(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117460428 A
(43)申请公布日 2024.01.26

(21)申请号 202280021023.3
(22)申请日 2022.03.11
(30)优先权数据
21162450.7 2021.03.12 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.09.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/SE2022/050245 2022.03.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/191767 EN 2022.09.15
(83)生物保藏信息
PTA-5289 2003.06.25
PTA-6475 2004.12.21
DSM 17938 2006.01.30
DSM 27131 2013.04.18
DSM 32465 2017.03.21
DSM 32846 2018.07.04
DSM 32848 2018.07.04
DSM 32849 2018.07.04
PTA-4659 2002.09.11
DSM 33632 2020.09.09
DSM 33633 2020.09.09
DSM 33634 2020.09.09
DSM 33635 2020.09.09
DSM 32847 2018.07.04
PTA-6127 2004.07.22
DSM 32231 2015.12.11
DSM 32232 2015.12.11

(71)申请人 生命大地女神有限公司
地址 瑞典斯德哥尔摩
(72)发明人 S·鲁斯 M·N·霍尔卡雅达 N·邦尼特 M·萨巴缇尔 B·布尔基 G·E·M·普鲁特 F·德布勒因
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 黄登高 彭昶

(51)Int.Cl.
A23L 33/135(2006.01)
A23L 33/125(2006.01)

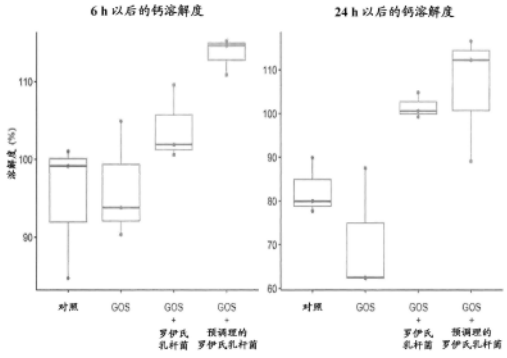
权利要求书3页 说明书42页 附图11页

(54)发明名称

GOS预调理的罗伊氏乳杆菌和最终制剂中的GOS

(57)摘要

本文的发明总体上涉及通过在培养过程中用GOS预调理罗伊氏乳杆菌来增强益生菌罗伊氏乳杆菌菌株在哺乳动物中的存活和活性,并且涉及当与进一步加入组合物中的GOS一起施用时这样的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的令人惊讶地高的合生作用。因此,本发明包含培养和制备益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的方法,以及制备含有与另外量的GOS组合的这样的预调理的菌株的产品的方法。更详细地,本发明涉及包含益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌组合物,其可通过以下步骤获得:在包含GOS的培养基中培养所述细菌,并在最终产品中将预调理的细菌与另外的GOS一起施用。发明人已经发现,这样的方法在胃肠道中诱导益生菌细菌的令人惊讶地高的且意想不到的合生有益效果。所述益生菌组合物还诱导增加的钙和铁溶解度。



CN 117460428 A

1.用于制备益生菌组合物的方法,所述方法包含以下步骤:

a)如下预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株:

ai)在生长培养基中存在低聚半乳糖(GOS)的情况下培养益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,由此预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株;和

aii)从所述生长培养基中收获预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株;和

b)将GOS加给从步骤aii)得到的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株以制备益生菌组合物。

2.根据权利要求1所述的方法,其中在步骤ai)中将GOS加入所述生长培养基中,所述GOS在生长培养基中的量为至少0.2重量%,优选地至少0.5重量%,并且更优选地至少0.75重量%的GOS。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中在步骤ai)中将GOS加入所述生长培养基中,所述GOS在生长培养基中的量为至多8重量%的GOS,优选地至多7重量%GOS,更优选地至多6重量%GOS,并且甚至更优选地至多5重量%GOS诸如至多4重量%的GOS或至多3重量%GOS。

4.根据权利要求1-3中的任一项所述的方法,其中在步骤ai)中将GOS加入所述生长培养基中,所述GOS在生长培养基中的量选自0.2重量%至8重量%的范围内,优选地在0.5重量%至7重量%的范围内,更优选地在0.75重量%至6重量%的范围内,并且甚至更优选地在0.75重量%至5重量%GOS的范围内。

5.根据权利要求1-4中的任一项所述的方法,其中步骤b)包含将GOS加给从步骤aii)得到的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,所述GOS的量为至少1g,优选地至少2g,并且更优选地至少3g。

6.根据权利要求5所述的方法,其中步骤b)包含将GOS加给从步骤aii)得到的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,所述GOS的量选自2至12g之间,优选地在2至10g之间,并且更优选地在3至8g之间,诸如在3至7g之间。

7.根据权利要求1-6中的任一项所述的方法,其中在步骤a)i)中加入所述生长培养基中的GOS和/或在步骤b)中加入所述预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的GOS具有3-8的聚合度(DP)。

8.根据权利要求1-7中的任一项所述的方法,其中所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株是至少一种选自以下的罗伊氏乳杆菌菌株:罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32847、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 33632、罗伊氏乳杆菌DSM 33633、罗伊氏乳杆菌DSM 33634、罗伊氏乳杆菌DSM 33635、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465、罗伊氏乳杆菌DSM 32231、罗伊氏乳杆菌DSM 32232、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6127和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659,优选地所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株选自罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659,并且更优选罗伊氏乳杆菌DSM 17938。

9.根据权利要求1-8中的任一项所述的方法,所述方法进一步包含:

aiii)洗涤从步骤aii)得到的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。

10.根据权利要求1-9中的任一项所述的方法,所述方法进一步包含:

aiv)干燥从步骤aii)得到的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株或从步骤aiii)得到的洗涤的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。

11.根据权利要求10所述的方法,其中aiv)干燥所述预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株包含喷雾干燥或冷冻干燥从步骤aii)得到的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株或从步骤aiii)得到的洗涤的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。

12.益生菌组合物,其包含:

有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,其中所述预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株已经通过在生长培养基中存在低聚半乳糖(GOS)的情况下培养罗伊氏乳杆菌菌株来制备;和

有效量的GOS。

13.根据权利要求12所述的益生菌组合物,其中所述益生菌组合物包含在10^3cfu至10^{12}cfu之间的量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,优选地在10^4cfu至10^{11}cfu之间的量,并且更优选地在10^5cfu至10^{10}cfu之间的量,诸如在10^6cfu至10^9cfu之间的量。

14.根据权利要求12或13所述的益生菌组合物,其中所述益生菌组合物包含至少1g、优选地至少2g、并且更优选地至少3g的量的GOS。

15.根据权利要求14所述的益生菌组合物,其中所述益生菌组合物包含选自2至12g之间的量的GOS,优选地在2至10g之间,并且更优选地在3至8g之间,诸如在3至7g之间。

16.根据权利要求12-15中的任一项所述的益生菌组合物,其中所述益生菌组合物是选自粉末、片剂、胶囊剂、油制剂、乳剂、水包油乳剂(o/w乳剂)和油包水乳剂(w/o乳剂)的形式。

17.根据权利要求12-16中的任一项所述的益生菌组合物,其中所述益生菌组合物是选自营养组合物、药物制剂、饮食添加物、功能性食品产品、功能性饮料产品的可施用形式。

18.根据权利要求12-17中的任一项所述的组合物,其中所述罗伊氏乳杆菌菌株是至少一种选自以下的罗伊氏乳杆菌菌株:罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32847、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 33632、罗伊氏乳杆菌DSM 33633、罗伊氏乳杆菌DSM 33634、罗伊氏乳杆菌DSM 33635、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465、罗伊氏乳杆菌DSM 32231、罗伊氏乳杆菌DSM 32232、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6127和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659,优选地所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株选自罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659,并且更优选罗伊氏乳杆菌DSM 17938。

19.根据权利要求12-18中的任一项所述的益生菌组合物,所述组合物包含

有效量的冷冻干燥的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株;和

有效量的GOS。

20.可通过根据权利要求1-11中的任一项所述的方法得到的根据权利要求12-18中的任一项所述的组合物。

21.包含补充了有效量的低聚半乳糖(GOS)的、有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌组合物用于在健康受试者的消化道中改善或增加益生菌作用、优选罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌作用的非治疗性用途,所述益生菌组合物可通过根据权利要求1-11中的任一项所述的方法得到或者是根据权利要求12-20中的任一项所述的益生菌组合物。

22.根据权利要求21所述的非治疗性用途,其中改善或增加所述益生菌作用:

-是在健康受试者的肠道中增加矿物质生物可达性,优选地增加矿物质溶解度和/或矿物质吸收,其中所述矿物质优选地是钙和/或铁;和/或

-是在健康受试者的肠道中促进健康小生物群;和/或

-是促进罗伊氏乳杆菌菌株在结肠中的存活并从而促进与罗伊氏乳杆菌菌株相关的健康益处;和/或

-是增加肠道小生物群的代谢活性,优选地增加在健康受试者的肠道中的乳酸/乙酸产生;和/或

-是在健康受试者中增加骨形成和/或骨矿化和/或增加成骨细胞的成熟和/或活性。

23.用作药物的包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的低聚半乳糖(GOS)的益生菌组合物,所述组合物可通过根据权利要求1-11中的任一项所述的方法得到或是根据权利要求12-20中的任一项。

24.用于在有此需要的受试者中预防和/或治疗矿物质缺乏的、包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的低聚半乳糖(GOS)的益生菌组合物,所述组合物可通过根据权利要求1-11中的任一项所述的方法得到或是根据权利要求12-20中的任一项。

25.根据权利要求24使用的益生菌组合物,其中

所述受试者处于发生矿物质缺乏的风险中或正在遭受矿物质缺乏;和

所述矿物质是钙和/或铁。

26.根据权利要求25使用的益生菌组合物,其中所述益生菌组合物用于预防和/或治疗铁缺乏,优选缺铁性贫血。

27.用于预防和/或治疗消化功能障碍的、包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的低聚半乳糖(GOS)的益生菌组合物,所述组合物可通过根据权利要求1-11中的任一项所述的方法得到或是根据权利要求12-20中的任一项。

28.用于预防和/或治疗生态失调的、包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的低聚半乳糖(GOS)的益生菌组合物,所述组合物可通过根据权利要求1-11中的任一项所述的方法得到或是根据权利要求12-20中的任一项。

29.用于预防和/或治疗骨丢失的、包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的低聚半乳糖(GOS)的益生菌组合物,所述组合物可通过根据权利要求1-11中的任一项所述的方法得到或是根据权利要求12-20中的任一项。

30.用于促进儿童骨骼或牙齿的生长和/或发育的、包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的低聚半乳糖(GOS)的益生菌组合物,所述组合物可通过根据权利要求1-11中的任一项所述的方法得到或是根据权利要求12-20中的任一项。

31.用于预防和/或治疗感染、优选肠道感染的、包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的低聚半乳糖(GOS)的益生菌组合物,所述组合物可通过根据权利要求1-11中的任一项所述的方法得到或是根据权利要求12-20中的任一项。

GOS预调理的罗伊氏乳杆菌和最终制剂中的GOS

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及通过在培养过程中用低聚半乳糖(GOS)预调理罗伊氏乳杆菌(Lactobacillus reuteri)来增强益生菌罗伊氏乳杆菌菌株在哺乳动物中的存活和活性,并且涉及当与进一步加入组合物中的GOS一起施用时这样的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的令人惊讶地高的合生(synbiotic)或协同作用。因此,本发明包含制备益生菌组合物的方法,以及包含用GOS预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株并包含另外的GOS的益生菌组合物,及其用途。发明人已经发现,这样的方法和组合物在胃肠道中实现了令人惊讶地高的且意想不到的合生有益效果。所述组合物还诱导增加的铁和钙溶解度。

背景技术

[0002] 益生菌被定义为"活的微生物,当以足够量施用时,其为宿主带来健康益处"。这是世界各地广泛接受的科学定义(参见例如,Hill等人.2014;Nat.Rev.Gastro.&Hepathology,11:506-514)。益生菌产品(通常是饮食添加物或食品)可能被推荐用于个人正在经历的不同病况或症状。产生乳酸的细菌,诸如乳杆菌,通常用作各种类型的食品(例如酸奶)中的益生菌。这样的产生乳酸的细菌通过其自身在肠道系统内的定殖、通过可用营养物的竞争和/或通过特定物质(诸如过氧化氢、细菌素和/或降低肠道pH的有机酸,包括乳酸和乙酸)的产生,可以防止有害微生物的生长和定殖。非常确定的是,宿主和肠道微生物之间的相互作用对于宿主的健康和福祉至关重要。肠道小生物群产生的代谢物为宿主提供营养物,但也可能参与免疫应答、宿主免疫系统的调节和发展以及减少炎症和预防过敏性应答。

[0003] 益生元是通过选择性地刺激有益微生物(诸如细菌和真菌)的生长和/或活性来诱导其生长或活性的化合物。益生元是被这样的宿主微生物选择性地利用从而提供健康益处的底物(参见例如,Gibson等人.2017;Nat.Rev.Gastro.&Hepathology,14:491-502)。因此,在胃肠道中,益生元可以改变肠道微生物组的组成。饮食益生元通常是不可消化的(参见例如,https://en.wikipedia.org/wiki/Dietary_fiber)纤维化合物,它们以未消化的方式穿过胃肠道的上部并通过充当其底物来刺激定殖在大肠中的有利细菌的生长或活性。已经试验了各种化合物以确定它们作为益生元的功能。低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)和反式-低聚半乳糖(TOS)是最常见的益生元。因此,食用某些益生元可以通过增加与人健康相关的微生物的数目来提高免疫功能,并且动物和人研究已经证实,益生元可以减少有害细菌的数目。因此,益生元是当通过受试者肠道中的天然微生物菌群或通过与益生元同时摄入的益生菌细菌发酵时提供健康益处的成分。

[0004] 通常已知将特定类型的益生元和益生菌组合会产生某些协同作用。具体地,组合的益生元GOS和益生菌微生物(诸如乳杆菌属和双歧杆菌属)的作用已有记录(参见例如YUTAKA KANAMORI,MD等人,Digestive Diseases and Sciences,第46卷,第9期(2001年9月),第2010-2016页(©2001))。已经证实,益生元和益生菌之间的合生作用是由于在受试者的胃肠道(GI)内的益生菌对益生元的消耗。

[0005] 益生菌产生乳酸的细菌的制造程序通常被标准化,并且涉及在包含碳水化合物源(诸如糖,例如葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖或右旋糖)的生长培养基中发酵细菌的步骤。在发酵以后,益生菌细菌通常受到保护并冷冻或冷冻干燥并包装成成品。

[0006] 益生菌乳酸细菌的摄入在体内具有多种作用。一种这样的重要作用是必需矿物质的生物可达性,其可以被这样的益生菌乳酸细菌的存在显著影响。尽管体内矿物质的含量主要取决于其从食物摄入的供应,并且它们主要在胃肠道中吸收,但仅通过食物摄入来提供矿物质不一定实现足够的矿物质生物可达性。影响矿物质生物可达性的主要因素是食品中矿物质的含量、食品中和胃肠道中的矿物质之间的协同和拮抗相互作用、食品中络合或螯合化合物的存在以及生物体的健康状态及其年龄。此外,肠道微生物菌群、益生菌和益生元显著影响矿物质的生物可达性,并且从而可以增加或减少这样的矿物质的吸收。

[0007] 矿物质对于所有活物种都是必需的,尽管物种之间的具体需求有所不同。矿物质在人生物体中具有许多重要功能,并且包括例如铁和钙等。矿物质缺乏,即这样的矿物质在体内的低或次优量(通常由于摄入的矿物质低于推荐的RDA量),可能导致疾病,并且矿物质过量也可能导致疾病。因此,以正确的比例获取正确量的矿物质对于最佳健康而言至关重要。大多数天然饮食会以适当的平衡提供这些矿物质,但在某些情况下这不足以维持健康。

[0008] 最近的研究已经产生了关于小生物群-矿物质相互作用的新信息,并且主要关注肠道细菌对钙和铁代谢的影响。鉴于人口老龄化和绝经女性和男性中骨质疏松症患病率的上升,关于钙代谢和因此关于骨代谢及其改善的新数据对该领域的发展至关重要。相比之下,对铁与肠道小生物群之间不利相互作用的研究的结果表明,迫切需要进一步研究这种矿物质的生物可达性,以便制定关于铁补充的新推荐。

[0009] 此外,口服施用益生菌细菌的一个常见问题是,它们以不足够量到达其在胃肠道中的预定位置,和/或益生菌细菌在肠道的这些位置(它们发挥其作用的地方)中的活性是不够的。因此,益生菌细菌在胃肠道中的存活、生存力和植入对于益生菌产品的制造商来说是一个重大挑战。因此,必须增加益生菌细菌的剂量和/或需要更频繁的施用以获得期望的益生菌作用。这进一步导致不必要的成本、不希望的摄入频率以及当益生菌细菌不能充分提供期望的效果时还可能降低健康益处的问题。因此,需要在不增加剂量的情况下提高益生菌作用。

发明内容

[0010] 本发明的一个目的是,提供当向有此需要的受试者或患者施用这样的益生菌时改善益生菌微生物(诸如乳杆菌)的存活和益生菌作用的更有效的方式、方法和疗法。此外,一个特定目的是预防和/或治疗有此需要的受试者或患者中的矿物质缺乏,特别是例如选自铁和/或钙的矿物质的矿物质缺乏。

[0011] 这些目的通过如下所述的本发明来解决。

[0012] 在下文和独立权利要求中定义了本发明。在说明书和从属权利要求中定义了本发明的其它实施方案。

[0013] 在第一方面,本发明提供了制备益生菌组合物的方法。所述方法包含以下步骤:

[0014] a)如下预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株:

[0015] ai)在生长培养基中存在低聚半乳糖(GOS)的情况下培养益生菌罗伊氏乳杆菌菌

株,由此预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株;和

[0016] aii)从所述生长培养基中收获预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株;

[0017] b)将GOS加给从步骤aii)得到的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株以制备益生菌组合物。

[0018] 通过本发明的方法制备的益生菌组合物包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和补充的或添加的GOS。

[0019] 在本发明的方法的步骤ai)中,益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的预调理如下发生:在生长培养基中存在GOS的情况下培养或培殖益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,由此预调理所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。在有GOS存在下益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的培养导致预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的形成。

[0020] 根据第二方面,本发明提供了益生菌组合物,其包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和另外有效量的GOS。通过在生长培养基中存在GOS的情况下培养罗伊氏乳杆菌菌株,已经制备了预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。

[0021] 在第三方面,本发明提供了本发明的益生菌组合物用于增加或增强健康受试者的消化道中的益生菌作用(例如,益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌作用)的非治疗性用途,所述益生菌组合物包含补充了有效量的GOS的有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,所述益生菌组合物可通过本发明的方法或如本文所述得到。益生菌作用的增加可以表现为例如增加健康受试者的肠道中的矿物质生物可达性、促进健康受试者的肠道中的健康小生物群、促进罗伊氏乳杆菌在结肠中的存活并从而促进与罗伊氏乳杆菌菌株相关的健康益处、在健康受试者中增加肠道小生物群的代谢活性和/或增加骨形成和/或骨矿化和/或增加成骨细胞的成熟和/或活性。

[0022] 根据第四方面,本发明提供了用作药物的益生菌组合物,其包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS,所述益生菌组合物可通过本发明的方法或如本文所述得到。

[0023] 根据其它方面,本发明提供了可通过本发明的方法得到的益生菌组合物,其包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS,其用于在有此需要的受试者中预防和/或治疗矿物质缺乏、消化功能障碍、生态失调、骨丢失,或用于在儿童中促进骨骼或牙齿的生长和/或发育。

[0024] 在下文和从属权利要求中描述了进一步优选的实施方案。

附图说明

[0025] 图1:显示了用于评估益生菌菌株对小生物群代谢和益生菌菌株植入的影响的短SHIME结肠体外模型。

[0026] 图2:显示了6h和24h测量的结肠中的钙溶解度。如在图2中所见,在GOS存在的情况下,预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株在6h和24h均提高结肠中的钙溶解度。这提示,与GOS组合的预调理的罗伊氏乳杆菌菌株可以用于在有此需要的受试者中促进钙吸收。

[0027] 图3:显示了48h时结肠中改善的铁溶解度(生物可达性)。GOS和预调理的罗伊氏乳杆菌提高了结肠中铁溶解度(生物可达性),这表明GOS和预调理的罗伊氏乳杆菌的组合可以在有此需要的受试者中促进铁吸收。

[0028] 图4A:表明在48h温育以后在结肠中存在或不存在GOS的情况下罗伊氏乳杆菌DSM17938和嗜热链球菌(Streptococcus thermophilus)NCC2496的存活,特别是GOS对罗伊氏乳杆菌存活的正向作用和GOS对嗜热链球菌存活的负面作用。

[0029] 图4B:表明在GOS存在下,预调理的罗伊氏乳杆菌DSM17938的存活优于未预调理的罗伊氏乳杆菌菌株。

[0030] 图5:显示了乳酸产生(在48h和6h的水平之间的差异)。单独的GOS诱导结肠中的乳酸产生的显著增加。除GOS外罗伊氏乳杆菌的添加进一步提高了乳酸产生。与GOS组合的预调理的罗伊氏乳杆菌甚至比罗伊氏乳杆菌(未预调理)更能提高结肠中的乳酸产生,显示出小生物群的代谢活性的总体增加。在添加GOS和预调理的罗伊氏乳杆菌48h时,结肠中产生乳酸的细菌更加活跃。

[0031] 图6:显示了结肠中的pH降低(48h和6h之间的差异)(右图)和乙酸产生(48h和6h之间的差异)(左图)。单独的GOS诱导pH下降和更高的乙酸产生。除GOS外加入结肠中的罗伊氏乳杆菌进一步放大了对pH和乙酸产生的影响,这意味着当将罗伊氏乳杆菌加入GOS中时,pH下降更多。与GOS组合的预调理的罗伊氏乳杆菌诱导结肠内更强的pH降低。与单独的GOS和GOS+罗伊氏乳杆菌相比,在预调理的罗伊氏乳杆菌和GOS存在下也产生更高水平的乙酸。pH是酸产生的标志。在GOS存在下,预调理的罗伊氏乳杆菌强烈地诱导乳酸和乙酸两者。

[0032] 图7:显示了第7天成骨细胞的早期分化,其测量碱性磷酸酶(ALP)活性。结果表明,GOS+罗伊氏乳杆菌菌株的预调理导致成骨细胞中ALP活性增加,从而提示,预调理的罗伊氏乳杆菌菌株+GOS可以刺激成骨细胞分化。

[0033] 图8:图示了茜素红吸收,这是由分化的成骨细胞合成的矿物质基质的标志物。结果表明,在第21天,与GOS+罗伊氏乳杆菌菌株(未经预调理)相比,GOS+预调理的罗伊氏乳杆菌菌株增强了茜素红水平。这提示,预调理的罗伊氏乳杆菌菌株+GOS可以刺激骨矿化。

[0034] 图9:图示了第4天的MC3T3迁移速度,这是细胞可动性的量度。结果表明,与单独的GOS或与罗伊氏乳杆菌菌株(未经预调理)组合的GOS相比,GOS+预调理的罗伊氏乳杆菌菌株更显著地减少细胞迁移。这表明预调理的罗伊氏乳杆菌菌株+GOS在刺激成骨细胞分化方面的优越性。

[0035] 图10:图示了第4天的MC3T3 Atf4基因表达,这是早期成骨细胞分化的标志物。结果表明,与对照条件相比,来自GOS+罗伊氏乳杆菌或GOS+预调理的罗伊氏乳杆菌条件的两种SCFA共混物显著增加了Atf4的mRNA表达。

[0036] 图11:图示了第4天的MC3T3 Ocn基因表达,这是成骨细胞矿化的标志物。结果表明,与GOS+罗伊氏乳杆菌(未经预调理)相比,预调理的罗伊氏乳杆菌+GOS通过各种SCFA共混物在刺激成骨细胞矿化方面的优越性。

具体实施方式

[0037] 本文发明提供了制造益生菌罗伊氏乳杆菌菌株时在发酵过程中使用特定底物组分增强哺乳动物的罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌作用的方法,并且进一步提供了预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和低聚半乳糖(GOS)的组合的令人惊讶地高的合生或协同作用,所述低聚半乳糖进一步加入以产生最终的益生菌组合物。因此,本发明的发明人已经开发了一种方法,其包含在培养益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的过程中使用GOS,即所谓的用GOS“预调

理”,以及添加另外的或补充性的GOS以产生最终的益生菌组合物。该方法令人惊讶地导致罗伊氏乳杆菌菌株的出乎意料地高的益生菌作用,特别是益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的存活的显著增加、骨形成和/或骨矿化增加、小生物群的代谢活性增加、矿物质的生物可达性增加,例如,如本文描述的,通过在施用预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株后增加受试者或患者的胃肠道内的矿物质溶解度、可达性和/或吸收。这种有益的且意想不到的高作用尤其是由于另外的GOS作为益生元和(GOS-)预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株在组合物中向有此需要的受试者或患者组合施用或以部件套件的形式施用而产生。

[0038] 因此,本发明旨在提供益生菌组合物和用途,其尤其增加矿物质生物可达性,并且因此也增加胃肠道中的矿物质吸收。详细而言,这样的解决方案是益生菌组合物,其包含与GOS组合的GOS预调理的罗伊氏乳杆菌菌株,所述GOS进一步加入以产生要施用给受试者(诸如需要增加矿物质吸收的受试者)的最终产品。增加的矿物质溶解度、可达性和吸收发生在胃肠道中,诸如在十二指肠、空肠、回肠和/或结肠中。

[0039] 本发明还旨在提供用于制备益生菌组合物的方法,所述益生菌组合物包含在所述益生菌组合物中的与GOS组合的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,从而由于这样的预调理的罗伊氏乳杆菌菌株与GOS的组合可以实现在胃肠道中矿物质溶解度和生物可达性以及矿物质吸收增加,所述GOS进一步加入以产生所述益生菌组合物。

[0040] 因此,本发明的目的涉及用于制备益生菌组合物的方法,所述益生菌组合物在所述益生菌组合物中包含与另外的GOS组合的这样的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,并且涉及与GOS组合的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的非治疗性和治疗性用途,用于尤其是增加哺乳动物的胃肠道中的矿物质溶解度、可达性和/或吸收。

[0041] 通过(GOS-)预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌和另外的GOS的组合施用而得到的改善的非治疗性和治疗性效果使得可能减少获得所追求的健康效果所需的益生菌和益生元(诸如GOS)的施用剂量和/或频率,或增加相同剂量的常规益生菌和/或益生元的有益效果。

[0042] 考虑到以上内容,公开了以下内容。

[0043] 用于制备包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌细菌和另外的GOS的组合物的方法

[0044] 根据第一方面,本发明提供了制备益生菌组合物的方法。所述方法包含以下步骤:

[0045] a)如下预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株:

[0046] ai)在生长培养基中存在低聚半乳糖(GOS)的情况下培养或培殖益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,由此预调理所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株;和

[0047] aii)从所述生长培养基中收获预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株;和

[0048] b)将GOS加给从步骤aii)得到的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株以制备组合物,通常被称作益生菌组合物。

[0049] 根据本发明的方法制备的组合物包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和另外的GOS。因而,所述方法的步骤b)制备包含从步骤aii)得到的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的组合物并将GOS加给所述组合物。

[0050] 在本发明的方法的步骤ai)中,益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的预调理如下发生:在生长培养基中存在GOS的情况下培养益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,由此预调理所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。在本发明的上下文中,术语益生菌罗伊氏乳杆菌细菌的“预调理”是指,用GOS(即在有GOS存在下)使所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株生长,诸如培养、培殖或发酵。在本

发明的上下文中,术语“培养”、“培殖”和“发酵”互换使用。在有GOS存在下益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的培养导致预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的形成。

[0051] 在步骤aii)中,然后从生长培养基中收获预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。术语“预调理的罗伊氏乳杆菌”表示益生菌罗伊氏乳杆菌菌株或通过包括用GOS预调理步骤的本发明的方法产生的预调理的罗伊氏乳杆菌菌株的细菌。

[0052] 此外,在本发明的方法的步骤b)中,通过组合从步骤aii)得到的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株并进一步添加GOS以制备或产生最终的益生菌组合物来形成所述组合物。

[0053] 本发明通篇使用的罗伊氏乳杆菌菌株通常可以是任何罗伊氏乳杆菌菌株,更优选任何商购可得的罗伊氏乳杆菌菌株。在该背景下,术语“罗伊氏乳杆菌菌株”和“罗伊氏乳杆菌细菌”可以同义使用。因此应当指出,在最近的十年中,DNA分析工具已经变得更加复杂,这已经使得科学家能够发现许多新的细菌物种以及认识到在历史上归类于乳杆菌属的物种过于多样化且不符合命名惯例。为了保持益生菌群体的准确和有序,乳杆菌属因此被分为25个不同的属,包括23个新属。因此,许多益生菌最近已经被赋予了新的属名。因此,罗伊氏乳杆菌(Lactobacillus reuteri,L.reuteri)的一个替代属名是罗伊氏粘液乳杆菌(Limosilactobacillus reuteri)。由于重新分类过程是最近才进行的,因此在本申请中为了清楚起见的目的,我们将使用以前的属命名法,即乳杆菌属。但是,使用可用的重新分类工具的任何人都可以容易地获得修订后的属命名法和替代名称。

[0054] 目前在所述组合物中提供的优选细菌是至少一种罗伊氏乳杆菌菌株或多种(即至少两种)罗伊氏乳杆菌菌株的细菌,优选地如本文所述。

[0055] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株是至少一种选自以下的罗伊氏乳杆菌菌株:罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32847、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465、罗伊氏乳杆菌DSM 33632、罗伊氏乳杆菌DSM 33633、罗伊氏乳杆菌DSM33634、罗伊氏乳杆菌DSM 33635、罗伊氏乳杆菌DSM 32231、罗伊氏乳杆菌DSM 32232、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6127和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659。

[0056] 可替换地或额外地,本文中使用的罗伊氏乳杆菌菌株可以从至少一种选自以下的罗伊氏乳杆菌菌株提供:罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465或罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659。

[0057] 目前优选的罗伊氏乳杆菌菌株是罗伊氏乳杆菌DSM 17938。

[0058] 可替换地或额外地,本文中使用的罗伊氏乳杆菌菌株可以从至少一种选自以下的罗伊氏乳杆菌菌株提供:罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465或罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659。

[0059] 罗伊氏乳杆菌DSM 17938于2006年1月30日在布达佩斯条约下保藏在DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(Mascheroder Weg 1b,D-38124Braunschweig,德国)。

[0060] 罗伊氏乳杆菌DSM 27131于2013年4月18日在布达佩斯条约下保藏在Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(Inhoffenstr.7B,D-38124Braunschweig,德国)。

[0061] 罗伊氏乳杆菌DSM 32846、DSM 32847、DSM 32848和DSM 32849于2018年7月4日在布达佩斯条约下保藏在Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(Inhoffenstr.7B,D-38124Braunschweig,德国)。

[0062] 罗伊氏乳杆菌DSM 32465于2017年3月21日在布达佩斯条约下保藏在Leibniz Institute DSMZ-德国微生物和细胞培养物保藏中心(Inhoffenstr.7B,D-38124Braunschweig,德国)。

[0063] 罗伊氏乳杆菌DSM 33632、DSM 33633、DSM 33634和DSM 33635于2020年9月9日在布达佩斯条约下保藏在Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(Inhoffenstr.7B,D-38124Braunschweig,德国)。

[0064] 罗伊氏乳杆菌DSM 32231和DSM 32232于2015年12月11日在布达佩斯条约下保藏在Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(Inhoffenstr.7B,D-38124Braunschweig,德国)。

[0065] 罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289于2003年6月25日在布达佩斯条约下保藏在美国典型培养物保藏中心(10801University Blvd.,Manassas,VA 20110-2209,美国)。

[0066] 罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475于2004年12月21日在布达佩斯条约下保藏在美国典型培养物保藏中心(10801University Blvd.,Manassas,VA 20110-2209,美国)。

[0067] 罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659于2002年9月11日在布达佩斯条约下保藏在美国典型培养物保藏中心(10801University Blvd.,Manassas,VA20110-2209,美国)。

[0068] 罗伊氏乳杆菌ATCC PTA6127于2004年7月22日在布达佩斯条约下保藏在美国典型培养物保藏中心(10801University Blvd.,Manassas,VA20110-2209,美国)。

[0069] 本文中使用的术语“GOS”是指“低聚半乳糖”。本文中使用的低聚半乳糖(GOS)通常由β-连接的半乳糖部分组成,在还原端具有半乳糖或葡萄糖。这样的GOS含有β-(1→2)、β-(1→3)、β-(1→4)或β-(1→6)连接的半乳糖部分,并且可以具有3-8个半乳糖单元的聚合度(DP)。因此,术语GOS优选地被称作包含至少三个半乳糖单元的寡糖,更优选地被称作包含至少四个半乳糖单元的寡糖,优选地具有3-8个半乳糖单元的聚合度(DP)。寡糖天然存在于一些哺乳动物(例如牛和人)的乳汁中。GOS是商购可得的,并且可以通过β-半乳糖苷酶的反式-半乳糖苷酶活性从乳糖经由生物合成过程来合成。高浓度的乳糖或乳果糖、不完全的乳糖周转、低水活度以及偏好反式-半乳糖基化的酶的使用通常有利于生物合成程序中的GOS形成。由这样的过程产生的GOS的连接类型对于生物合成所用的酶具有特异性。

[0070] 可以有利地在本文中用作GOS源以使益生菌细菌生长的一种特定类型的碳水化合物的混合物是GOS和牛奶寡糖的混合物。具体地,优选使用GOS与3’-唾液酸基乳糖(3’-SL)和/或6’-唾液酸基乳糖(6’-SL)的混合物。实际上,这样的混合物含有一些类似于人奶的寡糖,当本发明的组合物用作婴儿配方奶粉或用作婴儿的营养补充剂时,这是特别有利的。例如,Simeoni等人描述了这样的有利的效果:“肠道小生物群分析揭示,含有牛奶衍生的寡糖

和动物双歧杆菌乳酸亚种(Bifidobacterium animalis subsp.lactis)CNCM I-3446的合生元的1段婴儿配方奶粉明显转向双歧杆菌";Environ Microbiol,2016,18(7):2185-2195。这样的组合物通常可以如下得到:浓缩乳清渗透物以获得浓缩的牛乳寡糖组合物,并且添加GOS或通过β-半乳糖苷酶的作用由乳糖水解原位产生GOS。

[0071] 可以以基本上纯的GOS的形式(即,具有至少90%GOS的成分)或作为包含GOS的混合物(诸如碳水化合物的混合物)的一部分提供在本发明的方法的步骤ai)中用于预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的GOS源和在用于制备包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和GOS的最终组合物的步骤b)中进一步加入的GOS源。

[0072] 用GOS预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的一个方面是,在生长培养基中提供足够量的GOS。因此,根据一个实施方案,通常将GOS源以例如在生长培养基中提供至少0.2重量%、优选地至少0.5重量%、甚至更优选地至少0.75重量%的GOS的量加入本发明的制备益生菌组合物的方法的步骤ai)中的生长培养基中。在一个优选的实施方案中,以例如在生长培养基中提供至多8重量%的GOS、诸如约7重量%GOS、6重量%GOS或甚至至多5重量%GOS、更优选地至多4重量%的GOS或甚至至多3重量%GOS的量提供GOS,优选地基于生长培养基进行计算(%w/w)。这些上限和下限的任何组合均被包含在本文中。优选地,在0.2重量%至8重量%或甚至0.2重量%至7重量%或0.2重量%至6重量%的范围内将GOS加入所述生长培养基中,诸如在0.5重量%至8重量%或甚至0.5重量%至7重量%或0.5重量%至6重量%的范围内,或在0.75重量%至8重量%或甚至0.75重量%至7重量%或0.75重量%至6重量%的范围内。优选地,在0.2重量%至8重量%的范围内将GOS加入所述生长培养基中,优选地在0.5重量%至7重量%的范围内,更优选地在0.75重量%至6重量%的范围内,且最优选地在0.75重量%至5重量%的范围内,诸如在0.75重量%至3重量%或0.75重量%至4重量%的范围内,优选地基于生长培养基进行计算。

[0073] 当碳水化合物的混合物用作用于预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的GOS源时,或当制备含有预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和GOS的最终组合物时,优选的是,在这样的混合物中的GOS的量是至少20重量%,优选地至少30重量%,更优选地至少40重量%,甚至更优选地至少45重量%,最优选地至少48重量%,优选地基于含有GOS的混合物的干重进行计算。

[0074] 在一个实施方案中,在步骤ai)中将GOS用作益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的底物,诸如发酵底物。因此,在这样的一个实施方案中,在益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的培养或发酵期间将GOS用作碳源。

[0075] 虽然所述细菌在发酵过程中不一定只消耗GOS作为碳源,但在预调理步骤中在GOS源中GOS的高比例有利于所述细菌在发酵过程中消耗GOS而不是消耗其它碳水化合物,从而导致改善的预调理作用。较小的碳水化合物诸如二糖(例如乳糖)也可以存在并被支持预调理作用的细菌消耗。因此,还优选的是,在预调理步骤ai)期间,GOS源包含至多55重量%、优选地至多50重量%、更优选地至多45重量%、最优选地至多42重量%的单糖或二糖和/或不超过40重量%、优选地不超过30重量%乳糖,优选地基于含有GOS的混合物的干重进行计算。作为一个例子,在预调理步骤期间用作GOS源的碳水化合物的混合物可以包含上文针对所述混合物定义的量的GOS,并且其余部分由乳糖、葡萄糖和/或半乳糖和任选的3'-SL和/或6'-SL形成。

[0076] 在一个实施方案中,所述培养基还包含电子受体,诸如果糖、柠檬酸盐、甘油和/或1,2-丙二醇。

[0077] 在一个特定实施方案中,所述培养基还包含果糖,诸如充当电子受体。在示例性的但非限制性的实施例中,所述培养基可以包含至少0.2重量%果糖、优选地至少0.5重量%果糖、更优选地至少1重量%果糖、甚至更优选地至少1.5重量%果糖,基于培养基的干重进行计算。相应地,在示例性的但非限制性的实施例中,所述培养基优选地包含不超过16重量%果糖、优选地不超过14重量%果糖、更优选地不超过12重量%果糖,且甚至更优选地不超过10重量%果糖。这些上限和下限的任何组合均被包含在本文中。在一个实施方案中,所述培养基包含选自0.25:1至5:1的范围内、优选地0.5:1至4:1的范围内和更优选地0.75至2.5:1的范围内的电子受体(例如,果糖)与GOS之间的重量%比率。具体地,电子受体(例如,果糖)与GOS之间的优选重量%比率是在约1:1至约2:1的范围内。

[0078] 根据另一个实施方案,在制备益生菌组合物的方法的步骤ai)中GOS向生长培养基中的添加可以发生在培养步骤ai)的任何时间点,例如,在益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的培养开始时,在步骤ai)中培养益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的中期或结束时,其中添加可以一次性地、逐步地(例如,在多个分开的时间情况)或连续地进行。

[0079] 以本领域技术人员众所周知的方式进行培养步骤ai)。在步骤ai)中的培养包括用确定量的细菌(菌落形成单位(cfu))接种无菌标准生长培养基、随后在确定的温度(通常37℃)和pH下温育的步骤。在该背景下,用于开始无菌标准生长培养基的接种的确定量的细菌(cfu)可以由技术人员根据本领域的普通一般知识和实践来确定。使用如上所述的包含GOS的生长培养基可以获得合适的产率,优选地与本领域技术人员使用标准生长培养基培养相同菌株所使用的培养条件相比无需改变培养条件。

[0080] 在本发明的步骤ai)中用于培养/发酵罗伊氏乳杆菌菌株的标准生长培养基可以是用于乳杆菌和乳酸细菌(LAB)的任何已知的标准生长培养基,诸如MRS培养基或任何其它合适的培养基。这样的标准生长培养基优选是商购可得的,但也可以根据众所周知的标准处方通过添加化合物来生产。用于罗伊氏乳杆菌菌株的标准生长培养基通常可以含有碳水化合物(诸如选自例如右旋糖、蔗糖、麦芽糖、果糖或乳糖的单糖)、各种氮源(诸如蛋白胨、酵母提取物、牛肉膏或乳清蛋白),矿物质(主要是Mn^{2+}和Mg^{2+})和缓冲剂,诸如乙酸钠(CH_3COONa)、柠檬酸三钠($Na_3C_6H_5O_7$)或甘油磷酸二钠($C_3H_7Na_2O_6P$)是LAB培养基中的常用缓冲剂。已经在标准生长培养基中使用的具有缓冲活性的其它组分可能包括磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、柠檬酸铵($NH_4C_6H_5O_7$)、磷酸三钠(Na_3PO_4)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、磷酸三镁$Mg_3(PO_4)_2$、碳酸钙($CaCO_3$)和磷酸氢二钾(K_2HPO_4)。这样的标准生长培养基还可以含有多种生长因子、表面活性剂,诸如卵磷脂或吐温®(例如,吐温®20、80和85)。所述培养/发酵可以在厌氧或好氧条件下进行,取决于待生产的菌株,但优选在厌氧条件下进行。此外,可以控制或不控制pH,取决于已知对于特定菌株生长而言最佳的条件。培养步骤的温度和持续时间对于不同的菌株是可变的,并且也是益生菌罗伊氏乳杆菌菌株培养领域的技术人员所众所周知的。

[0081] 根据一个实施方案,在本发明的方法的步骤ai)中益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的培养/发酵发生相当长的一段时间中以允许在GOS存在下预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,通常至少1小时的阶段,优选5至18小时的阶段,同样优选7至14小时的阶段,更优选10至13小

时的阶段,并且甚至更优选约12小时的阶段。

[0082] 此外,根据另一个实施方案,在本发明的方法的步骤ai)中益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的培养/发酵发生在25至45℃之间的温度,优选地在30至40℃之间,并且甚至更优选地在35至39℃之间的温度,诸如约37℃。

[0083] 另外,在另一个实施方案中,在本发明的方法的步骤ai)中益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的培养/发酵发生在3.0至7之间的pH。在培养步骤ai)中对益生菌罗伊氏乳杆菌菌株进行预调理期间的pH可以在整个培养步骤ai)中不进行控制或设定为恒定值,通常在培养步骤ai)期间进行监测和调节。因此,所述pH可以是在3.0至7之间,特别是当在益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的预调理期间未控制pH时。可替换地,如果在培养步骤ai)期间控制pH,则可以将pH调节至约5.0至7.0的范围,例如,约5.0至6.0、约5.5至6.5(例如,约6.0±0.2)或约6.0至7.0(例如,约6.6±0.2),更优选地可以将pH调节至约5.5至6.5的范围,甚至更优选地可以将pH调节至约6.0±0.4的范围,且最优选地可以将pH调节至约6.0±0.2的范围,同样优选地可以将pH调节至约6.0至7.0的范围,同样更优选约6.6±0.4,最优选6.6±0.2。

[0084] 在本发明的方法的步骤ai)中培养/发酵益生菌罗伊氏乳杆菌菌株以后,在步骤aii)中收获由此预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。旨在从生长培养基中分离细菌细胞的收获步骤也以本领域技术人员众所周知的方式进行,诸如通过浓缩细菌、离心、过滤、膜过滤、倾析、分离、纯化等,优选地离心或浓缩益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。通常,预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的收获发生在步骤aii)中,在如上文针对步骤ai)中的培养/发酵所定义的至少1小时的阶段之后。

[0085] 在步骤aii)中收获预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株之后,可以将收获的细胞在进一步加工之前在任选的步骤aiii)中洗涤,通常以(在培养/发酵之后)除去痕量的生长培养基。可以用盐水(saline water)、盐水(brine)或任何其它合适的液体进行洗涤。

[0086] 在根据步骤aii)从所述生长培养基中收获预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株之后直接地,或者在任选的洗涤步骤aiii)之后,可以将预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株进行干燥步骤aiv)。这样的干燥步骤aiv)可以通过技术人员已知的任何方法进行,诸如喷雾干燥、流化床干燥、空气对流干燥、风干、滚筒干燥或冷冻干燥、低压冻干,并且更优选喷雾干燥或冷冻干燥。喷雾干燥也可以在保护剂存在下进行,例如,如在WO 2017/001590中所述。

[0087] 任选地,从生长培养基收获之后和/或洗涤预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株之后获得的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株可以在干燥步骤之前进一步与保护性试剂诸如保护剂、冷冻保护剂、冻干保护剂和/或载体混合,这是本领域技术人员已知的,并且适当地取决于要使用的干燥方法和要干燥的细菌。这样的保护剂、冷冻保护剂、冻干保护剂和/或载体通常包括甘油、脱脂奶、血清白蛋白、蛋白胨、酵母提取物、蔗糖、葡萄糖、山梨醇、麦芽提取物、海藻糖等。商购可得的保护剂或冷冻保护剂包括例如Unipectine™RS 150等,或如在EP 3016511、US2014/0004083 A1、US2016/0298077 A1等中所述。

[0088] 可替换地或另外,从生长培养基收获后、洗涤后或甚至干燥后获得的(即在步骤aii)、aiii)或aiv)中的任一个之后获得的)预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,可以被封装用于进一步保存和/或使用,例如,通过使用常见的包封剂(例如,海藻酸盐、海藻酸盐/普鲁兰多糖、淀粉、黄原胶、黄原胶-结兰胶混合物、明胶、醋酸邻苯二甲酸纤维素、壳聚糖)或

任何其它合适的封装材料形成含有预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的微球。封装是众所周知的并且可以由本领域技术人员进行。

[0089] 此外,本发明的用于制备益生菌的方法包含以下步骤b):将GOS加给从步骤a)获得的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株以制备、生产或形成益生菌组合物。GOS可以以如上所定义的量应用,可以是纯的或如前所定义的混合物。

[0090] 可以将益生元GOS在步骤ai)中培养之后的任何时间加入预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株中。如果所述方法包括如上所述的另外步骤,即洗涤和/或干燥,则可以在任何这样的步骤之前、期间和/或之后添加GOS。在一个特定实施方案中,在干燥步骤之后将GOS加入预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株中。

[0091] 可以在该方法期间一次性地或在多个不同时机将GOS加入预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株中。

[0092] 根据一个优选的实施方案,可以在本发明的方法的步骤b)中将GOS加入从步骤a)获得的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株中,所述GOS的量为至少1或2g,优选地至少3g,同样优选地在2至12g之间,或在2至10g之间,在2至8g之间,或在2至7g之间,更优选地在3至12g之间,同样更优选地在3至10g之间,诸如在3至8g之间,在3至7g之间,在3至6g之间,或约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12g或由此形成的任何范围,以制备(最终的)益生菌组合物。在步骤b)中添加的GOS的上述量优选为每日剂量的GOS的量。因此,在一个优选的实施方案中,所述益生菌组合物以剂型或剂量单位提供,其在本文中进一步描述。在这样的情况下,这样的剂型或剂量单位优选地包含上述量的GOS。例如,益生菌组合物的剂量单位包含至少1g GOS。这意味着,步骤b)则对应于将GOS加给从步骤aii)得到的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株以制备益生菌组合物的剂量单位,并且其中该剂量单位包含至少1g GOS。

[0093] 包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌细菌和GOS的组合物

[0094] 根据第二方面,本发明提供了益生菌组合物,其包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和另外的有效量的GOS,其中所述预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株已经通过在生长培养基中存在GOS的情况下培养罗伊氏乳杆菌菌株来制备。

[0095] 在一个实施方案中,所述益生菌组合物已经根据本发明的方法制备/得到,即,可通过本发明的制备益生菌组合物的方法得到。在该背景下,预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株是已经在有GOS存在下(例如,在上文关于本发明的制备益生菌组合物的方法所定义的条件下)培养的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。在有GOS存在下对益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的这样的预调理通常根据本文在本发明的第一方面下描述的本发明的方法进行。如上文已经详细公开的,在有GOS存在下益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的培养/发酵优选地进行足以相应地预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的时间,例如,经过至少一小时的阶段,优选地根据本文定义的方法。

[0096] 所述益生菌组合物包含有效量的收获的、预调理的罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS,所述GOS添加或补充(即,以GOS补充剂的形式)至收获的、预调理的罗伊氏乳杆菌菌株。

[0097] 如前所述,所述罗伊氏乳杆菌菌株特别优选地是如上定义的至少一种罗伊氏乳杆菌菌株或多种罗伊氏乳杆菌菌株,优选地选自罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32847、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊

氏乳杆菌DSM 32465、罗伊氏乳杆菌DSM 33632、罗伊氏乳杆菌DSM 33633、罗伊氏乳杆菌DSM 33634、罗伊氏乳杆菌DSM 33635、罗伊氏乳杆菌DSM 32231、罗伊氏乳杆菌DSM 32232、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6127和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659,更优选地选自罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA4659,且最优选地所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株是罗伊氏乳杆菌DSM 17938。

[0098] 在一个实施方案中,所述罗伊氏乳杆菌菌株特别优选地是如上定义的至少一种罗伊氏乳杆菌菌株或多种罗伊氏乳杆菌菌株,优选地选自罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659。

[0099] 在一个实施方案中,所述罗伊氏乳杆菌菌株特别优选地是如上定义的至少一种罗伊氏乳杆菌菌株或多种罗伊氏乳杆菌菌株,优选地选自罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 27131和罗伊氏乳杆菌DSM 32465。

[0100] 通常,如本文中关于所述组合物定义的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的“有效量”可以包含以下量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株:通常在10^3cfu至10^{12}cfu之间的量,通常在10^4cfu至10^{11}cfu之间的量,优选地在10^5cfu至10^{10}cfu或10^5cfu至10^9cfu之间的量,同样优选地在10^6cfu至10^9cfu、10^6cfu至10^8cfu之间的量,或10^8cfu至10^{10}cfu的量。预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的上述量优选地是每日剂量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的量。例如,所述益生菌组合物的剂型或剂量单位优选地包含上述量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。

[0101] 优选的每日剂量是约10^8总cfu/每日剂量,例如,10^7至10^9或10^8至10^9cfu/每日剂量。

[0102] 此外,如本文中关于所述组合物定义的GOS的“有效量”可以包含以下量的GOS:至少1或2g,优选地至少3g,同样优选地在2至12g之间,或在2至10g之间,在2至8g之间,或在2至7g之间,诸如在3至12g之间,同样更优选地在3至10g之间,诸如在3至8g之间,在3至7g之间,在3至6g之间,或约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12g或由此形成的任何范围。GOS的上述量优选地是每日剂量的GOS的量。例如,所述益生菌组合物的剂型或剂量单位优选地包含上述量的GOS。

[0103] 所述益生菌组合物可以包含本文前面提及的干燥形式的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。在这样的情况下,所述预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株优选地是喷雾干燥或冷冻干燥形式。因此,在一个实施方案中,所述益生菌组合物包含有效量的冷冻干燥的、预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS。

[0104] 如本文中定义的包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和另外的有效量的GOS的本发明的益生菌组合物可以是任何类型的其中可掺入益生菌细菌的组合物,诸如食物产品、饮料、动物饲料产品、人或动物的营养补充剂、药物组合物或化妆品组合物。更优选地,本发明的益生菌组合物可以以可施用的形式提供,优选地选自食物产品、饮料、药物制剂、饮食添加物、营养组合物或补充剂、功能性食品产品、功能性饮料产品、营养药物和它们的组合。这样的可施用形式的示例性例子包括乳制产品、基于奶的产品和基于乳清蛋

白的饮料。

[0105] 根据一个特定实施方案,有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS可以被包含在部件套件的两个不同部分中。然后如之前所描述的那样进行之前所描述的方法或制备,唯一的差别在于将有效量的GOS加入不同的部件套件的部分而不是有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株中。

[0106] 本发明的益生菌组合物可以是固体或液体。优选地,它以粉末、药囊、片剂、胶囊剂的形式存在,或者它可以以油制剂、乳剂例如水包油乳剂(o/w乳剂)、油包水乳剂(w/o乳剂)等形式存在。如果以粉末形式存在,则它可以旨在由最终消费者以固体(诸如粉末形式)或半固体形式(例如以糊剂形式)使用,或者可替换地在使用前被重构为液体。

[0107] 如本文中定义的食物产品和饮料可以包括旨在为了提供营养和/或愉悦的目的而由人类口服消耗的所有产品。表述“食物产品”以及术语“饮料”通常是指滋养受试者的组合物。这种“食物产品”通常口服地或腹膜内地施用,并且它可以包括脂质或脂肪源和蛋白源。同样,“饮料”通常是口服地施用,是液体或半液体,并且可以包括脂质或脂肪源和蛋白源。

[0108] 如本文中定义的食物产品和饮料可以例如包括营养组合物,优选用于人消耗,诸如用于婴儿和/或幼儿、用于孕妇或哺乳期妇女或希望怀孕的妇女、用于由于健康状况不佳而需要的特殊营养的个体或用于老年人。更优选地,所述营养组合物选自婴儿配方奶粉、婴儿谷物食品、较大或2段婴儿配方奶粉、成长奶、功能奶、婴儿食品、婴儿谷物组合物以及用于孕妇和哺乳期妇女或用于希望怀孕的妇女的奶制品。食物产品和饮料的其它例子包括甜味和咸味零食、粉状饮料、谷类产品和乳制产品,诸如奶制品、基于乳清蛋白的产品等。根据一个特定实施方案,本发明的益生菌组合物是婴儿配方奶粉、2段婴儿配方奶粉、成长奶或用于孕妇或哺乳期妇女的产品。在另一个特定实施方案中,本发明的益生菌组合物可以是婴儿配方奶粉。

[0109] 本发明的益生菌组合物还可以是动物食物产品或动物营养补充剂的形式。优选地,所述动物是哺乳动物。动物的例子包括牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠、小鼠、鱼、禽类等。但是,本发明的益生菌组合物的优选用途是用于人类。

[0110] 本文中使用的表述“婴儿配方奶粉”表示供婴儿在生命的前几个月期间获取特定营养的食品,并且其本身满足这类人的营养需求(参考:2006年12月22日关于婴儿配方奶粉和2段婴儿配方奶粉的欧盟委员会导则91/321/EEC 2006/141/EC的第2(c)条;Reg 609/2013条款2.1.c和Reg 2016/127)。它也表示婴儿的营养组合物,并且如在Codex Alimentarius(Codex STAN 72-1981)和婴儿特种食品(包括用于特殊医学目的的食品)中所定义。表述“婴儿配方奶粉”涵盖“1段婴儿配方奶粉”和“较大婴儿配方奶粉”或“2段婴儿配方奶粉”,并且包括要提供给早产儿的组合物。

[0111] “较大婴儿配方奶粉”或“2段婴儿配方奶粉”是从第6个月起施用的婴儿营养组合物。它构成了这类人逐渐多样化的饮食中的主要液体要素。

[0112] 表述“婴儿食品”是指旨在供婴儿或幼儿在生命的前几年期间获取特定营养的食品。

[0113] 在本发明的上下文中,术语“婴儿”是指12个月龄以下的儿童。此外,表述“幼儿(“young child)”是指一岁至三岁之间的儿童,也被称作幼儿(toddler)。

[0114] 表述“婴儿谷类组合物”是指旨在供婴儿或幼儿在生命的前几年期间获取特定营

养的食品。

[0115] 如上所述,饮食或营养补充剂通常以液体形式(诸如冷冻液体)、粉末或片剂或胶囊形式、油制剂、乳剂(例如水包油乳剂(o/w乳剂)、油包水乳剂(w/o乳剂))等存在。优选地,它是粉末、药囊、片剂、胶囊剂或油制剂的形式。粉末补充剂通常涵盖要溶解在液体中或要撒在食物上或饮料中的补充剂。这样的补充剂旨在为食用它的受试者提供另外的营养物和/或健康益处,以及其它有益成分,诸如本文定义和制备的预调理的益生菌细菌罗伊氏乳杆菌和另外的有效量的GOS。因此,根据本发明的补充剂可以用于向人类以及动物提供营养物和/或健康益处,如上文所定义。饮食或营养补充剂包括例如本文定义和制备的预调理的益生菌细菌罗伊氏乳杆菌和另外的有效量的GOS,其作为要加入任何种类的饮食或营养组合物中的粉末补充剂。

[0116] 药物产品包括意图在有此需要的受试者中治疗或预防不利的医学病况或促进有利的健康状况的粉末、药囊、片剂或胶囊产品。

[0117] 化妆品组合物通常旨在对身体产生美学效果并且可以用于局部使用或可以以粉末、药囊、片剂或胶囊的形式通过口服途径施用。

[0118] 包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌细菌和GOS的本发明的组合物的应用

[0119] 本发明旨在提供溶液、组合物和用途,其尤其增加在胃肠道中的矿物质溶解度和生物可达性以及矿物质吸收。详细地讲,这样的溶液是包含有效量的GOS预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和另外的有效量的GOS的益生菌组合物,其要施用给有此需要的受试者或患者,例如,需要增加矿物质吸收的受试者或患者。增加矿物质溶解度、可达性和吸收发生在胃肠道中,诸如十二指肠(小肠的第一部分)、空肠(小肠的中部)、回肠(小肠的最后部分)和/或在结肠(大肠)中。本发明还旨在提供用于制备益生菌组合物的方法,所述益生菌组合物包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和另外的(即补充了)有效量的GOS,使得在胃肠道中增加矿物质溶解度和生物可达性以及增加矿物质吸收可以通过这样的组合来实现。

[0120] 如上面已经描述的,矿物质对于所有活物种都是必不可少的,尽管具体要求在物种之间有所不同。矿物质缺乏可能导致疾病,矿物质过量也可能导致疾病。因此,最佳的健康需要以正确的比例摄入正确量的矿物质。大多数天然饮食会提供适当平衡的矿物质,但在某些情况下,均衡饮食不足以维持在矿物质方面的健康。如提及的,矿物质在生物体中是必需的并且具有许多重要功能。

[0121] 例如,铁负责氧气和肌红蛋白的运输。此外,铁是许多酶(诸如过氧化氢酶、过氧化物酶和细胞色素)的组成部分。铁通常以Fe^{2+}的形式在十二指肠和小肠上部中被胃肠道中的细胞吸收,所述细胞从摄入的食物中吸收铁。

[0122] 钙是另一种必需的矿物质,其尤其是重要的骨组分和酶的活化剂。钙还参与生物电脉冲的传导、血液凝固、肌肉收缩、炎症和激素分泌。钙通常在维生素D的活性形式(骨化三醇)的存在下在小肠中被吸收。

[0123] 任何这样的矿物质的矿物质缺乏可以导致严重的并发症、病况和疾病。以下非治疗性和治疗性应用意图如下解决这样的矿物质缺乏:以非治疗性方式在例如健康的受试者中预防或治疗矿物质缺乏,例如,通过提供本发明的组合物作为营养补充剂或饮料,或者在有此需要的受试者中通过施用或供应如上所定义的组合物,例如,作为营养组合物或饮料,作为药物组合物等。

[0124] 本发明也提供了方法、溶液、组合物和用途,其使用益生菌组合物增加胃肠道中的矿物质溶解度和生物可达性以及矿物质吸收,所述益生菌组合物包含与额外量的GOS组合的GOS预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株。本文描述的应用中的任一种可以用如上所述的本发明的组合物或本文描述的部件套件来进行。

[0125] 如本文所示,本发明的益生菌组合物允许在哺乳动物中增强罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌作用,制造益生菌罗伊氏乳杆菌菌株时在发酵过程中使用GOS作为特定底物组分,并进一步用GOS补充这样的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株以制备最终组合物。本文公开的方法具体提供了这样的益生菌组合物的制备,其在第一步中通过在益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的培养过程中使用GOS来预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,使得在第二步中添加GOS以后,罗伊氏乳杆菌菌株的特别增加的有益益生菌作用在体内发生,特别是在本文公开的非治疗性和治疗性施用期间。这具体涉及并允许例如益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的存活增加、肠道小生物群的代谢活性增加以及矿物质的生物可达性增加,例如,通过增加在受试者或患者的胃肠道内的矿物质溶解度、矿物质可达性和/或吸收,这发生在施用如本文描述的包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株以及GOS的组合物后。

[0126] 另外,肠道小生物群的代谢活性增加变得明显,例如,通过如本文所述施用补充了GOS的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株后增加的乳酸产生。观察到的增加的乳酸以及增加的乙酸产生指示某些肠道细菌(例如,乳杆菌属和产生乳酸的细菌)的更高活性,并表明由于补充了GOS的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的施用已经调节小生物群(产生更健康的小生物群)。罗伊氏乳杆菌的存活改善、结肠小生物群的代谢活性显著增加以及结肠中矿物质(铁和钙)溶解度特别增加,可以归因于在最终组合物中进一步补充了GOS的预调理的罗伊氏乳杆菌的组合施用。通过施用本发明的益生菌组合物向有此需要的受试者和/或患者施用的这种组合使得可能减少获得所追求的健康效果所需的益生菌的施用剂量和/或频率。

[0127] 在下面列出了示例性的治疗性和非治疗性应用(用途),但不限于此。

[0128] ●包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌细菌和GOS的组合物的非治疗性用途

[0129] 根据第三方面,本发明提供了包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS的益生菌组合物用于改善、增加或提高健康受试者的消化道中的罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌作用的非治疗性用途,所述益生菌组合物可通过本发明的方法或本文描述的其它方法获得或制备,通常以可施用的组合物的形式。补充了GOS的预调理的益生菌在健康受试者的消化道中的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌作用的这样的改善、增加或提高通常可以通过与补充或未补充GOS的在健康受试者的消化道中的尚未预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株进行对比来确定。

[0130] 益生菌罗伊氏乳杆菌菌株在健康受试者的消化道中的通常益生菌作用的改善、增加或提高尤其但不排他性地涉及矿物质的生物可达性的增加,并且具体地涉及健康受试者的胃肠道内的矿物质溶解度、矿物质生物可达性和/或吸收的增加。在一个实施方案中,矿物质的生物利用度的增加可以导致酶功能增加。这样的矿物质优选地是本文提及的必需矿物质,例如钙和/或铁。

[0131] 益生菌作用的增加可以表现为例如改善健康受试者的肠道中的罗伊氏乳杆菌存活、增加在受试者的肠道中的乳酸和/或乙酸产生和/或促进健康受试者中的健康小生物

群。

[0132] 根据一个特定实施方案,本文定义的益生菌组合物的非治疗性用途因此优选地用于在健康受试者的消化道中改善或增加益生菌作用,优选罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌作用。这样的改善或增加益生菌作用可以是例如,

[0133] -健康受试者的肠道中矿物质生物可达性增加,优选矿物质溶解度和/或矿物质吸收增加;和/或

[0134] -促进健康受试者的肠道中的健康小生物群;和/或

[0135] -促进罗伊氏乳杆菌菌株在肠道中(例如,在结肠中)的存活,并因此促进与罗伊氏乳杆菌菌株相关的健康益处;和/或

[0136] -肠道小生物群、优选罗伊氏乳杆菌菌株的代谢活性的增加,诸如健康受试者的肠道中以乳酸和/或乙酸产生增加的形式;和/或

[0137] -是健康受试者中骨形成和/或骨矿化增加和/或成骨细胞成熟和/或活性增加。

[0138] 在必需的矿物质中,钙参与生物电脉冲的传导、血液凝固、肌肉收缩、预防炎症和激素分泌。铁是许多身体功能和过程的重要因素,并且是维持健康的细胞、皮肤、毛发和指甲所必需的。

[0139] 这样的矿物质在健康受试者的肠道中的生物可达性的增加(优选地通过增加健康受试者的胃肠道中的矿物质溶解度、可达性和/或吸收)从而优选地允许增加这样的身体功能和过程中的任一种。这些方面特别涉及可以应用本发明的益生菌组合物的非治疗应用以及美容应用。应当强调的是,健康受试者可以明显受益于要求保护的非治疗性用途所提高的矿物质利用度,因为大多数矿物质并未被身体完全吸收。具体地,健康受试者可以受益于优化的或改善的骨健康、骨形成、牙齿状况、牙齿生长、肌肉功能、认知功能、免疫功能和/或一般生长和发育(尤其对于儿童/婴儿)。

[0140] 除了对受试者的胃肠道内矿物质溶解度、矿物质可达性和/或吸收的这种作用之外,其它非治疗性用途可以涵盖改善健康受试者肠道中的罗伊氏乳杆菌菌株代谢活性和/或罗伊氏乳杆菌菌株存活和/或促进健康受试者中的健康小生物群。

[0141] 本文中使用的受试者中的健康小生物群是指,在受试者中的小生物群组合物对受试者有利且有益。因此,本发明的益生菌组合物可以在受试者中产生有利的小生物群组合物(“健康的小生物群”),并且甚至可以在受试者中产生更有利的小生物群组合物(“更健康的小生物群”)。

[0142] 在该背景下,作为该非治疗性用途的主要对象的健康受试者可以选自运动员、儿童、幼儿或婴儿、成人、老年人、孕妇、素食主义者、哺乳期妇女、伴侣动物、猫、狗或禽类,优选用于解决或甚至改善这样的身体功能和身体过程。这样的健康受试者通常不患有任何病况或疾病,特别是不患有本文描述的任何矿物质缺乏。

[0143] 本文讨论的用于预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的任何实施方案以及本文定义的包含补充了GOS的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌组合物的任何特征,在细节上做必要的修正后适用于本发明的第三方面,即如上所述的本发明的益生菌组合物的非治疗性用途。

[0144] 这具体涉及预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的方法、用补充了GOS的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株制备益生菌组合物的特征,以及用于包含预调理的益生菌罗伊氏乳

杆菌菌株的组合物的任何成分和量和其它特征。所述益生菌组合物可以以如上所述的任何形式提供。

[0145] 在该背景下,例如,应当指出,用于非治疗目的的本发明的益生菌组合物可以是固体或液体,和/或以粉末、药囊、片剂、胶囊剂的形式存在,或者可以是油制剂、乳剂、水包油乳剂(o/w乳剂)或油包水乳剂(w/o乳剂)的形式。

[0146] 此外,用于非治疗目的的本发明的益生菌组合物可以是可施用的形式,优选地选自营养组合物、药物制剂、饮食添加物、功能性食品产品、功能性饮料产品和它们的组合,例如,乳制产品、基于奶的产品、基于乳清蛋白的饮料。

[0147] 如前所述,所述罗伊氏乳杆菌菌株是特别优选的至少一种罗伊氏乳杆菌菌株或多种罗伊氏乳杆菌菌株,其选自罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32847、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465、罗伊氏乳杆菌DSM 33632、罗伊氏乳杆菌DSM 33633、罗伊氏乳杆菌DSM 33634、罗伊氏乳杆菌DSM 33635、罗伊氏乳杆菌DSM 32231、罗伊氏乳杆菌DSM 32232、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6127和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659,优选地选自罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659,并且更优选地所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株是罗伊氏乳杆菌DSM 17938。

[0148] • 包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌细菌和GOS的组合物作为药物的用途

[0149] 根据第四方面,本发明还提供了用作药物的包含补充了GOS的有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌组合物,其可通过本发明的方法或本文描述的其它方法获得。

[0150] 与之前类似,这样的益生菌组合物作为药物的效果特别与需要这样的药物的受试者的消化道中的合生益生元和益生菌作用的增加有关,通常与未用GOS预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株或益生元和益生菌的常见组合的效果相比。

[0151] 与本发明的益生菌组合物作为药物的用途相关的治疗效果尤其涉及与本文提到的疾病和应用中的任一种相关的效果,特别是在处于患任何这样的疾病的危险中或已经患有任何这样的疾病的受试者中,特别是本文在治疗用途的上下文中明确提及的疾病(也参见下文)。

[0152] 之前讨论的用于预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的任何实施方案以及本文定义的包含补充了GOS的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌组合物的任何特征,在细节上做必要的修正后也适用于本发明的第四方面,即本发明的益生菌组合物作为药物的用途。

[0153] 这具体涉及制备包含补充了GOS的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌组合物的方法的特征,以及用于如上所述的任何形式的本发明的益生菌组合物的任何成分和量和其它特征。

[0154] 在该背景下,特别优选的是,用作药物的本发明的益生菌组合物可以是固体或液体,可以以粉末、药囊、片剂、胶囊剂的形式存在,或者可以是油制剂、乳剂、水包油乳剂(o/w

乳剂)或油包水乳剂(w/o乳剂)的形式。

[0155] 同样地,用作药物的本发明的益生菌组合物可以是可施用形式,优选地选自营养组合物、药物制剂、饮食添加物、功能性食品产品、功能性饮料产品和它们的组合,例如,乳制产品、基于奶的产品、基于乳清蛋白的饮料。

[0156] 如前所述,所述罗伊氏乳杆菌菌株是特别优选的至少一种罗伊氏乳杆菌菌株或多种罗伊氏乳杆菌菌株,其选自罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32847、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465、罗伊氏乳杆菌DSM 33632、罗伊氏乳杆菌DSM 33633、罗伊氏乳杆菌DSM 33634、罗伊氏乳杆菌DSM 33635、罗伊氏乳杆菌DSM 32231、罗伊氏乳杆菌DSM 32232、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6127和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659,优选地选自罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659,并且更优选地所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株是罗伊氏乳杆菌DSM 17938。

[0157] ●包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌细菌和GOS的组合物的治疗用途

[0158] 根据第五方面,本发明提供了包含补充了GOS的有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌组合物,其可通过本发明的方法或本文描述的其它方法得到,用于在有此需要的受试者中预防和/或治疗疾病或用于降低或抑制这样的疾病的风险。

[0159] 本文中使用的术语“治疗”和“减轻”包括预防性或防止性治疗(其防止和/或减缓靶向的病理性病况或病症的发展)和治愈性、治疗性或疾病缓解性治疗,包括治愈、减慢诊断的病理性病况或病症,减轻其症状和/或阻止其进展;和对处于感染疾病的风险中或疑似已经感染疾病的受试者以及患病或已经被诊断为患有疾病或医学病况的受试者进行治疗。该术语并不一定意味着对受试者治疗直到完全康复。术语“治疗”也表示维持和/或促进未患有疾病但可能易于发生不健康状况等的个体的健康。术语“治疗”进一步包括降低发生疾病的风险,例如以预防性治疗的形式。术语“治疗”和“减轻”还意在包括增强或以其它方式加强一种或多种主要的预防性或治疗性措施。术语“治疗”和“减轻”进一步意图包括疾病或病况的饮食管理或用于预防或防止疾病或病况的饮食管理。

[0160] 根据一个实施方案,在有此需要的受试者中的疾病可能涉及矿物质缺乏。因此,有此需要的受试者通常也是处于发生矿物质缺乏的风险中的受试者,或者是已经患有矿物质缺乏的受试者。这样的受试者可以是本文上面描述的任何受试者组。

[0161] 在一个实施方案中,这样的有此需要的受试者还可以是处于患有消化功能障碍、小生物群受损的风险中的受试者,和/或患有消化功能障碍、小生物群受损或需要促进小生物群的发育和/或生长的病况。

[0162] 在本发明的这个具体上下文中,矿物质缺乏优选地涉及钙和/或铁的缺乏。因此,单独仅一种矿物质的缺乏不一定可能导致如下所述的特定疾病,但更常见的是不同矿物质的组合缺乏,例如一种或多种选自钙和/或铁的矿物质,并且因此,还有生理学后果的重叠以及可能发生的不同疾病/病况的组合。

[0163] 如前所述,铁缺乏是一种病况,其在身体没有足够的矿物质铁时发生。铁缺乏经常

导致红细胞的异常低水平以及一种被称作缺铁性贫血的病况。所以,缺铁性贫血导致疲倦和呼吸短促。还知道铁对于维持许多身体功能而言非常重要,并且对于维持健康的细胞、皮肤、毛发和指甲是必需的。

[0164] 以下人群患缺铁性贫血的风险最高,并且因此适合接受补充了GOS的预调理的罗伊氏乳杆菌菌株组合物;月经期间的女性(特别是月经量多的女性),怀孕或哺乳或刚分娩的女性,已经经历过大手术或身体创伤和失血的人,患有胃肠道疾病诸如乳糜泻、炎性肠病(IBD)诸如溃疡性结肠炎(UC)或克罗恩氏病的人,患有消化性溃疡疾病的人,已经经历过减肥手术、尤其是胃分流手术的人,素食主义者,严格素食主义者,以及在饮食中不包括富含铁的食物的其他人,每天饮用超过16至24盎司牛奶的儿童(牛奶不仅含有极少的铁,而且还会减少铁的吸收并刺激肠道内壁,从而造成慢性失血),以及婴儿,尤其是具有低出生体重或早产的婴儿,和/或没有从母乳或配方奶粉中获取足够铁的婴儿。一般而言,儿童在生长突增期间需要额外的铁。任何这样的患者组都可以在本文中进行治疗。

[0165] 因此,在一个实施方案中,可通过本发明的方法或本文描述的其它方法获得的本发明的益生菌组合物用于治疗受试者中的铁缺乏,优选缺铁性贫血。

[0166] 此外,慢性铁缺乏是骨丢失和骨质疏松症的一个已知的新兴危险因素。

[0167] 钙是另一种必需的矿物质,其是重要的骨组分和酶的活化剂。钙还参与生物电脉冲的传导、血液凝固、肌肉收缩、炎症和激素分泌。

[0168] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了可通过本发明的方法或本文描述的其它方法得到的益生菌组合物,其用于预防和/或治疗受试者的钙缺乏,用于预防和/或治疗骨丢失,或用于治疗骨质疏松症和/或骨质减少。

[0169] 此外,并且特别考虑到钙缺乏,可以预防或治疗与肌肉问题相关的其它病况和/或疾病,例如痉挛、肌肉痉挛和疼痛、疲劳(包括失眠、嗜睡和极度疲劳)、皮肤和指甲症状、湿疹、银屑病、红肿、瘙痒、皮肤水泡、骨质疏松和骨质减少、疼痛的月经前综合征、牙齿问题、抑郁等。此外,钙缺乏(低钙血症)也是婴儿早期的严重问题,其使得所述阶段的婴儿成为特定的目标群体。这包括发生在婴儿生命的前2至3天的新生儿低钙血症,以及发生在出生后前一周或几周的晚期低钙血症。任何这样的疾病都可以得到治疗。根据一个实施方案,本发明特别提供了包含预调理的罗伊氏乳杆菌菌株的组合物,其用于在有此需要的受试者中促进认知功能、促进氧运输、促进免疫功能,和/或减少疲倦或疲劳。

[0170] 处于钙缺乏的风险中并且优选进行这样的预防和/或治疗的人群特别包括孕妇(尤其是最后三个月)、哺乳期妇女、绝经妇女、老年人、青少年和/或超重的人。处于低镁血症风险中的人群特别包括糖尿病患者、处于糖尿病风险中的患者、肥胖的受试者和/或超重的受试者等。这样的受试者和患者组中的任一个可以在本文中进行治疗。

[0171] 一个实施方案涉及包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS的益生菌组合物,其可通过本发明的方法或本文描述的其它方法得到,用于预防和/或治疗小生物群受损或生态失调。

[0172] 本发明的益生菌组合物导致更健康的小生物群,如通过乳酸和/或乙酸产生的增加所观察到的。这样的乳酸和/或乙酸产生的增加指示更健康的且代谢更活跃的肠道小生物群,特别是乳杆菌属和产生乳酸的细菌。这意味着,本发明的益生菌组合物可以用于预防和/或治疗受试者中受损的小生物群组合物或生态失调。

[0173] 本文使用的补充了GOS的预调理的罗伊氏乳杆菌菌株的另一个积极效果是改善的小生物群组成以及小生物群中乳酸和/或乙酸产生的增加。增加的乳酸和/或乙酸产生对于预防和/或治疗感染、特别是肠道感染是有效的。乳酸和乙酸是强抗病原分子。增加它们在结肠中的水平可能增强针对病原体和感染的保护,至少部分地通过降低pH来实现。因此,在一个实施方案中,根据本发明的益生菌组合物可以促进针对感染、尤其是肠道感染的防御,并促进一般免疫功能。

[0174] 此外,待治疗的受试者的肠道中罗伊氏乳杆菌菌株的存活和/或植入和/或生存力的增加可以特异性地且积极地影响本文提到的任何疾病的治疗。

[0175] 本文的医学用途还涉及在有此需要的受试者中预防和/或治疗骨丢失、促进生长、儿童骨骼或牙齿的发育、牙齿生长、促进肌肉功能、促进神经系统和/或骨骼的功能或肌肉相关的病况。

[0176] 在有此需要的受试者中骨丢失和/或骨丢失相关疾病的预防和/或治疗至少部分地通过促进骨形成和/或骨矿化和/或骨强度来体现。所述益生菌组合物还增加钙生物可达性,诸如通过增加钙溶解度和/或钙吸收。益生菌组合物的这些作用对于治疗骨丢失和/或骨丢失相关疾病具有额外的益处。

[0177] 因此,在一个实施方案中,可通过本发明的方法或本文描述的其它方法获得的包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS的益生菌组合物可以用于促进儿童中骨骼或牙齿的生长和/或发育。

[0178] 另外地或可替换地,本发明的组合物可以用于预防和/或治疗消化功能障碍。这样的病况可以包括例如减少小生物群中的(有益)细菌的量和/或功能的任何治疗或疾病,诸如免疫疗法、癌症疗法、抗生素的施用、患有腹泻、感染或炎症的受试者,但也可以并且特别涉及与小生物群受损相关的任何这样的和其它的病况或者需要促进影响婴儿和幼儿的小生物群的发育和/或生长的病况。

[0179] 通常,用于任何这样的治疗的受试者或需要这样的治疗的受试者是哺乳动物或禽类,优选地,其是人,更优选地,其选自儿童、幼儿或婴儿、老年人、孕妇、素食主义者、哺乳期妇女、伴侣动物,但还包括猫或狗等伴侣宠物。

[0180] 并且,在该背景下,之前讨论的用于制备包含补充了GOS的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌组合物的任何实施方案以及如本文中定义的包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的组合物的任何特征在细节上做必要的修正后也适用于本发明的第五方面,即本发明的益生菌组合物在任何本文定义的治疗中的医学或治疗用途。

[0181] 这具体涉及制备包含补充了GOS的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌组合物的方法的特征,以及用于包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的组合物的任何成分和量和其它特征。所述组合物可以以如上所述的任何形式提供。

[0182] 在该背景下,特别优选的是,如本文描述的用于医学或治疗用途的本发明的益生菌组合物可以是固体或液体,可以以粉末、药囊、片剂、胶囊剂的形式存在,或者可以是油制剂、乳剂、水包油乳剂(o/w乳剂)或油包水乳剂(w/o乳剂)的形式。

[0183] 同样地,如本文描述的用于医学或治疗用途的本发明的益生菌组合物可以是可施用形式,优选地选自营养组合物、药物制剂、饮食添加物、功能性食品产品、功能性饮料产品和它们的组合,例如,乳制产品、基于奶的产品、基于乳清蛋白的饮料。

[0184] 如前所述,所述罗伊氏乳杆菌菌株是特别优选的至少一种罗伊氏乳杆菌菌株或多种罗伊氏乳杆菌菌株,其选自罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32847、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465、罗伊氏乳杆菌DSM 33632、罗伊氏乳杆菌DSM 33633、罗伊氏乳杆菌DSM 33634、罗伊氏乳杆菌DSM 33635、罗伊氏乳杆菌DSM 32231、罗伊氏乳杆菌DSM 32232、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6127和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659,优选地选自罗伊氏乳杆菌DSM 17938、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 5289、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、罗伊氏乳杆菌DSM 32846、罗伊氏乳杆菌DSM 32848、罗伊氏乳杆菌DSM 32849、罗伊氏乳杆菌DSM 27131、罗伊氏乳杆菌DSM 32465和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659,并且更优选地所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株是罗伊氏乳杆菌DSM 17938。

[0185] 根据另一个特定实施方案,本发明还提供了在有此需要的受试者中治疗疾病的方法。这样的疾病和受试者优选地如本文所描述。所述治疗方法优选地包括以下步骤:给所述受试者施用本发明的益生菌组合物,即,给所述受试者施用有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS,优选地所述菌株根据用于预调理所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的本发明的方法制备或如本文所述。因此,预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株是已经在GOS存在下培养的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,优选地根据本发明的用于预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的方法。施用优选地允许预防和/或治疗在有此需要的受试者中的疾病或降低或抑制这样的疾病的风险。涵盖如上定义的任何疾病。有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS可以以本文描述的本发明的组合物的形式提供。上文关于本发明的预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的方法和本发明的组合物讨论的任何特征类似地适用。

[0186] 所述施用可以包括以混合物或单位剂量的形式同时施用包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS的益生菌组合物。可替换地,所述施用可以包括同时施用有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS,但作为试剂盒的单独部分提供。在另一个实施方案中,所述施用包括分开施用有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的GOS。

[0187] 根据另一个特定实施方案,本发明还提供了预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株用于制造或制备药物或药物组合物的用途,所述药物或药物组合物用于预防和/或治疗在有此需要的受试者中的疾病,优选地所述菌株可通过本发明的方法或本文描述的其它方法得到。这样的疾病和受试者优选地如本文所描述。所述用途优选地允许预防和/或治疗在有此需要的受试者中的疾病或降低或抑制这样的疾病的风险。涵盖如上定义的任何疾病。上文关于本发明的预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的方法和本发明的组合物讨论的任何特征类似地适用。

[0188] 在下面提供了其它方面和实施方案。

[0189] 用于制备益生菌组合物的方法,特征在于,所述方法包含以下步骤:

[0190] a)按照以下步骤预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株:

[0191] i)在生长培养基中存在低聚半乳糖(GOS)的情况下培养益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,由此预调理益生菌罗伊氏乳杆菌菌株;和

[0192] ii)任选地从所述生长培养基中收获预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株;和

[0193] b)制备包含从步骤a)i)或a)ii)获得的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌组合物,并将GOS加给所述益生菌组合物。

[0194] 根据上述内容的方法,其中在步骤a)i)中将GOS加入所述生长培养基中,所述GOS的量为在生长培养基中至少0.2重量%、优选地至少0.5重量%、甚至更优选地至少0.75重量%的GOS,和优选地至多8重量%的GOS,诸如至多7重量%GOS、至多6重量%GOS或甚至至多5重量%GOS,更优选地至多4重量%的GOS或甚至至多3%GOS,诸如在0.2重量%至8重量%或甚至0.2重量%至7重量%或0.2重量%至6重量%的范围内,更优选地在0.5重量%至8重量%或甚至0.5重量%至7重量%或0.5重量%至6重量%的范围内,甚至更优选地在0.75重量%至8重量%或甚至0.75重量%至7重量%或0.75重量%至6重量%的范围内,且最优选地在0.75重量%至7重量%的范围内,在0.75重量%至6重量%的范围内,或甚至在0.75重量%至5重量%的范围内,诸如在0.75重量%至3重量%或0.75重量%至4重量%的范围内,优选地基于生长培养基进行计算(%w/w),优选地在步骤a)i)中培养益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的开始、中期或结束时。

[0195] 根据任何上述内容的方法,其中在步骤b)中将GOS加入从步骤a)i)或a)ii)获得的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,所述GOS的量为至少1或2g/每日剂量,优选地至少3g/每日剂量,同样优选地在2至12g/每日剂量之间,或在2至10g/每日剂量之间,在2至8g/每日剂量之间,或在2至7g/每日剂量之间,更优选地在3至12g/每日剂量之间,同样更优选地在3至10g/每日剂量之间,诸如在3至8g/每日剂量之间,在3至7g/每日剂量之间,在3至6g/每日剂量之间,或约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12g/每日剂量或由此形成的任何范围。

[0196] 根据任何上述内容的方法,其中在步骤a)i)中加入所述生长培养基中和/或加入在步骤b)中制备的包含预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的组合物中的GOS具有3-8的聚合度(DP)。

[0197] 根据任何上述内容的方法,其中所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株是至少一种罗伊氏乳杆菌菌株或多种罗伊氏乳杆菌菌株,其选自在DSM 17938下保藏的罗伊氏乳杆菌菌株、在ATCC PTA 5289下保藏的罗伊氏乳杆菌菌株、在ATCC PTA 6475下保藏的罗伊氏乳杆菌菌株、在DSM 32846下保藏的罗伊氏乳杆菌菌株、在DSM 32848下保藏的罗伊氏乳杆菌菌株、在DSM 32849下保藏的罗伊氏乳杆菌菌株、在DSM 27131下保藏的罗伊氏乳杆菌菌株、在DSM 32465下保藏的罗伊氏乳杆菌菌株和在ATCC PTA 4659下保藏的罗伊氏乳杆菌菌株,优选地所述益生菌罗伊氏乳杆菌菌株是在DSM17938下保藏的罗伊氏乳杆菌菌株。

[0198] 组合物,其包含:

[0199] 有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株,其中所述预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株已经通过在生长培养基中存在低聚半乳糖(GOS)的情况下培养罗伊氏乳杆菌菌株来制备;和另外的有效量的GOS,

[0200] 其中所述组合物优选地已经根据任何上述内容的方法来制备。

[0201] 根据上述内容的组合物,其中所述组合物包含以下量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株:在10^3cfu至10^{12}cfu之间的量,通常在10^4cfu至10^{11}cfu/每日剂量之间的量,优选地在10^5cfu至10^{10}cfu/每日剂量之间的量,或10^5cfu至10^9cfu/每日剂量,同样优选地在10^6cfu至10^9cfu/每日剂量之间的量,10^6cfu至10^8cfu/每日剂量,或10^8cfu至10^{10}cfu/每日

剂量的量,更优选地约10^7cfu至10^9cfu/每日剂量,最优选地约10^8总cfu/每日剂量的量,诸如10^7至10^9cfu/每日剂量或10^8至10^9cfu/每日剂量。

[0202] 根据任何上述内容的组合物,其中所述组合物包含以下量的GOS:至少1或2g/每日剂量,优选地至少3g/每日剂量,同样优选地在2至12g/每日剂量之间,或在2至10g/每日剂量之间,在2至8g/每日剂量之间,或在2至7g/每日剂量之间,更优选地在3至12g/每日剂量之间,同样更优选地在3至10g/每日剂量之间,诸如在3至8g/每日剂量之间,在3至7g/每日剂量之间,在3至6g/每日剂量之间,或约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12g/每日剂量或由此形成的任何范围。

[0203] 根据任何上述内容的组合物,其中

[0204] 所述组合物是固体或液体,和/或以粉末、片剂、胶囊剂的形式存在,或者可以是油制剂、乳剂、水包油乳剂(o/w乳剂)或油包水乳剂(w/o乳剂)的形式;和/或

[0205] 所述组合物是可施用形式,优选地选自营养组合物、药物制剂、饮食添加物、功能性食品产品、功能性饮料产品和它们的组合,例如,乳制产品、基于奶的产品、基于乳清蛋白的饮料。

[0206] 包含补充了有效量的低聚半乳糖(GOS)的有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的组合物用于改善或增加健康受试者的消化道中的益生菌作用、优选罗伊氏乳杆菌菌株的益生菌作用的非治疗性用途,所述组合物根据任何上述内容制备或者是根据任何上述内容的组合物。

[0207] 根据上述内容的非治疗性用途,其中改善或增加益生菌作用:

[0208] -是在健康受试者的肠道中增加矿物质生物可达性,优选地增加矿物质溶解度和/或矿物质吸收,其中所述矿物质优选地选自钙和/或铁;和/或

[0209] -是促进健康受试者的肠道中的健康小生物群;和/或

[0210] -是促进罗伊氏乳杆菌菌株在结肠中的存活并从而促进与罗伊氏乳杆菌菌株相关的健康益处;和/或

[0211] -是增加肠道微生物组的代谢活性诸如增加在健康受试者的肠道中的乳酸/乙酸产生;和/或

[0212] -是由于在健康受试者的肠道中矿物质溶解度和/或矿物质吸收增加而改善骨健康、骨强度、骨形成、牙齿状况、牙齿生长、肌肉功能、认知功能、免疫功能和/或一般生长和发育(特别是对于儿童/婴儿)。

[0213] 根据任何上述内容制备的或根据任何上述内容用作药物的包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的低聚半乳糖(GOS)的组合物。

[0214] 根据任何上述内容制备的或根据任何上述内容用于在有此需要的患者中预防和/或治疗矿物质缺乏的包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的低聚半乳糖(GOS)的组合物,其中所述患者优选地处于发生矿物质缺乏的风险中或者是患有矿物质缺乏的受试者,其中所述矿物质任选地选自钙和/或铁。

[0215] 用于根据上述内容的用途的组合物,其中所述组合物用于预防和/或治疗:

[0216] 在有此需要的患者中的铁缺乏,优选缺铁性贫血,和/或促进认知功能,和/或促进氧运输,和/或促进免疫功能,和/或减少疲倦或疲劳;和/或在有此需要的患者中的钙缺乏。

[0217] 用于根据任何上述内容的用途的组合物,其中所述组合物用于预防和/或治疗消

化功能障碍、小生物群受损和/或消化功能障碍。

[0218] 根据任何上述内容制备的或根据任何上述内容用于预防和/或治疗小生物群受损或生态失调的、包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的低聚半乳糖(GOS)的组合物。

[0219] 根据任何上述内容制备的或根据任何上述内容用于在有此需要的患者中预防和/或治疗骨丢失,和/或促进儿童骨骼或牙齿的生长和发育,和/或促进肌肉功能和/或促进神经系统的功能和/或骨骼或肌肉相关的病况的、包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的低聚半乳糖(GOS)的组合物。

[0220] 根据任何上述内容制备的或根据任何上述内容用于预防和/或治疗感染、优选肠道感染和/或促进免疫功能(任选地通过患者的小生物群中乳酸/乙酸产生的增加)的、包含有效量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株和有效量的低聚半乳糖(GOS)的组合物。

[0221] 应当理解,本文所公开的详细描述的各个方面和实施方案是制造和使用本发明的具体方式的示例,并且在与权利要求和详细描述一起考虑时不会限制本发明的范围。还应当理解,来自本发明的方面和实施方案的特征可以与来自本发明的相同或不同方面和实施方案的另外特征组合。

[0222] 如在本详细描述和所附权利要求中所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指明。

[0223] 所描述的所有范围意图包括被包含在所述范围内的所有数字、整数或分数。

[0224] 实施例

[0225] 实施例1-用GOS预调理罗伊氏乳杆菌的方法

[0226] 使用在内部生产的罗伊氏乳杆菌冷冻起始培养物(罗伊氏乳杆菌DSM 17938)接种含有4%牛奶衍生的寡糖(BMOS)作为碳源和4%果糖作为电子受体(以干物质计)的发酵培养基。使用罗伊氏乳杆菌的过夜培养物接种含有6%BMOS作为碳源和6%果糖作为电子受体(以干物质计)的新鲜发酵培养基。在非pH控制下和在37℃进行发酵。发酵约10小时以后,通过离心收获预调理的罗伊氏乳杆菌细胞,然后与保护剂混合并喷雾干燥。

[0227] 用作GOS来源的BMOS碳水化合物混合物由48%GOS、30%乳糖、8%葡萄糖、3.9%半乳糖和>0.2%3'-SL+6'-SL(g/100g干物质)组成。

[0228] 通过倾注平板法确定罗伊氏乳杆菌细胞计数。简而言之,在胰蛋白胨盐(Oxoid,LP0042)溶液中对喷雾干燥的样品进行系列十进制稀释。随后,将100μL适当的稀释液转移至培养皿中并与MRS琼脂(AES Chemunex,Bruz,法国)混合。一式两份地进行分析。然后将平板在好氧条件下在37℃温育48小时。通过在适当稀释的平板上计数的菌落数目,通过确定其算术平均值来计算菌落形成单位/克(cfu/g)。

[0229] 此外,根据任选的步骤,将高度纯化的GOS(>93%)加入收获的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌中。

[0230] 实施例2-包含预调理的罗伊氏乳杆菌和GOS的药囊的制备

[0231] 所述组合物由以下组分制成:低压冻干的预调理的罗伊氏乳杆菌DSM 17938(如下所述培养和低压冻干)、10^8CFU/药囊和GOS15(VIVINAL®,FrieslandCampina Domo,荷兰)2000mg/药囊。在LAF工作台(Holten Laminair Model S-2010 1.2,来自丹麦Heto-Holten A/S)中,在环境温度下将所述组合物与干燥剂(10cm×12cm,使用包装材料PET12/

PE/ALU12/PE/PE+来自Alcan的干燥剂/PE)一起填充到本领域已知的铝箔袋中。使用来自德国Denver Instrument GmbH的天平XP-600,向每个袋子中添加2g含有罗伊氏乳杆菌和GOS的粉末。然后使用来自德国Kettenbaum Folienschweisstechnik GmbH&Co.KG的F460/2型薄膜密封装置对填充的铝箔袋进行热密封。

[0232] 在生物反应器中的培养

[0233] 用来自在-70℃储存的冷冻储存物的100μl罗伊氏乳杆菌DSM 17938接种10ml MRS培养基(Oxoid)。将试管在37℃温育6小时,并然后使用500μl接种含有50ml MRS的试管。将试管在37℃温育16-20小时,并然后将整个体积用作生物反应器的接种物。

[0234] 在生物反应器中的培养条件

[0235] 工作容积:1L

[0236] 培养基:含有3%BMOS+3%果糖的工业MRS(iMRS)

[0237] 通气:无通气

[0238] 温度:37℃

[0239] 搅拌:250rpm

[0240] pH:6.00±0.1

[0241] 培养时间:6-10h

[0242] iMRS成分

[0243]

组分	量(g)
酵母提取物	10
酵母蛋白胨	10
柠檬酸钠	2
乙酸钠	5
K_2HPO_4	2
$MgSO_4$七水合物	0.1
硫酸锰七水合物	0.05
吐温 80	1
L-半胱氨酸	0.1
净化水(800 ml)	

[0244]

[0245] 用NaOH将pH设置为6.5,高压灭菌(121℃15分钟),并然后添加无菌糖溶液(终体积1000ml)。培养后,通过离心将细菌沉淀并悬浮于50ml 10%蔗糖中。

[0246] 低压冻干法

[0247] 将浓缩的细胞悬浮液分装到冷冻干燥玻璃管形瓶中(1ml/管形瓶),并将管形瓶在超冷冻箱中在-50℃冷冻2小时,然后转移到Labconco FreeZone加塞托盘冷冻干燥机中。冷冻干燥方案设置如下:冷冻步骤:在-40℃保持4小时;主干燥:在0.102毫巴在-35℃保持15分钟,在0.102毫巴在-10℃保持12.5小时;次干燥:在0.01毫巴在-10℃保持30分钟,在0.01毫巴在25℃保持12小时。在该过程结束时,将管形瓶在真空下盖上盖子并在-20℃储存直至

进一步使用。

[0248] 实施例3-用于制备包含补充了另外GOS的预调理的罗伊氏乳杆菌的益生菌组合物的方法

[0249] 通过向重构成长奶组合物中添加5×10^6cfu/每日剂量的量的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌和0.5至12g/每日剂量的量的GOS,制备了一种基于牛奶的幼儿饮料(也被称作成长奶),其含有适合该年龄段的矿物质。

[0250] 实施例4-包含补充了另外GOS的预调理的罗伊氏乳杆菌的组合物增加在结肠中的存活并增加在结肠中的钙和铁溶解度

[0251] *SHIME*®-模型

[0252] 在本实验中,使用了人微生物生态系统的连续模拟(SHIME®)的简化模拟。该SHIME®模型已经在科学和工业项目中广泛使用了20多年,并已经用体内参数进行了验证(参见例如Van den Abbeele等人,Arabinoxylo-Oligosaccharides and Inulin Impact Inter-Individual Variation on Microbial Metabolism and Composition,Which Immunomodulates Human cells,J.Agric.Food chem.2018,66(5):1121-1130)。

[0253] 对于当前组的实验,使用模拟上胃肠道(上GIT,胃和小肠)和结肠条件的两阶段批式系统作为简化的SHIME® 系统(图1)。在这些研究中使用了基于牛奶的幼儿饮料(也被称作成长奶),其含有适合该年龄段的矿物质。

[0254] 为了模拟在幼儿小肠中发生的吸收过程,使用截止值为14kDa的纤维素膜进行透析方案。通过将小肠悬浮液引入透析膜内,逐渐从上胃肠基质中除去消化的氨基酸、糖、微量营养物和矿物质等分子。

[0255] 此外,在胃温育过程中逐渐降低pH,在1小时温育期间从5.5降低至3.0,以模拟幼儿的胃pH。此外,在小肠(十二指肠)温育的前30分钟期间,将pH固定为4.5,以使可用矿物质得到最佳吸收。接下来的145分钟的小肠阶段(空肠+回肠),引入7的pH。暴露于胃和小肠条件后的奶基质被转移到含有幼儿粪便样品的结肠隔室中。

[0256] 从12个月龄婴儿供体收集新鲜的粪便材料。制备粪便悬浮液并与保护剂混合。在短期结肠温育开始时,将试验成分(罗伊氏乳杆菌菌株和嗜热链球菌菌株)加入含有在结肠中存在的基础营养物(例如,宿主衍生的聚糖诸如粘蛋白)的无糖营养培养基中。

[0257] 以1×10^9CFU/反应器接种罗伊氏乳杆菌菌株和嗜热链球菌菌株。

[0258] 进行以下温育:

[0259] -没有益生菌的对照温育(单独的上GIT消化奶)

[0260] -上GIT消化奶+罗伊氏乳杆菌菌株DSM 17938

[0261] -上GIT消化奶+嗜热链球菌NCC2496(雀巢公司培养物保藏中心(Vevey,瑞士))

[0262] -上GIT消化奶+GOS+罗伊氏乳杆菌菌株DSM 17938

[0263] -上GIT消化奶+GOS+嗜热链球菌NCC2496

[0264] 以4g GOS/L的消化奶的当量使用高度纯化的GOS(>93%纯度)来模拟到达大肠的GOS结构。

[0265] 使用在内部生产的嗜热链球菌冷冻起始培养物接种含有3%右旋糖作为碳源、2.5%酵母提取物作为氮源和0.1%吐温®80的发酵培养基。使用在37℃过夜培养的嗜热链

球菌接种含有4％右旋糖作为碳源、2.5％酵母提取物作为氮源和0.1％吐温®80的新鲜发酵培养基。在40℃并通过添加30％NaOH将pH控制维持在5.8下进行发酵。

[0266] 在单独的实验中,将试验成分(罗伊氏乳杆菌、预调理的罗伊氏乳杆菌)加入含有粪便样品的结肠培养基中。在罗伊氏乳杆菌的发酵培养基中用右旋糖(8％)替换BMOS(参考＝没有预调理)。然后应用相同的发酵条件(发酵时间10小时,无pH控制,37℃)。

[0267] 以1×10^{9}CFU/反应器接种罗伊氏乳杆菌菌株和预调理的罗伊氏乳杆菌菌株。通过在MRS培养基上铺板来定量罗伊氏乳杆菌,而在补充了乳糖的M17培养基上铺板嗜热链球菌。在细胞计数前,将两种菌株在37℃温育48小时。然后计算罗伊氏乳杆菌和嗜热链球菌粉末的量,以达到1×10^{9}CFU/结肠反应器。

[0268] 进行以下温育:

[0269] -没有益生菌的对照温育(单独的消化奶)

[0270] -上GIT消化奶+GOS

[0271] -上GIT消化奶+罗伊氏乳杆菌菌株DSM 17938

[0272] -上GIT消化奶+预调理的罗伊氏乳杆菌DSM 17938

[0273] -上GIT消化奶+GOS+罗伊氏乳杆菌菌株DSM 17938

[0274] -上GIT消化奶+GOS+预调理的罗伊氏乳杆菌DSM 17938

[0275] 在37℃和摇动(90rpm)条件下进行结肠温育48小时。一式三份地进行所有实验,以考虑生物变异。

[0276] 矿物质(钙和铁)的分析

[0277] 钙和铁的分析由比利时根特大学(Ghent University)的专业实验室进行。通过电感耦合等离子体-光学发射光谱测定法(ICP-OES)来测量样品。0小时、6小时、24小时和48小时以后在结肠隔室中取样用于矿物质分析。在48小时时间点之前进行结肠透析,得出生物可达的矿物质级分和不溶性矿物质级分的值。在分析前对在0小时、6小时和24小时采集的样品进行离心和过滤。在离心前测量总钙。在离心和过滤后的级分(不包括沉淀)中测量可溶性钙。

[0278] 结果显示在图2和3中。

[0279] 如在图2中所见,单独的GOS对钙溶解度影响很小或没有影响。与GOS组合的罗伊氏乳杆菌提高了在6小时和24小时时钙的溶解度。在GOS存在的情况下,预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株进一步提高了在6小时和24小时时在结肠中的钙溶解度。这提示,与GOS组合的预调理的罗伊氏乳杆菌菌株可以用于在有此需要的受试者中促进钙吸收。

[0280] 如在图3中所见,与GOS组合的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株提高了在结肠中的铁溶解度(生物可达性),表明GOS和预调理的罗伊氏乳杆菌的组合可以促进在有此需要的受试者中的铁吸收。

[0281] 微生物群落组合物

[0282] 进行定量聚合酶链式反应(qPCR)以选择性地计数乳杆菌和链球菌。在结肠温育的0小时和48小时以后进行qPCR。

[0283] 结果显示在图4A和4B中。

[0284] 图4A表明,GOS的存在增强了罗伊氏乳杆菌在结肠中的存活。相反,GOS在结肠中的存在会损害嗜热链球菌的存活。这意味着,即使两种菌株都能够在发酵培养基中存在GOS的

情况下和在受控条件下生长,但当它们处于高度竞争性环境中(如结肠中)时,它们的表现有所不同。在肠道中、尤其是在结肠中存在多种细菌。细菌在结肠环境中争夺食物以求生存。罗伊氏乳杆菌能够以有效的方式消耗GOS,从而获得良好的存活。尽管嗜热链球菌具有消耗GOS的能力,但该菌株似乎在竞争性细菌环境中更加挣扎。

[0285] 图4B显示了在GOS存在下预调理的罗伊氏乳杆菌在结肠中的存活。罗伊氏乳杆菌(无预调理)在GOS存在下在结肠中存活良好。预调理会提高罗伊氏乳杆菌的存活,如在48小时在结肠中的更高细胞计数所示。

[0286] 微生物代谢活性

[0287] 为了评估根据本发明的方法制备的预调理的益生菌罗伊氏乳杆菌菌株的微生物活性,在开始温育以后0小时、6小时和48小时期间监测pH、短链脂肪酸和乳酸盐值:

[0288] -pH:在实验过程中的酸化程度是细菌代谢(发酵)的强度的量度。在开始温育后0小时、6小时和48小时测定温育的pH,从而粗略地指示发酵的速度。

[0289] -短链脂肪酸(SCFA)是对微生物碳水化合物代谢(在这种情况下为乙酸盐)的评估,可以与正常GI小生物群的典型发酵模式进行对比。在温育0小时、6小时和48小时以后分析用于SCFA分析的样品。

[0290] -乳酸盐:肠道包含产生乳酸盐的细菌和消耗乳酸盐的细菌。乳酸盐由乳酸细菌产生,并且降低环境的pH,因而也用作抗微生物剂。它还可以被其它微生物快速转化为乙酸盐、丁酸盐和丙酸盐。在温育0小时、6小时和48小时以后分析用于乳酸盐分析的样品。

[0291] 结果显示在图5和6中。

[0292] 图5显示了乳酸产生(48小时和6小时的水平之间的差异)。单独的GOS诱导结肠中的强乳酸产生。与GOS组合的罗伊氏乳杆菌的添加进一步增强结肠中乳酸的产生。当在结肠中与GOS组合添加预调理的罗伊氏乳杆菌时,测得最高的乳酸产生,表明小生物群的代谢活性的总体增加。在添加GOS和预调理的罗伊氏乳杆菌48小时以后,产生乳酸的细菌在结肠中更加活跃。

[0293] 图6显示了在结肠中的pH降低(48小时和6小时之间的差异)(右图)和乙酸产生(48小时和6小时之间的差异)(左图)。与GOS组合的预调理的罗伊氏乳杆菌诱导结肠内更强烈的pH降低。在预调理的罗伊氏乳杆菌和GOS存在下,也产生更高水平的乙酸。pH是酸产生的标志。在GOS存在下,预调理的罗伊氏乳杆菌强烈诱导乳酸和乙酸。

[0294] 实施例5-包含补充了另外GOS的预调理的罗伊氏乳杆菌的组合物显示对骨参数的积极影响

[0295] 使用鼠前成骨细胞细胞模型MC3T3-E1(成骨细胞是骨形成细胞)进行体外骨实验。将骨细胞暴露于不同的条件下(见下文)。在结肠温育48小时以后通过离心和过滤准备这些条件,然后以1%加入在DMEM培养基中的骨细胞培养物中。

[0296] 条件:

[0297] 上GI消化奶(对照)

[0298] 上GI消化奶+GOS(GOS)

[0299] 上GI消化奶+GOS+罗伊氏乳杆菌菌株(GOS+罗伊氏乳杆菌)

[0300] 上GI消化奶+GOS+预调理的罗伊氏乳杆菌菌株(GOS+预调理的罗伊氏乳杆菌)

[0301] 读出:

[0302] 碱性磷酸酶(ALP)活性(酶活性)。ALP是成骨细胞在成熟时表达的一种酶,并且是成骨细胞(骨形成细胞)的分化的指标。

[0303] 茜素红吸收是成骨细胞矿化的指标。

[0304] 划痕测定作为MC3T3细胞迁移的指标。

[0305] 如在图7中所见,与仅GOS或GOS+罗伊氏乳杆菌菌株相比,已经观察到GOS+预调理的罗伊氏乳杆菌菌株对成骨细胞增殖的积极作用的优越性。对成骨细胞分化的影响与对骨形成速率和因而对生长速度的积极影响相关。

[0306] 如在图8中所示,对于GOS+预调理的罗伊氏乳杆菌菌株,矿化(晚期成骨细胞活性)更高(相对于GOS+罗伊氏乳杆菌菌株)。较高的矿化可能导致增加的骨强度。

[0307] 如在图9中所示,与所有其它条件相比,GOS+预调理的罗伊氏乳杆菌显著降低了细胞迁移。这与当暴露于GOS+预调理的罗伊氏乳杆菌时增加的细胞分化一致,如在图7中所示。

[0308] 使用鼠前成骨细胞细胞模型MC3T3-E1(成骨细胞是骨形成细胞)进行体外实验。将细胞暴露于不同的条件:

[0309] 在结肠温育48小时以后,收集补充了GOS的上GIT消化奶,有和没有罗伊氏乳杆菌样品(有和没有预调理),并测量短链脂肪酸(SCFA)(例如,丁酸盐、丙酸盐和乙酸盐)的水平。

[0310] 对于在DMEM中的纯SCFA的共混物,将细胞以1/1000暴露于表中的相应条件。条件列于下表中。

[0311]

条件	乙酸盐(mM)	丙酸盐(mM)	丁酸盐(mM)
SCFA (对照)	22.98	12.25	3.63
SCFA (GOS)	46.05	14.20	3.85
SCFA (GOS +正常罗伊氏乳杆菌)	51.89	13.42	3.78
SCFA (GOS +预调理的罗伊氏乳杆菌)	56.60	17.41	4.56

[0312] 基因表达读出:第4天的活化转录因子4(Atf4)和骨钙素(Ocn)。Atf4是成骨细胞分化的早期标志物,Ocn是成骨细胞矿化的标志物。

[0313] 如在图10中所示,与对照条件相比,来自GOS+罗伊氏乳杆菌或GOS+预调理的罗伊氏乳杆菌条件的两种SCFA共混物显著增加了Atf4基因表达。这指示早期成骨细胞分化的刺激。

[0314] 如在图11中所示,与对照条件相比,只有来自GOS+预调理的罗伊氏乳杆菌条件的SCFA共混物显著增加了Ocn基因表达。这指示与GOS+罗伊氏乳杆菌(未经预调理)相比,预调理的罗伊氏乳杆菌在刺激成骨细胞矿化方面的优越性。

[0315] 上述实施方案应理解为本发明的几个示例性实施例。本领域技术人员将理解,可以对所述实施方案做出多种修改、组合和变化,而不脱离本发明的范围。具体地,在技术上

可行时,在不同实施方案中的不同部分溶液可以在其它配置中组合。但是,本发明的范围由所附权利要求限定。

关于微生物保藏的说明

申请人或代理人档案号	国际申请号

关于微生物保藏的说明

（专利合作条约实施细则 13 之 2）

微生物保藏的说明	
A.对说明书第 10 页，第 4 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称ATCC-美国典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 美国	
保藏日期 2003-06-25	保藏号 PTA-5289
C.补充说明（必要时）	更多信息在附加页中 ☐
无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
所有指定国	
E.补充说明（必要时）	
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无	

[0316]

由受理局填写	由国际局填写
☐ 本页已经和国际申请一起收到	☐ 国际局收到本页日期
授权官员	授权官员

附页

微生物保藏的说明(2)	
A.对说明书第 10 页，第 7 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称ATCC-美国典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 美国	
保藏日期 2004-12-21	保藏号 PTA-6475
C.补充说明（必要时）	更多信息在附加页中 ☐
无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
所有指定国	
E.补充说明（必要时）	
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无	

[0317]

微生物保藏的说明(3)	
A.对说明书第 9 页，第 15 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国	
保藏日期 2006-01-30	保藏号 DSM 17938

附页

C.补充说明（必要时） 更多信息在附加页中 ☐
无
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）
所有指定国
E.补充说明（必要时）
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

[0318]

微生物保藏的说明(4)	
A.对说明书第 9 页，第 18 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐	
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国	
保藏日期 2013-04-18	保藏号 DSM 27131
C.补充说明（必要时） 更多信息在附加页中 ☐	
无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
所有指定国	
E.补充说明（必要时）	

附页

下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

微生物保藏的说明(5)	
A.对说明书第 9 页，第 25 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国	
保藏日期 2017-03-21	保藏号 DSM 32465
C.补充说明（必要时）	更多信息在附加页中 ☐
无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
所有指定国	
E.补充说明（必要时）	
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无	

[0319]

微生物保藏的说明(6)	
A.对说明书第 9 页，第 21 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 ☐

附页

保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国
保藏日期 2018-07-04 | 保藏号 DSM 32846
C.补充说明（必要时） 更多信息在附加页中 ☐
无
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）
所有指定国
E.补充说明（必要时）
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

[0320]

微生物保藏的说明(7)
A.对说明书第 9 页，第 21 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国
保藏日期 2018-07-04 | 保藏号 DSM 32848
C.补充说明（必要时） 更多信息在附加页中 ☐

附页

无
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）
所有指定国
E.补充说明（必要时）
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

[0321]

微生物保藏的说明(8)	
A.对说明书第 9 页，第 21 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国	
保藏日期 2018-07-04	保藏号 DSM 32849
C.补充说明（必要时）	更多信息在附加页中 ☐
无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
所有指定国	
E.补充说明（必要时）	

附页

下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

微生物保藏的说明(9)
A.对说明书第 10 页，第 10 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称ATCC-美国典型培养物保藏中心
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 美国
保藏日期 2002-09-11 | 保藏号 PTA-4659
C.补充说明（必要时） 更多信息在附加页中 ☐
[0322] 无
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）
所有指定国
E.补充说明（必要时）
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

微生物保藏的说明(10)
A.对说明书第 9 页，第 28 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐

附页

保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国
保藏日期 2020-09-09 | 保藏号 DSM 33632
C.补充说明（必要时） 更多信息在附加页中 ☐
无
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）
所有指定国
E.补充说明（必要时）
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

[0323]

微生物保藏的说明(11)
A.对说明书第 9 页，第 28 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国
保藏日期 2020-09-09 | 保藏号 DSM 33633
C.补充说明（必要时） 更多信息在附加页中 ☐

附页

无
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）
所有指定国
E.补充说明（必要时）
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

[0324]

微生物保藏的说明(12)	
A.对说明书第 9 页，第 28 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国	
保藏日期 2020-09-09	保藏号 DSM 33634
C.补充说明（必要时）	更多信息在附加页中 ☐
无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
所有指定国	
E.补充说明（必要时）	

附页

下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

微生物保藏的说明(13)	
A.对说明书第 9 页，第 28 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国	
保藏日期 2020-09-09	保藏号 DSM 33635
C.补充说明（必要时）	更多信息在附加页中 ☐
无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
所有指定国	
E.补充说明（必要时）	
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无	

[0325]

微生物保藏的说明(14)	
A.对说明书第 9 页，第 21 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 ☐

附页

保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国
保藏日期 2018-07-04 | 保藏号 DSM 32847
C.补充说明（必要时） 更多信息在附加页中 ☐
无
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）
所有指定国
E.补充说明（必要时）
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

[0326]

微生物保藏的说明(15)
A.对说明书第 10 页，第 13 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称ATCC-美国典型培养物保藏中心
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 美国
保藏日期 2004-07-22 | 保藏号 PTA-6127
C.补充说明（必要时） 更多信息在附加页中 ☐

附页

无
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）
所有指定国
E.补充说明（必要时）
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

[0327]

微生物保藏的说明(16)	
A.对说明书第 9 页，第 32 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国	
保藏日期 2015-12-11	保藏号 DSM 32231
C.补充说明（必要时）	更多信息在附加页中 ☐
无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
所有指定国	
E.补充说明（必要时）	

附页

下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

[0328]

微生物保藏的说明(17)	
A.对说明书第 9 页，第 32 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 ☐
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 （包括邮政编码和国名） 德国	
保藏日期 2015-12-11	保藏号 DSM 32232
C.补充说明（必要时）	更多信息在附加页中 ☐
无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
所有指定国	
E.补充说明（必要时）	
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无	

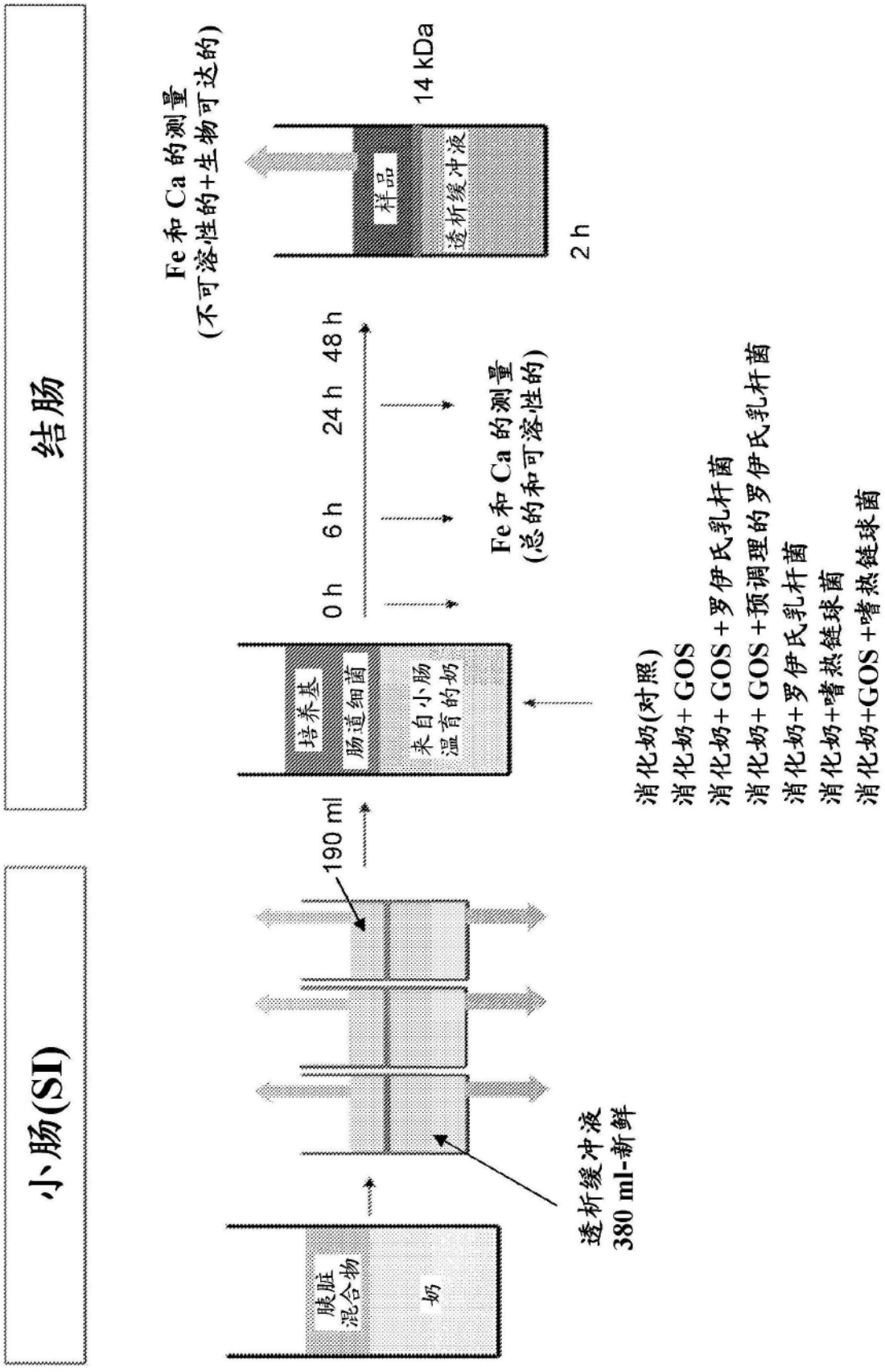

小肠(SI)
结肠
胰脏混合物
奶
190 ml
透析缓冲液
380 ml-新鲜
培养基
肠道细菌
来自小肠温育的奶
0 h
6 h
24 h
48 h
Fe 和 Ca 的测量
(总的和可溶性的)
Fe 和 Ca 的测量
(不可溶性的+生物可达的)
样品
透析缓冲液
14 kDa
2 h
消化奶(对照)
消化奶+ GOS
消化奶+ GOS +罗伊氏乳杆菌
消化奶+ GOS +预调理的罗伊氏乳杆菌
消化奶+罗伊氏乳杆菌
消化奶+嗜热链球菌
消化奶+GOS +嗜热链球菌

图1

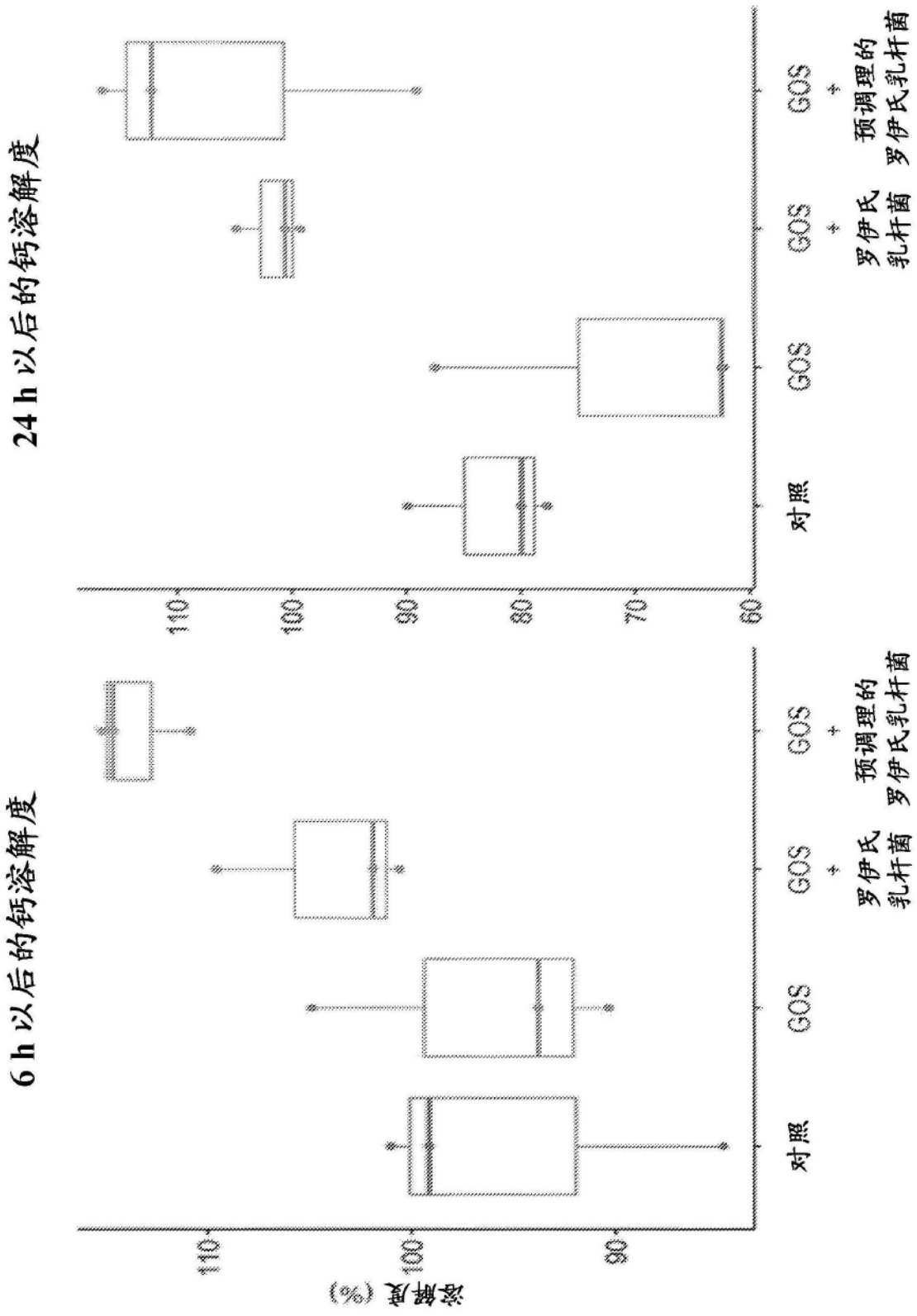

6 h 以后的钙溶解度
24 h 以后的钙溶解度
溶解度 (%)
110
100
90
80
70
60
对照
GOS
GOS + 罗伊氏乳杆菌
GOS + 预调理的罗伊氏乳杆菌

图2

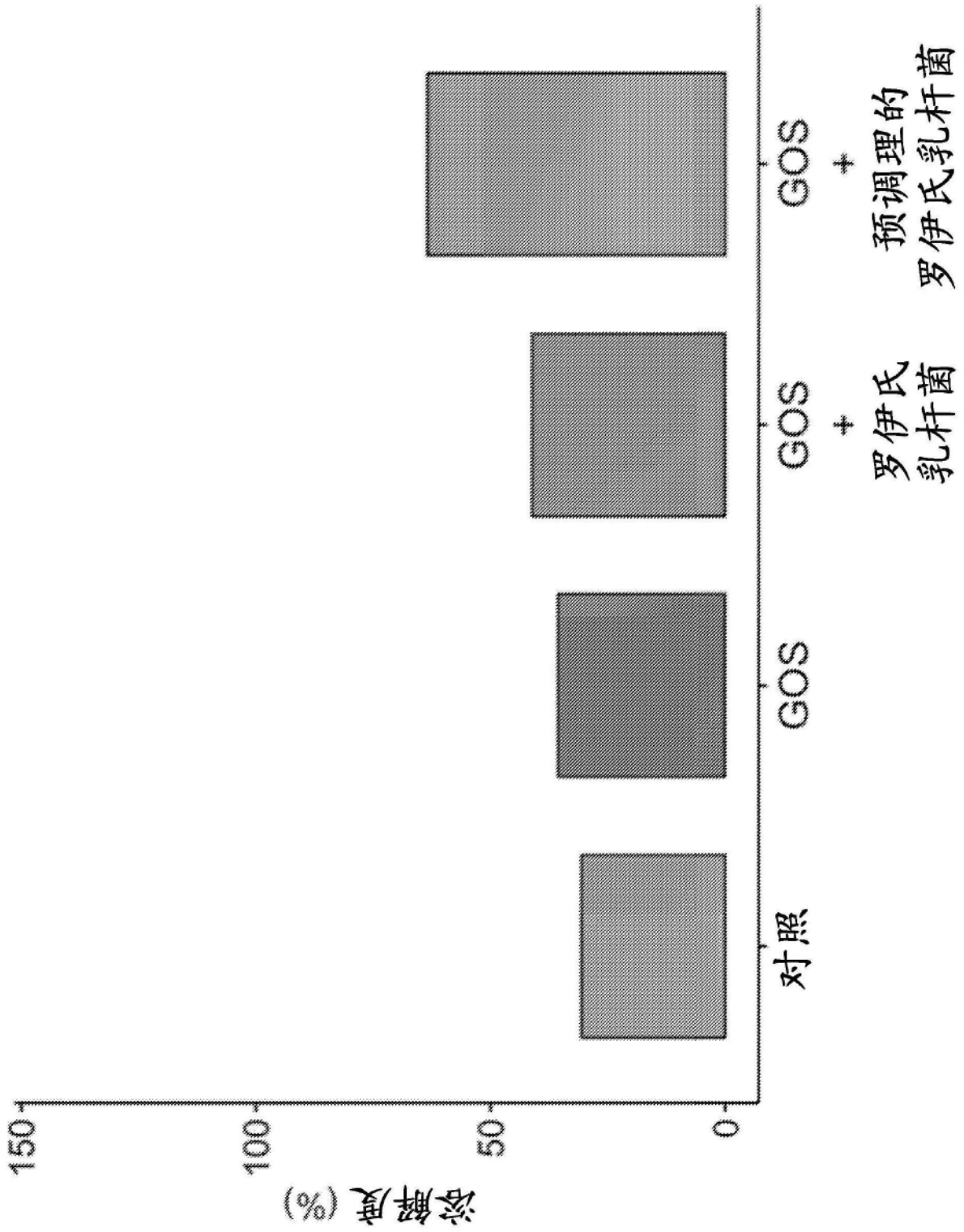


图3

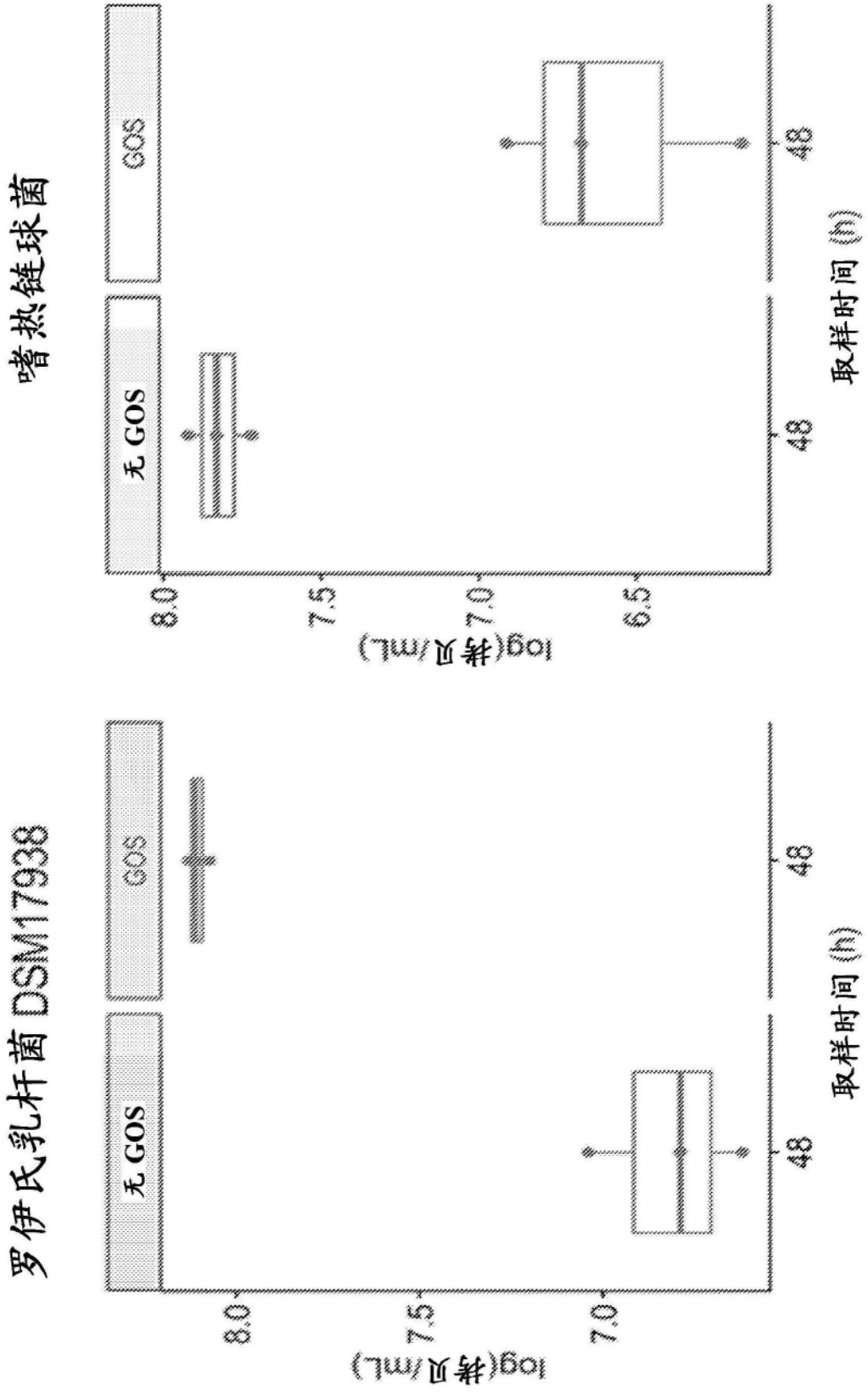

嗜热链球菌
无 GOS
GOS
log(拷贝/mL)
8.0
7.5
7.0
6.5
48
取样时间 (h)
罗伊氏乳杆菌 DSM17938
无 GOS
GOS
log(拷贝/mL)
8.0
7.5
7.0
48
取样时间 (h)

图4A

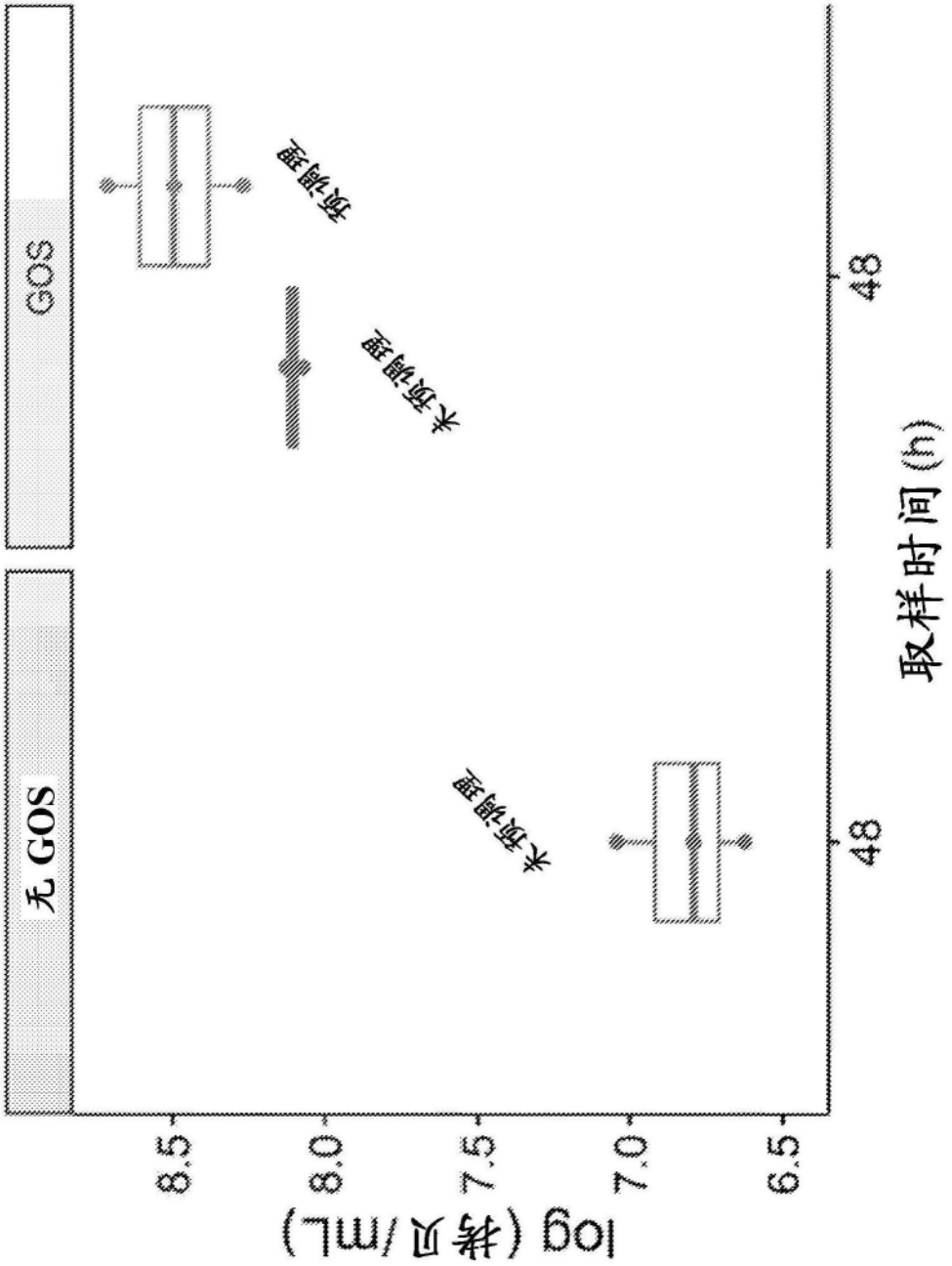


图4B

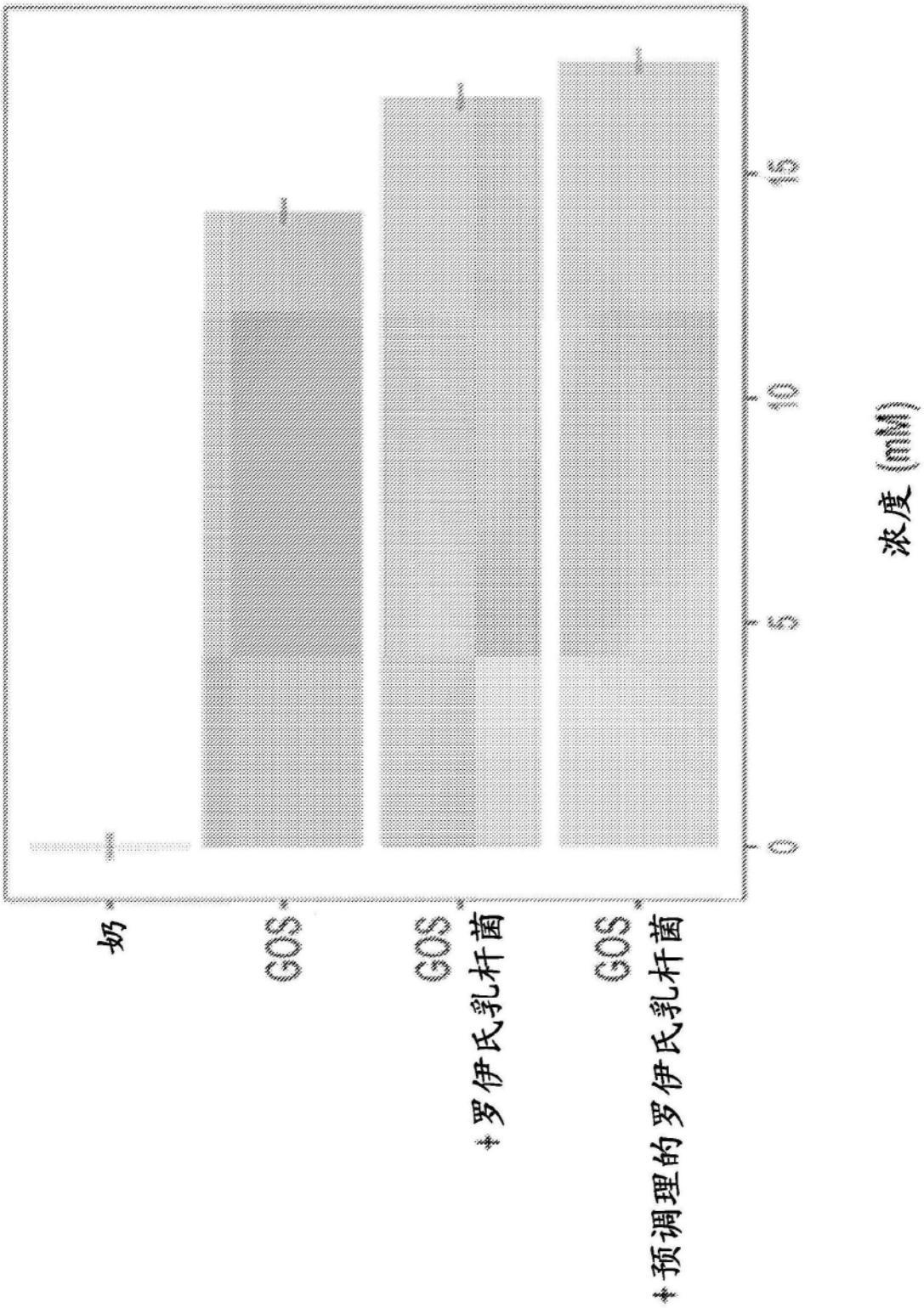


图5

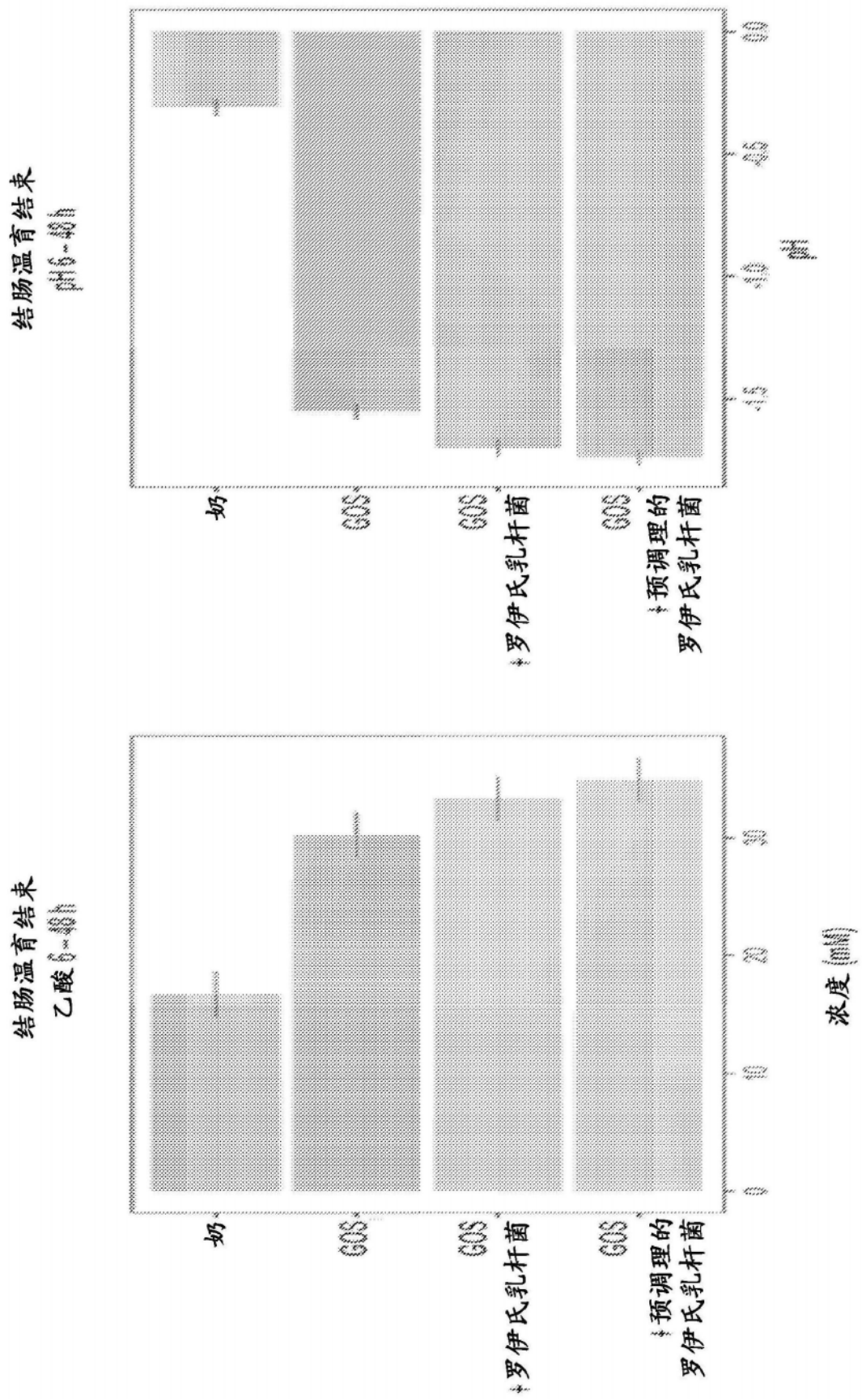

结肠温育结束
乙酸
浓度 (mM)
奶
GOS
罗伊氏乳杆菌
预调理的
罗伊氏乳杆菌
结肠温育结束
丙酸
浓度 (mM)
奶
GOS
罗伊氏乳杆菌
预调理的
罗伊氏乳杆菌

图6

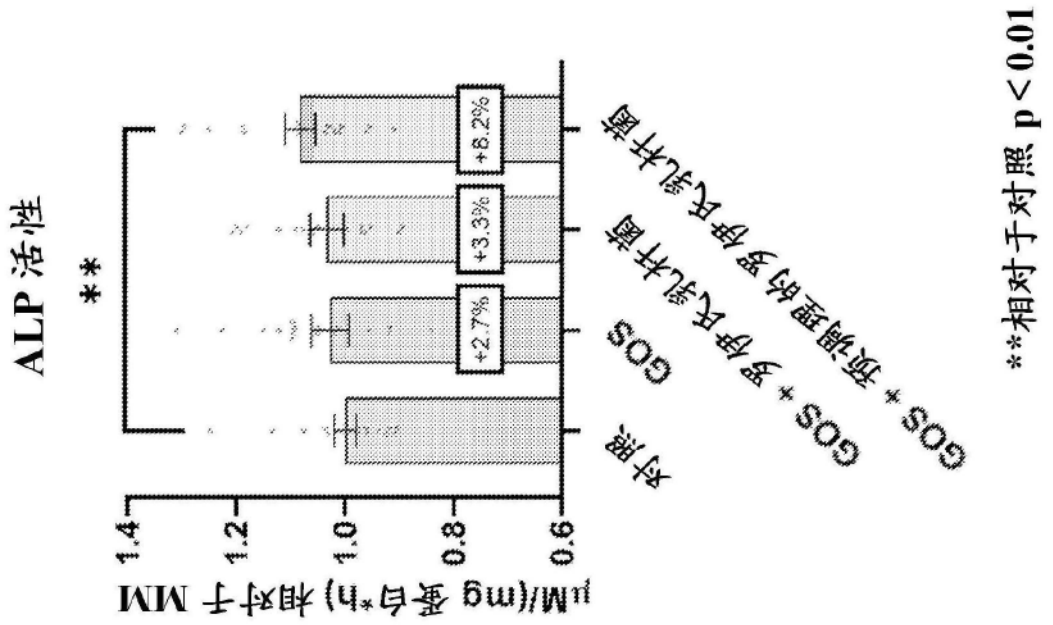

ALP 活性
**
μM/(mg 蛋白*h) 相对于 MM
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
+8.2%
+3.3%
+2.7%
对照
GOS
GOS + 发酵乳杆菌
GOS + 预消耗的发酵乳杆菌
**相对于对照 p < 0.01

图7

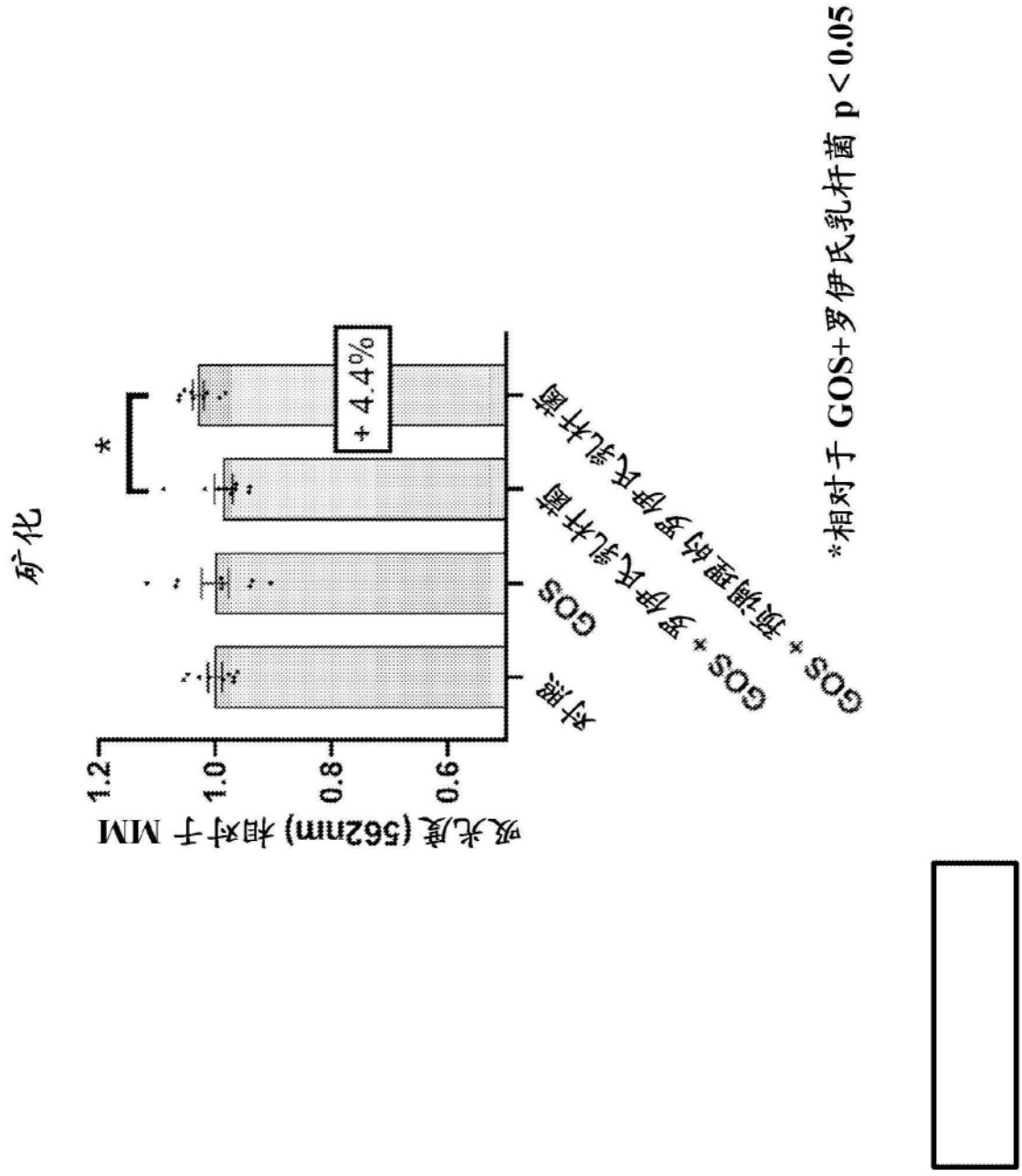

矿化
*
+ 4.4%
1.2
1.0
0.8
0.6
吸光度(562nm)相对于 MM
对照
GOS
GOS + 罗伊氏乳杆菌
GOS + 预调理的罗伊氏乳杆菌
*相对于 GOS+罗伊氏乳杆菌 p < 0.05

图8

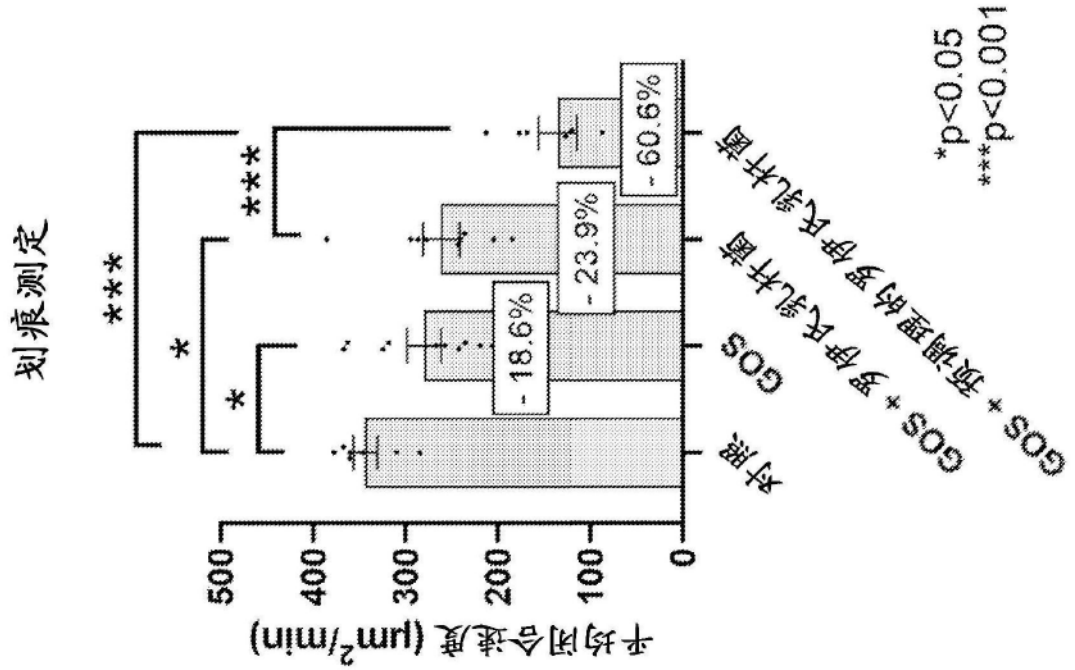

划痕测定
平均闭合速度 (μm²/min)
500
400
300
200
100
0
****
*
***
- 18.6%
- 23.9%
- 60.6%
对照
GOS
GOS + 罗伊乳杆菌
GOS + 预调理的罗伊乳杆菌
*p<0.05
***p<0.001

图9

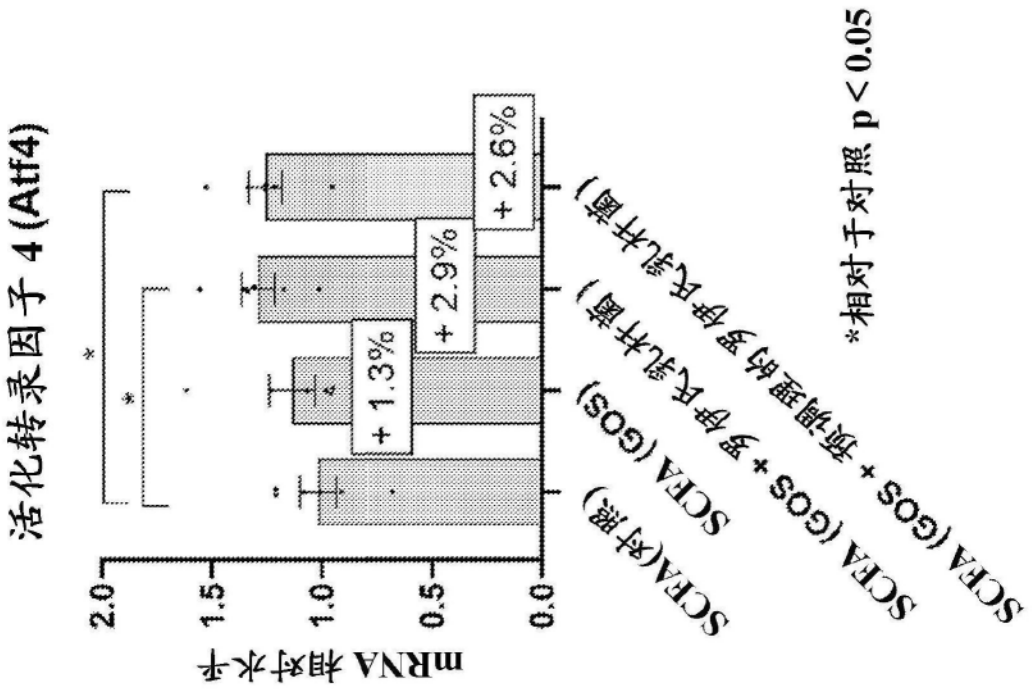

活化转录因子 4 (Atf4)
mRNA 相对水平
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
+ 1.3%
+ 2.9%
+ 2.6%
SCFA(对照)
SCFA (GOS)
SCFA (GOS + 罗伊乳杆菌)
SCFA (GOS + 预调理的罗伊乳杆菌)
*相对于对照 p < 0.05

图10

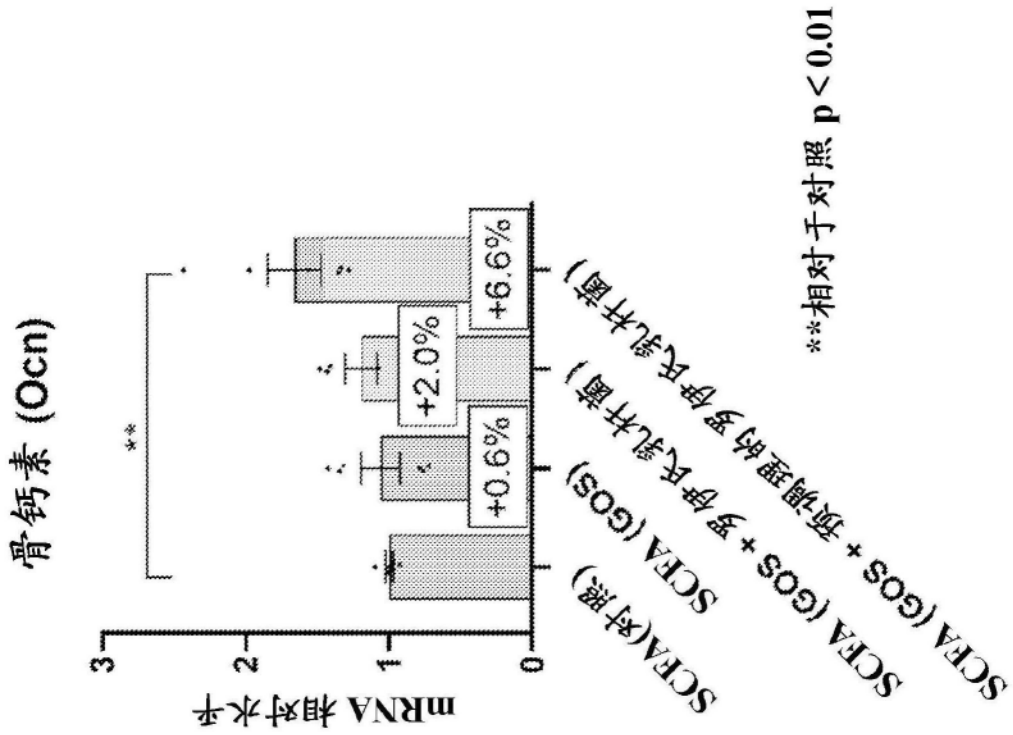

骨钙素 (Ocn)
mRNA 相对水平
3
2
1
0
**
+0.6%
+2.0%
+6.6%
SCFA(对照)
SCFA (GOS)
SCFA (GOS + 罗伊乳杆菌)
SCFA (GOS + 预消耗的罗伊乳杆菌)
**相对于对照 p < 0.01

图11