有減低乙酸和丁酸產生速率之傾向，但對於總體速率及最後丙酸產生的影響很少。

公告本

實施例 5

此實施例闡述 PDX 對嬰兒結腸微生物區試管內氣體產生之影響。其總氣體產生（以總體積每發酵瓶予以測量）大約等同於 GOS、LOS 和 FOS 所得者，於圖 12 中示出。相異地，在以嬰兒糞便細菌微生物區發酵之中，PDX 導致較低的總體氣體產生。在 PDX 中看到的該較低的總體氣體產生也表明其比所研究的其他益生菌發酵得更為慢。

除了總氣體產生之外，二氧化碳產生也為嬰兒對食物益生菌耐受性的一項重要量度。所有受試益生菌的主要氣體產物為二氧化碳。其產量分別比氫或者硫化氫高 3 倍及 44-76 倍。

在與 FOS、GOS 和 LOS 相比之下，PDX 的二氧化碳產量為最低（圖 13）。在 FOS、GOS 和 LOS 的發酵中，二氧化碳為所產生的主要氣體，顯示出最大含量在 320-380 微莫耳之間。相反地，PDX 顯示出遠較為低的二氧化碳形成水平（200 微莫耳）。嬰兒糞便微生物區自 PDX 形成的氫氣低於（約為三分之一）二氧化碳產生，且比從 FOS、GOS 和 LOS 所產生的氫氣含量顯著地較為低（圖 14）。自 PDX 形成的硫化氫對所形成的二氧化碳之比例為 1:44 而從所有試驗益生菌產生的硫化氫最大量都在大約相同的濃度水平（圖 15）。Wang 和 Gibson 也證明二氧化碳形成比例大於氫氣形成（1000 倍）和甲烷形成（10 倍）。Wang, X. & Gibson, G.R., *Effects of the In Vitro Fermentation of Oligofructose and Inulin by*

給入 Enfalac 嬰兒配方 (Mead Johnson Nutritionals, Evansville, IN) 且另外 6 天係給入 Enfalac 和加入的維生素或維生素組合。

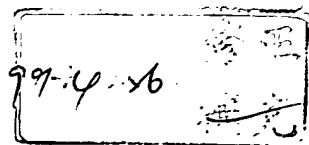
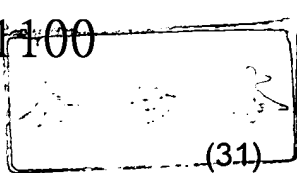
然後從 V1 和 V2 以無菌方式採取 5 毫升樣品且準備用於培養物獨立的微生物計數程序螢光原位雜交 (Fluorescence In Situ Hybridisation) (FISH) 和顯微術以鑑定和計數特定的細菌物種。FISH 的使用可促成在嬰兒結腸的近端區和遠端區內，維生素對特定細菌數量的影響之準確測定。

將維生素個別地或組合地添加到進料中，總濃度為 7.5 克 / 升 (0.75% w/v)。使用下列寡糖類：

表 2. 試驗的維生素

維生素	類型	製造商
乳酮糖(LOS)	糖漿	Morinaga Milk Ind. Co. Ltd., Japan
半乳寡糖(GOS)	E0002 粉末	由 Mead Johnson 所供應
聚右旋糖(PDX)	'Litesse Ultra' 粉末	Danisco
果寡糖	Rafftilose® P95 粉末	Orafti

謹慎地選擇嬰兒授與者且理想上為 2-4 個月大，食用配方 (可能得為完全食用配方者)，健康且最近沒有抗生素治療者。較佳者為選擇最少 2 個月大者，因為在此年齡已建立良好嬰兒腸微生物區之故。



乳桿菌兩者)之良好生長，及減低梭菌含量，如表 B 中所
示者。於兩容器中雙歧桿菌和乳桿菌的數量都明顯地增加
。於發酵從頭到尾，擬桿菌數目都維持在相似水平。

於配方進料中添加 PDX 所得結果也是有利者，在兩
容器中乳桿菌有明顯增加且梭菌和擬桿菌兩者都減少(表
B)。

於 F3 中，在配方進料內添加 GOS 且在發酵器系統內
運作。在配方進料中添加 GOS 對於任一容器內的乳桿菌
具有很少的明顯影響，不過會增加 V1 和 V2 中的雙歧桿
菌，及減少 V1 但不減少 V2 中的梭菌和擬桿菌。

於 F4 中，LOS : GOS (1 : 1) 組合相對於 1 : 1 PDX
: LOS 在併行的發酵器系統內運作。LOS : GOS 組合可以
有效地增加兩容器內的乳桿菌數目和 V1 中的雙歧桿菌數
目，及減少 V1 中的擬桿菌。梭菌在 V2 中減少但在 V1 中
增加。

用 PDX : LOS 1 : 1 組合補充配方進料導致 V1 中的乳
桿菌增加，但使每一容器內的雙歧桿菌稍微減少。兩容器
中的梭菌傾向於減少，而擬桿菌主要係在 V2 中減少。

於 F5 中，在配方進料中補充 LOS 且相對於 PDX 和
GOS 的 1 : 1 組合在平行發酵器系統中運作。於配方進料
中添加 LOS 可增加兩容器中的乳桿菌。不過，梭菌在 V2
中也會增加且兩容器內的雙歧桿菌都減少。雖然 V1 中擬
桿菌減少，但此在 V2 中沒有保持。於配方進料中添加
PDX : GOS 會增加兩容器中的雙歧桿菌和乳桿菌之含量，

表 5：嬰兒配方的營養資料

成分	每 10,000 升
去礦質乳清固體	534.337 公斤
脂肪混合物	339.695 公斤
脫脂奶粉	191.234 公斤
乳糖	136.321 公斤
半乳寡糖漿固體	35.096 公斤
聚右旋糖	22.222 公斤
檸檬酸鉀	7.797 公斤
甘油一-和二酸酯	7.233 公斤
單細胞花生四烯酸油	6.486 公斤
磷酸鈣，三質子酸	4.185 公斤
抗壞血酸	1,403.323 克
抗壞血酸鈉	1,168.402 克
肌醇	407.029 克
牛磺酸	402.962 克
玉米糖漿固體	188.300 克
菸鹼醯胺	89.857 克
泛酸鈣	42.443 克
維生素 B ₁₂	23.613 克
生物素研粉	23.613 克
硫胺素 HCl	8.022 克
吡哆醇 HCl	6.176 克
葉酸	2.260 克
卵磷脂濃縮物	3.694 公斤
單細胞二十二碳六烯酸油	3.243 公斤
角叉菜膠	2.826 公斤
氯化鈣	2.650 公斤
氯化鈉	1.410 公斤
麥芽糊精	484.199 克
CMP，游離酸	151.951 克
AMP，游離酸	33.944 克
GMP，二鈉鹽	18.347 克
UMP，二鈉鹽	7.559 克
硫酸亞鐵	0.620 公斤
檸檬酸鈉	0.455 公斤
醋酸生育酚酯，DL- α	160.882 克
大豆油	139.612 克
維生素 A	17.253 克
鈣化固醇濃縮物	5.715 克
維生素 K，液體維生素 K1	0.538 克
硫酸鋅	214.225 克
亞硒酸鈉	51.112 克
硫酸銅	22.885 克
乳糖	12.659 克
硫酸錳	3.119 克
水，去氟	10,311.900 公斤

表 6: 嬰兒配方的營養資料

成分	每 10,000 升
去礦質乳清固體	534.337 公斤
脂肪混合物	339.695 公斤
脫脂奶粉	191.234 公斤
乳糖	142.000 公斤
半乳寡糖漿固體	23.164 公斤
聚右旋糖	22.222 公斤
乳酮糖糖漿固體	10.353 公斤
檸檬酸鉀	7.797 公斤
甘油一-和二酸酯	7.233 公斤
單細胞花生四烯酸油	6.486 公斤
磷酸鈣，三質子酸	4.185 公斤
抗壞血酸	1,403.323 克
抗壞血酸鈉	1,168.402 克
肌醇	407.029 克
牛磺酸	402.962 克
玉米糖漿固體	188.300 克
菸鹼醯胺	89.857 克
泛酸鈣	42.443 克
維生素 B ₁₂	23.613 克
生物素研粉	23.613 克
硫胺素 HCl	8.022 克
吡哆醇 HCl	6.176 克
葉酸	2.260 克
卵磷脂濃縮物	3.694 公斤
單細胞二十二碳六烯酸油	3.243 公斤
角叉菜膠	2.826 公斤
氯化鈣	2.650 公斤
氯化鈉	1.410 公斤
麥芽糊精	484.199 克
CMP，游離酸	151.951 克
AMP，游離酸	33.944 克
GMP，二鈉鹽	18.347 克
UMP，二鈉鹽	7.559 克
硫酸亞鐵	0.620 公斤
檸檬酸鈉	0.455 公斤
醋酸生育酚酯，DL- α	160.882 克
大豆油	139.612 克
維生素 A 棕櫚酸酯	17.253 克
鈣化固醇濃縮物	5.715 克
維生素 K，液體維生素 K1	0.538 克
硫酸鋅	214.225 克
亞硒酸鈉	51.112 克
硫酸銅	22.885 克
乳糖	12.659 克
硫酸錳	3.119 克
水，去氣	10,311.900 公斤

表 7: 嬰兒配方的營養資料

成分	每 10,000 升
去礦質乳清固體	534.337 公斤
脂肪混合物	339.695 公斤
脫脂奶粉	191.234 公斤
乳糖	119.321 公斤
半乳寡糖漿固體	46.327 公斤
聚右旋糖	44.444 公斤
乳酮糖糖漿固體	20.706 公斤
檸檬酸鉀	7.797 公斤
甘油一-和二酸酯	7.233 公斤
單細胞花生四烯酸油	6.486 公斤
磷酸鈣，三質子酸	4.185 公斤
抗壞血酸	1,403.323 克
抗壞血酸鈉	1,168.402 克
肌醇	407.029 克
牛磺酸	402.962 克
玉米糖漿固體	188.300 克
菸鹼醯胺	89.857 克
泛酸鈣	42.443 克
維生素 B ₁₂	23.613 克
生物素研粉	23.613 克
硫胺素 HCl	8.022 克
吡哆醇 HCl	6.176 克
葉酸	2.260 克
卵磷脂濃縮物	3.694 公斤
單細胞二十二碳六烯酸油	3.243 公斤
角叉菜膠	2.826 公斤
氯化鈣	2.650 公斤
氯化鈉	1.410 公斤
麥芽糊精	484.199 克
CMP，游離酸	151.951 克
AMP，游離酸	33.944 克
GMP，二鈉鹽	18.347 克
UMP，二鈉鹽	7.559 克
硫酸亞鐵	0.620 公斤
檸檬酸鈉	0.455 公斤
醋酸生育酚酯，DL- α	160.882 克
大豆油	139.612 克
維生素 A 棕櫚酸酯	17.253 克
鈣化固醇濃縮物	5.715 克
維生素 K，液體維生素 K1	0.538 克
硫酸鋅	214.225 克
亞硒酸鈉	51.112 克
硫酸銅	22.885 克
乳糖	12.659 克
硫酸錳	3.119 克
水，去氣	10,325.600 公斤

變化。

圖 3 示出在 GOS、LOS、PDX2 和 FOS 的發酵中，乙酸產生之相對比例。

圖 4 示出在 GOS、LOS、PDX2 和 FOS 的發酵中，丙酸產生之相對比例。

圖 5 示出在 GOS、LOS、PDX2 和 FOS 的發酵中，丁酸產生之相對比例。

圖 6 示出在各種益生菌醱的組合之發酵中總 SCFA 之產生。

圖 7 示出在各種益生菌醱組合的發酵中之 pH 變化。

圖 8 示出在 PDX 和 GOS 的不同組合之發酵中的總 SCFA 產生。

圖 9 示出在 PDX 和 GOS 的不同組合之發酵中產生的乙酸濃度。

圖 10 示出在 PDX 和 GOS 的不同組合之發酵中產生的丙酸濃度。

圖 11 示出在 PDX 和 GOS 的不同組合之發酵中產生的丁酸濃度。

圖 12 示出在 GOS、LOS、PDX2 和 FOS 發酵中形成的氣體總體積。

圖 13 示出在 GOS、LOS、PDX2 和 FOS 發酵中形成的氣體中之二氧化碳氣體濃度。

圖 14 示出在 GOS、LOS、PDX2 和 FOS 發酵中形成的氣體中之氫氣濃度。

附件 3A
公告 (40)

第 095118904 號專利申請案
中文說明書替換頁 民國 99 年 10 月 25 日修正

修正

圖 15 示出在 GOS、LOS、PDX2 和 FOS 發酵中形成的氣體之二硫化氫濃度。

表 A

 在第3組基質的發酵中, 乙酸, 丙酸和丁酸的相對比例及總SCFA產量
 (平均值和標準偏差(S.D.))

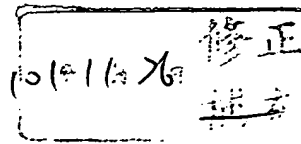
	乙酸 %	丙酸 %	丁酸 %	SCFA 微莫耳 平均值
時間(時) GOS				
0	79,3	8,6	12,1	144
1	86,5	5,6	7,8	354
2	89,5	4,6	5,9	727
4	86,3	5,7	8,0	1010
8	76,8	9,0	14,2	1134
24	67,1	15,7	17,2	1325
時間(時) LOS				
0	76,7	9,6	13,7	143
1	85,9	6,0	8,1	365
2	89,2	4,7	6,1	770
4	88,0	5,0	7,0	1104
8	77,0	7,0	16,1	1181
24	63,7	14,5	21,9	1359
時間(時) PDX2				
0	77,8	9,2	13,1	156
1	83,1	7,1	9,8	303
2	81,2	7,6	11,2	426
4	75,7	9,9	14,4	550
8	74,3	12,5	13,2	775
24	66,5	23,3	10,2	1128
時間(時) FOS				
0	78,4	9,0	12,7	143
1	86,4	5,8	7,8	376
2	89,7	4,4	5,9	816
4	86,8	5,0	8,3	1195
8	77,7	7,4	15,0	1254
24	66,9	14,9	18,2	1470
時間(時) 糞空白樣				
0	78,3	9,0	12,7	151
1	83,3	7,3	9,3	280
2	82,7	8,1	9,2	373
4	80,1	10,7	9,2	450
8	78,8	12,5	8,8	548
24	73,4	20,0	6,6	817

99年4月26日 修正 補充

表 B
 對糞菌叢的益生菌效應之總結

試驗益生菌	Log10 (益生菌增加)(T12-T6)									
	雙歧桿菌		乳桿菌		梭菌		擬桿菌			
	V1	V2	V1	V2	V1	V2	V1	V2	V1	V2
人乳	1.34	2.13	1.66	1.87	-1.00	-2.55	0.09	-0.12		
FOS	1.55	0.05	-1.26	0.26	1.14	0.71	-0.48	0.97		
LOS	-0.50	-0.28	0.70	1.19	0.11	1.22	-0.59	0.20		
GOS	0.33	0.75	0.00	0.00	-1.31	-0.15	-0.85	0.03		
PDX	0.23	-0.17	1.35	0.55	-1.79	-0.88	-1.64	-1.79		
1:1 PDX:GOS	0.58	0.47	1.21	0.81	0.91	0.43	0.00	0.74		
1:1 PDX:LOS	-0.32	-0.33	0.57	-0.25	-0.22	-0.10	0.12	-0.41		
1:1 LOS:GOS	0.14	0.53	0.21	1.53	0.48	-1.63	-1.60	2.04		

註：V1發酵係在pH = 5.2；V2發酵係在pH = 6.7



附件 3A：第 095118904 號申請專利範圍修正本

民國 101 年 11 月 26 日修正

十、申請專利範圍

1. 一種嬰兒配方，其包含聚右旋糖（polydextrose）以及至少一種其他的益生素（prebiotic），其中該聚右旋糖在該嬰兒配方內的含量係在約 1.0 克／升至約 10.0 克／升之間，及其中該至少一種其他的益生素（prebiotic）包含乳酮糖（lactulose）、半乳寡糖（galacto-oligosaccharide）、或其組合。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其中該聚右旋糖在該嬰兒配方內的含量，於每日投予之時，係在約 2.0 克／升與 8.0 克／升的聚右旋糖間。

3. 根據申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其中該嬰兒配方包含半乳寡糖（galacto-oligosaccharide）。

4. 根據申請專利範圍第 3 項之嬰兒配方，其中聚右旋糖：半乳寡糖的比例係在約 9：1 與 1：9 之間。

5. 根據申請專利範圍第 3 項之嬰兒配方，其中聚右旋糖：半乳寡糖的比例係在約 5：1 與 1：5 之間。

6. 根據申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其中該嬰兒配方包含乳酮糖（lactulose）。

7. 根據申請專利範圍第 6 項之嬰兒配方，其中聚右旋糖：乳酮糖的比例係在約 9：1 與 1：9 之間。

8. 根據申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其中該嬰兒配方另外包含至少一種長鏈多不飽和脂肪酸。

9. 根據申請專利範圍第 8 項之嬰兒配方，其中該長鏈多不飽和脂肪酸包含選自二十二碳六烯酸、花生四烯酸或二十碳五烯酸及其組合之脂肪酸。

10. 根據申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其另外包括：

a. 脂質或脂肪；

b. 蛋白質來源，而其係選自乳清蛋白、酪蛋白、酪蛋白性蛋白質、脫脂奶、水解蛋白、及其組合；及

c. 長鏈多不飽和脂肪酸來源。

11. 根據申請專利範圍第 10 項之嬰兒配方，其中該長鏈多不飽和脂肪酸來源是選自二十二碳六烯酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸及其組合。

12. 根據申請專利範圍第 11 項之嬰兒配方，其中該長鏈多不飽和脂肪酸來源包含二十二碳六烯酸和花生四烯酸，且花生四烯酸與二十二碳六烯酸的比例係從約 1：3 至約 9：1。

13. 根據申請專利範圍第 10 項之嬰兒配方，其中該脂質或脂肪的含量是約 3 至約 7 克 / 100 仟卡。

14. 根據申請專利範圍第 10 項之嬰兒配方，其中該蛋白質來源的含量是約 1 至約 5 克 / 100 仟卡。

15. 根據申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其中該嬰兒配方另外包含至少一種益生菌 (probiotic)。

16. 根據申請專利範圍第 15 項之嬰兒配方，其中該益生菌係選自雙歧桿菌屬 (*Bifidobacteria* spp.) 和乳桿菌

屬 (*Lactobacillus* spp.) 所組成的群組。

17. 根據申請專利範圍第 15 項之嬰兒配方，其中該益生菌為鼠李糖乳桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) GG (LGG)。

18. 根據申請專利範圍第 15 項之嬰兒配方，其中該益生菌為乳酸雙歧桿菌 (*Bifidobacterium lactis*) Bb-12 (Bb-12)。

圖 1

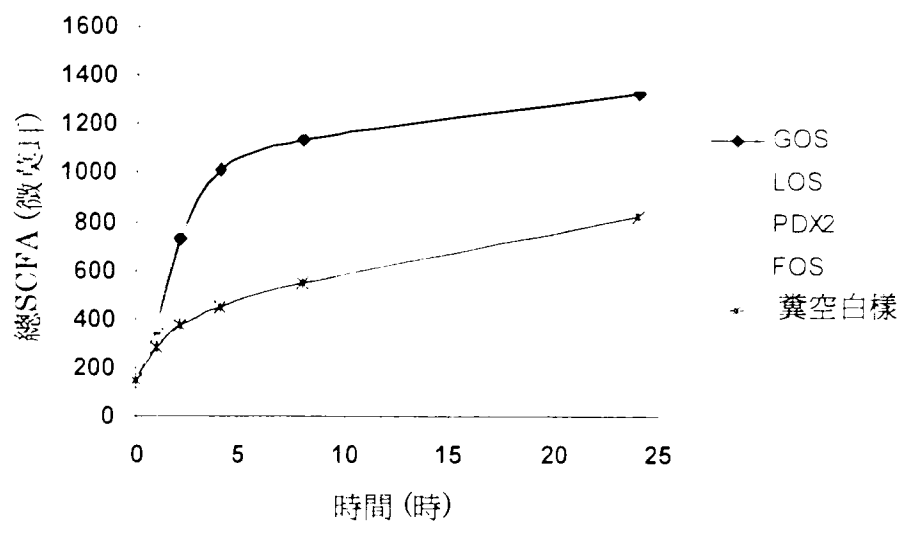


圖 2

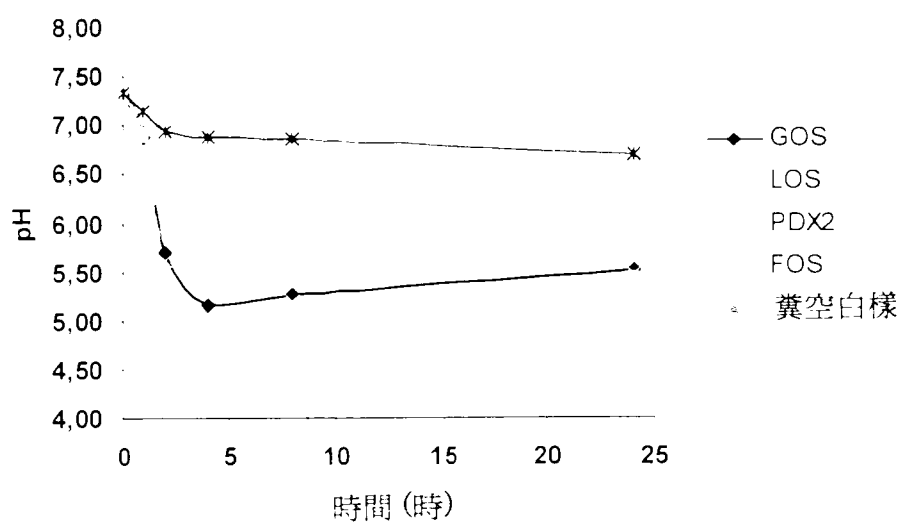


圖 3

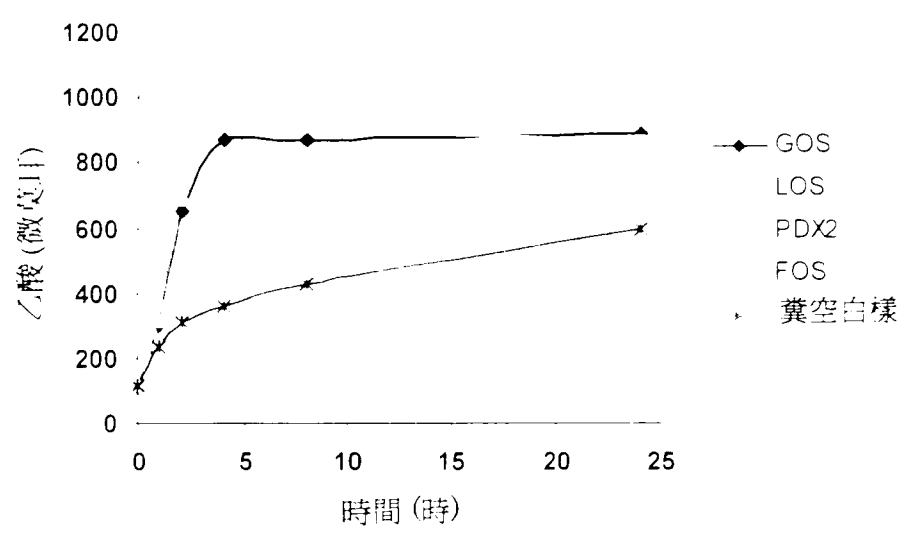


圖 4

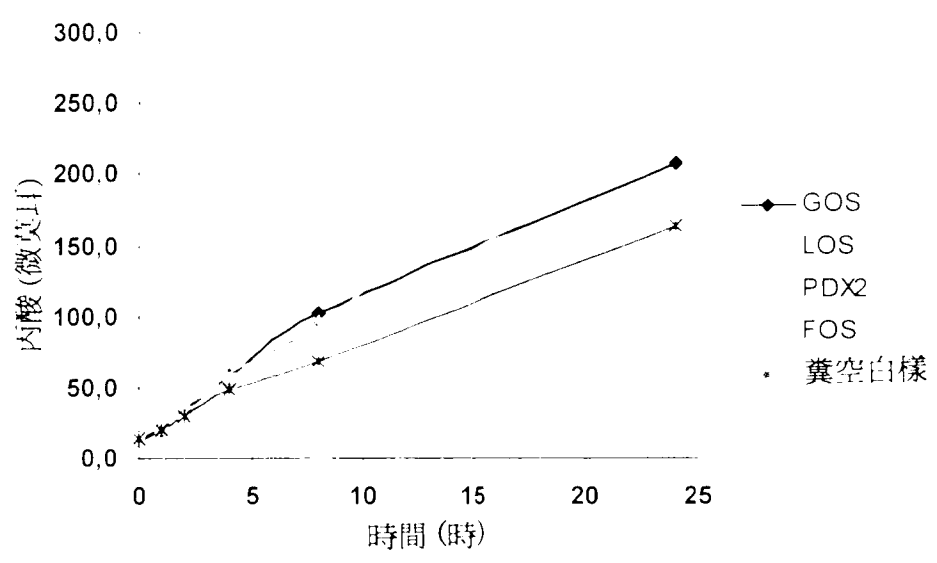


圖5

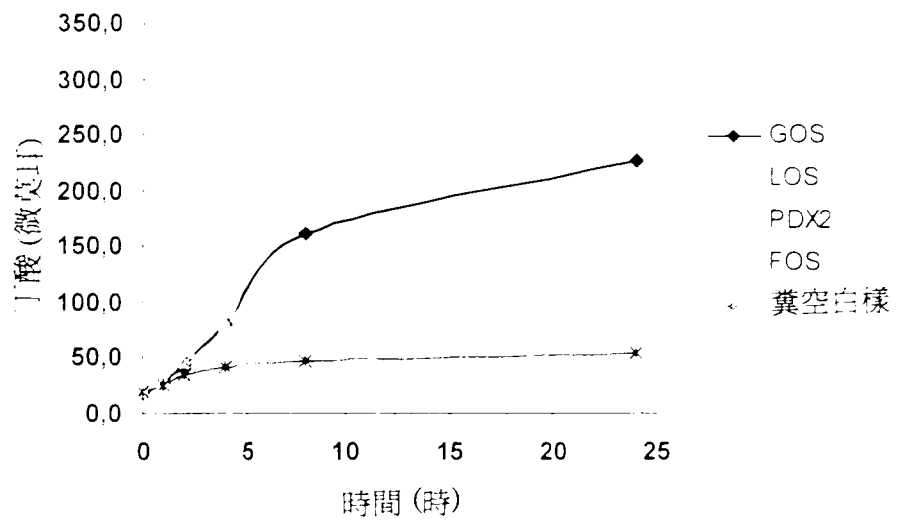


圖6

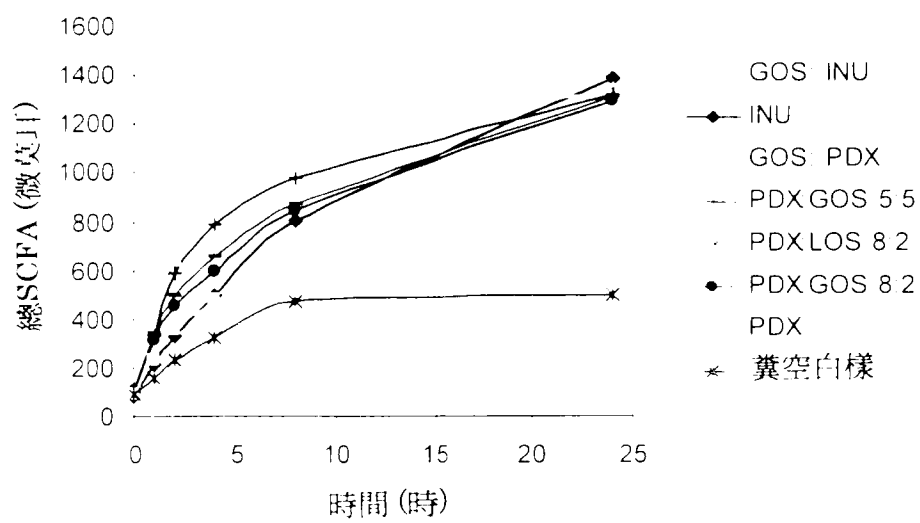


圖 7

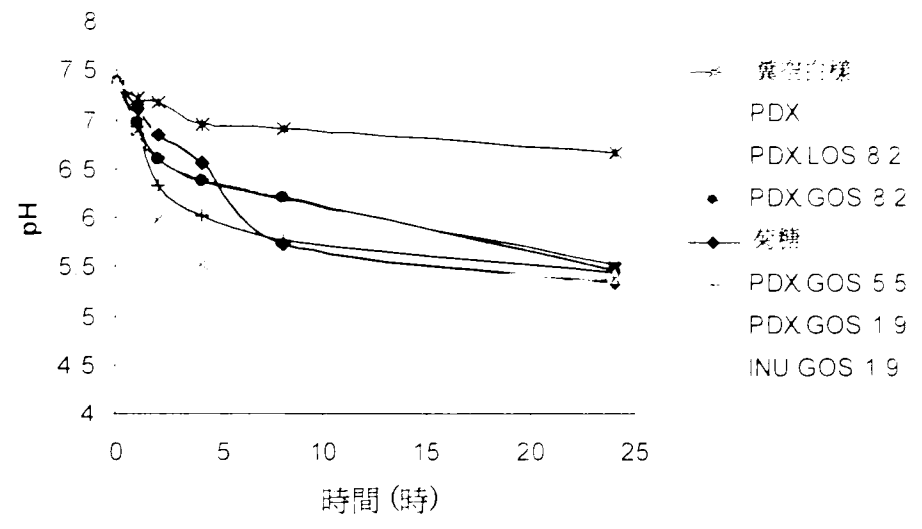


圖 8

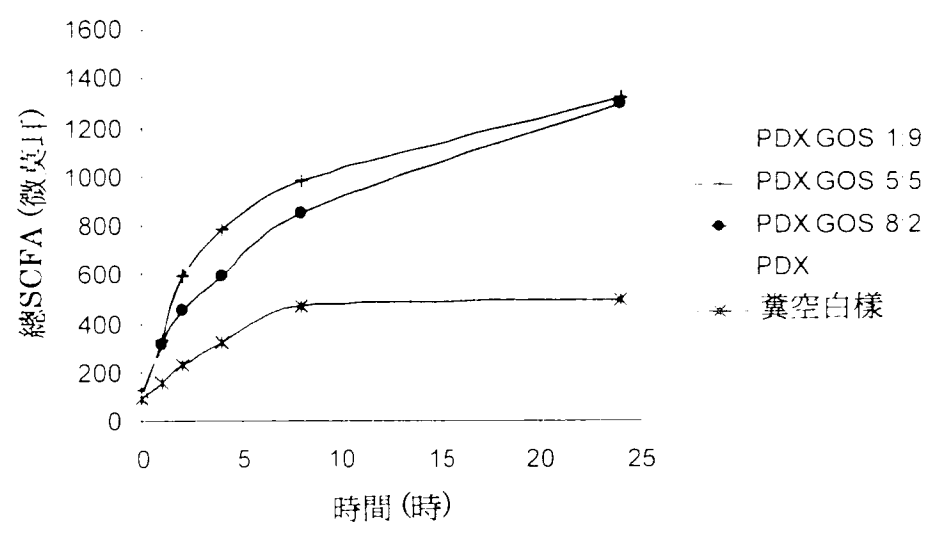


圖 9

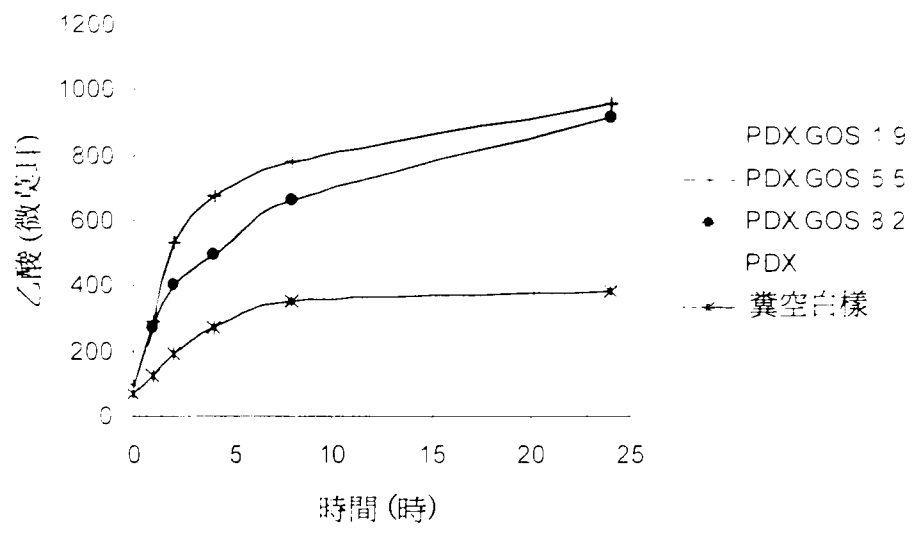


圖 10

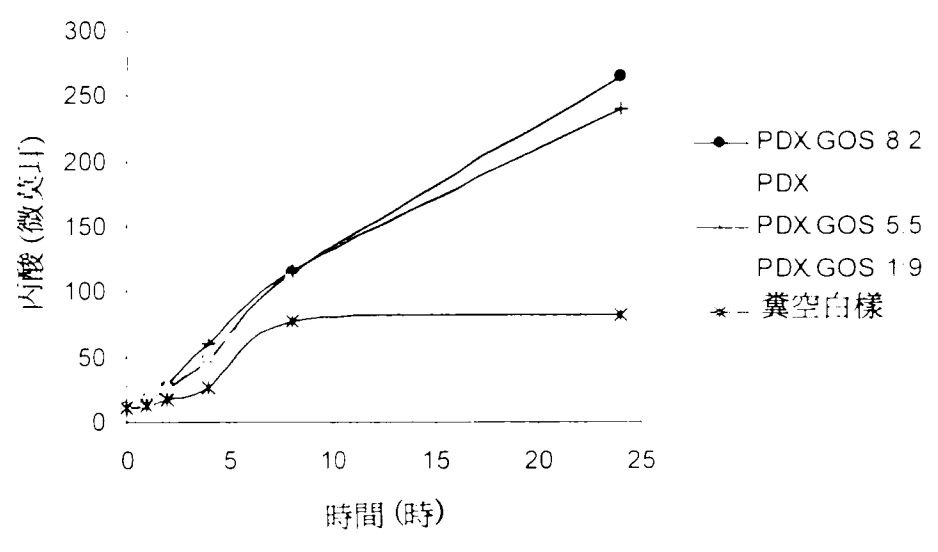


圖 11

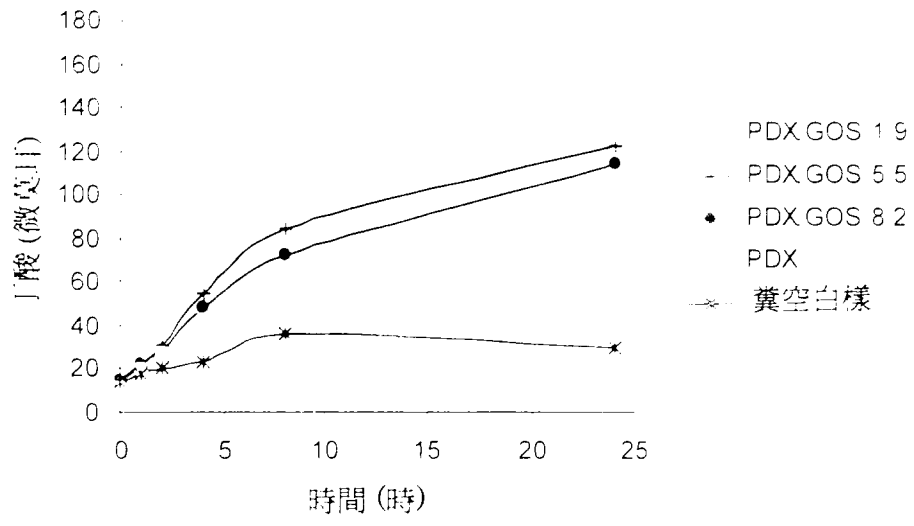


圖12

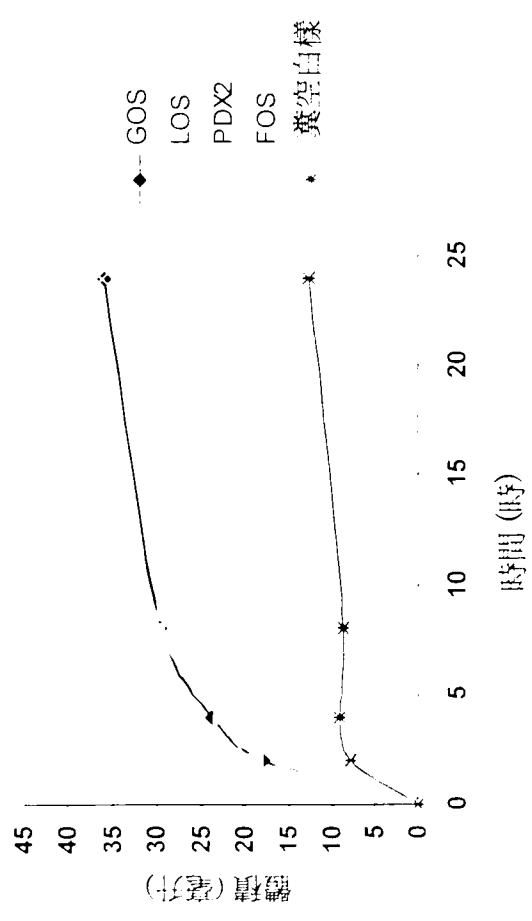


圖13

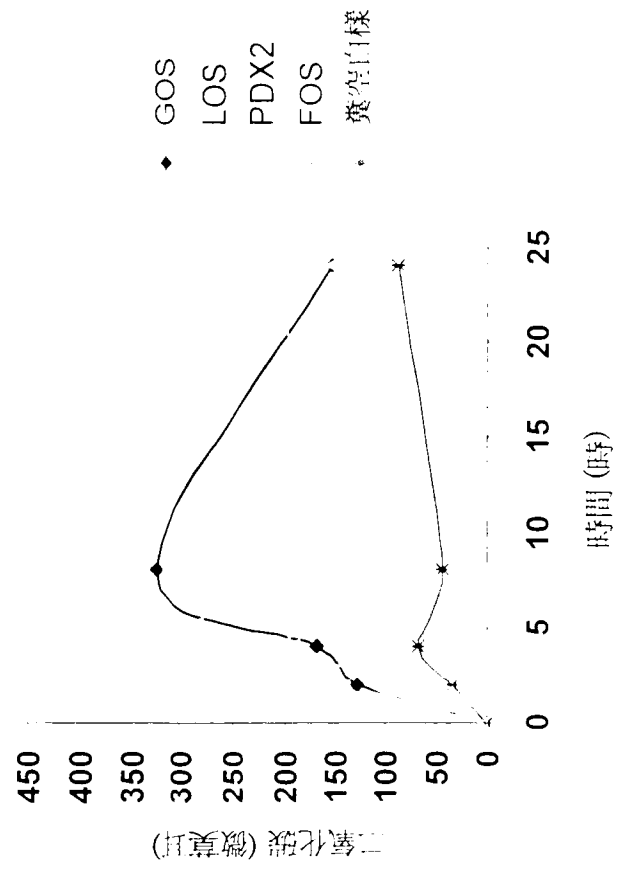


圖14

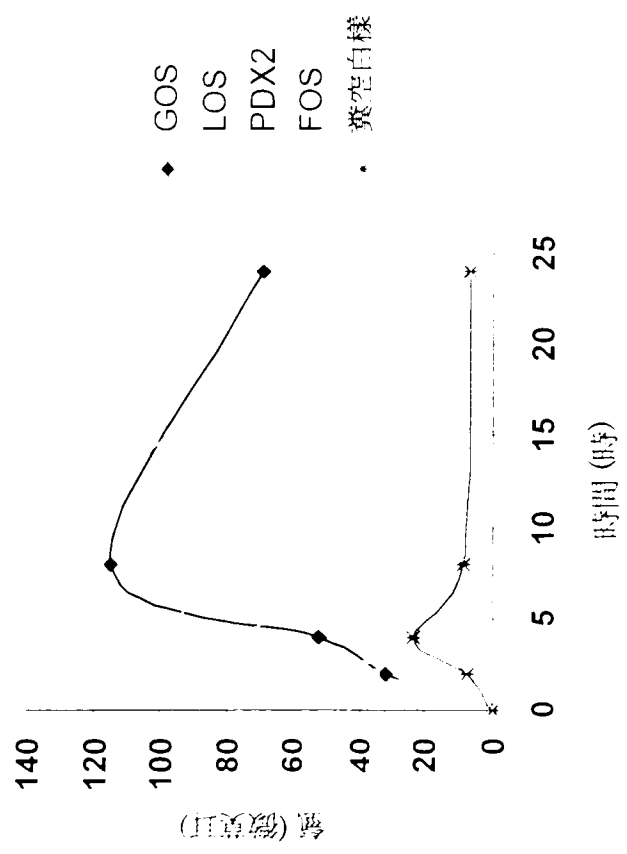


圖15

