

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A23K 1/14

[12] 发明专利申请公开说明书

A23K 1/18 A23K 1/16

A61P 1/12 A61K 35/78

[21] 申请号 00805749.4

[43] 公开日 2002 年 4 月 17 日

[11] 公开号 CN 1345184A

[22] 申请日 2000.3.10 [21] 申请号 00805749.4

[30] 优先权

[32] 1999.3.10 [33] GB [31] 9905542.8

[86] 国际申请 PCT/GB00/00890 2000.3.10

[87] 国际公布 WO00/53030 英 2000.9.14

[85] 进入国家阶段日期 2001.9.28

[71] 申请人 马斯英国有限公司

地址 英国伯克郡

[72] 发明人 J·福 C·J·吉法德

M-L·A·巴隆

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 杜京英

权利要求书 3 页 说明书 34 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 含有椰子胚乳纤维的宠物食品产物

[57] 摘要

本发明涉及椰子胚乳纤维在宠物食品产物中作为食用纤维组分的用途,椰子胚乳纤维在宠物食品产物制备中的用途,包含椰子胚乳纤维的宠物食品产物,这类宠物食品产物的制备方法以及包括用这类宠物食品产物饲喂宠物动物的方法。本发明还涉及椰子胚乳纤维用于减少和防止宠物大肠肠炎和用于减少和防止致病菌感染的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种宠物食品产物，其中包含椰子胚乳纤维。
2. 如权利要求 1 的宠物食品产物，其中所述椰子胚乳纤维为干椰子肉、脱脂干椰子肉、新鲜椰子胚乳、椰子粉或干椰子仁的形式。
3. 如权利要求 1 或 2 的宠物食品产物，其中在所述宠物食品产物中存在的食用纤维的量通过 Englyst 方法测量、以干物质计为 0.15 至 5%。
4. 如权利要求 1 至 3 任一项的宠物食品产物，其中存在以所述宠物食品产物干物质计 0.5 至 15% 的脱脂干椰子肉。
5. 如权利要求 1 至 4 任一项的宠物食品产物的制备方法，包括混合所述组分，且还可任选地进行加热 / 蒸煮。
6. 一种包括给动物饲喂如权利要求 1 至 4 任一项的宠物食品产物的方法。
7. 椰子胚乳纤维作为食用纤维组分在宠物食品产物中的用途。
8. 如权利要求 7 的用途，其中所述椰子胚乳纤维为干椰子肉、脱脂干椰子肉、新鲜椰子胚乳、椰子粉或干椰子仁的形式。
9. 如权利要求 7 或 8 的用途，其中在所述宠物食品产物中存在的食用纤维的量通过 Englyst 方法测量、以干物质计为 0.15 至 5%。
10. 如权利要求 7 至 9 任一项的用途，其中在所述宠物食品产物中存在以干物质计 0.5 至 15% 的脱脂干椰子肉。
11. 椰子胚乳纤维用于制备宠物食品产物的用途。
12. 椰子胚乳纤维在制备用于预防或治疗不良粪便质量的宠物食品产物中的用途。
13. 椰子胚乳纤维在制备用于维持或改进胃肠道健康的宠物食品产物中的用途。
14. 如权利要求 11 至 13 任一项的椰子胚乳纤维的用途，其中所述椰子胚乳纤维为干椰子肉、脱脂干椰子肉、新鲜椰子胚乳、椰子粉或干椰子仁的形式。

15. 如权利要求 11 至 14 任一项的用途, 其中在所述宠物食品产物中存在的食用纤维的量通过 Englyst 方法测量、以干物质计为 0.15 至 5%。

16. 如权利要求 11 至 15 任一项的用途, 其中在所述宠物食品产物中存在以干物质计 0.5 至 15% 的脱脂干椰子肉。

17. 椰子胚乳纤维在制备用于预防或治疗宠物动物大肠中致病菌的宠物食品产物中的用途。

18. 如权利要求 17 的用途, 其中所述椰子胚乳纤维为干椰子肉、脱脂干椰子肉、新鲜椰子胚乳、椰子粉或干椰子仁的形式。

19. 如权利要求 17 或 18 的用途, 其中所述致病菌是弯曲杆菌属、沙门氏菌属或大肠埃希氏菌。

20. 如权利要求 17 至 19 任一项的用途, 其中所述动物是犬科动物。

21. 一种预防或治疗宠物动物大肠中致病菌感染的方法, 所述方法包括给所述宠物动物饲喂含有椰子胚乳纤维的宠物食品产物。

22. 如权利要求 21 的方法, 其中所述椰子胚乳纤维为干椰子肉、脱脂干椰子肉、新鲜椰子胚乳、椰子粉或干椰子仁的形式。

23. 如权利要求 21 或 22 的方法, 其中所述致病菌是弯曲杆菌属、沙门氏菌属或大肠埃希氏菌。

24. 如权利要求 21、22 或 23 的方法, 其中所述宠物动物是犬科动物。

25. 椰子胚乳纤维在制备用于预防或治疗肠炎的宠物食品产物中的用途。

26. 如权利要求 25 的用途, 其中所述椰子胚乳纤维是干椰子肉、脱脂干椰子肉、新鲜椰子胚乳、椰子粉或干椰子仁的形式。

27. 如权利要求 25 或 26 的用途, 其中所述动物是犬科动物。

28. 一种预防或治疗动物肠炎的方法, 所述方法包括给所述宠物动物饲喂含有椰子胚乳纤维的宠物食品产物。

29. 如权利要求 28 的方法, 其中所述椰子胚乳纤维为干椰子肉、

脱脂干椰子肉、新鲜椰子胚乳、椰子粉或干椰子仁的形式。

30. 如权利要求 28 或 29 的方法，其中所述宠物动物是犬科动物。

说明书

含有椰子胚乳纤维的宠物食品产物

本发明涉及椰子胚乳纤维在宠物食品产物中作为食用纤维组分的用途，椰子胚乳纤维在宠物食品产物制备中的用途，包含椰子胚乳纤维的宠物食品产物，这类宠物食品产物的制备方法以及包括用这类宠物食品产物饲喂宠物动物(pet animal)的方法。本发明还涉及椰子胚乳纤维用于减少和防止宠物肠炎(intestinal inflammation)和用于减少和防止在宠物大肠中的致病菌感染的用途。

保持和改进宠物的健康是现有技术所不断努力的目标。宠物健康可按若干种途径来进行监测。其中的两种是粪便质量和胃肠道(GI)健康。宠物动物的良好质量的粪便具有双重的重要性。首先，它是宠物健康的良好的指征。已公知，良好的粪便质量通常反映出健康的结肠结构和功能。其次，它是宠物主人在实际过程当中所希望的。对应的，保持宠物粪便的良好的质量和改进宠物粪便质量的能力是现有技术所不断努力的目标。现有技术的另一个致力的目标是改进宠物动物的 GI 道健康。保持和改进 GI 道健康的能力对宠物所有者是有益的，因为它对其宠物的总体健康是有影响的。

保持动物正常胃肠道功能和改善急性腹泻的一种方法是在宠物食品产物中添加纤维源。

纤维对大便习惯、增加粪便排便量、减少排便次数(transit times)和改变结肠新陈代谢具有很宽范围的作用。纤维的许多有益作用与其在大肠中的大量分解有关。称为发酵的这一厌氧过程是在结肠中发生的主要代谢现象。发酵是位于大肠中的微生物复杂集合群体的一种消化功能，这种功能分解了在上部肠中未水解和吸收的复杂碳水化合物和其它底物。微生物群(microbiotia)和寄主均从这种共生中受益。

在生理和生化方面在很宽范围内变化的数百种类型的细菌存在于结肠内。对能产生多种效果的微生物群落的各种行为进行表征是一项

极复杂的工作，甚至在人类领域中也还是不清楚的。然而，通过对作为总体的细菌群体的发酵行为进行量化可获得在结肠中的微生物群落的作用的一些了解。

复杂碳水化合物主要的发酵产物是短链脂肪酸(SCFAs)、气体和能量。所产生的能量用于微生物细胞生长，这将大量的结肠氮转化为细菌蛋白质并增加了微生物总量。SCFAs 被快速吸收，并可通过给结肠粘膜提供能量底物和促进从结肠内腔中的水和电解质吸收而影响胃肠功能。在发酵过程中所产生的气体经肺和作为肠胃胀气而排出。在碳水化合物有限的环境中，细菌会趋向于分解蛋白质，这以支链脂肪酸的形态提供数量少得多的能量并且还进行对寄主有潜在毒性的新陈代谢（氨、胺、苯酚等）。本发明的目的之一是在宠物食品产物中加入适用的食用纤维。在商业宠物食品产物的生产中，使用了少数的不同技术。在所有情况下，产品组分混合在一起（常常，但不必须，进行蒸煮/加热），随后可加入其它组分，然后转移至所要装填的各种容器中。所述方法可包括挤压蒸煮，例如在生产干燥产物中。另外，所述方法也可包括在生产“大块状物(chunks)”中的乳液研磨。各种各样的方法会包括将产物从加工装置的一部分泵送到另一部分，还可包括泵送到罐中。总是希望获得使组分至最终产物的加工最大化的组分的混合物。本发明的另一目的是提供在制备过程中特别适用的食用纤维。

本发明还涉及在宠物食品产物中提供适用的纤维源。所述纤维源特别易于在宠物食品的生产中使用。

对应的，本发明的第一方面是提供在宠物食品产物中椰子胚乳纤维作为食用纤维组分的用途。本发明的第一方面包括椰子胚乳纤维在宠物食品产物制备中作为食用纤维组分的用途。

椰子胚乳纤维可作为单一的食用纤维组分或与一或多种其它食用纤维组分的混合物来使用，所述其它食用纤维组分例如甜菜粕、菊苣、柑桔渣(Citrus pulp)、米糠、角豆或 gum talha。

新鲜的椰子胚乳所具有的典型营养分布为水(35%)、油(44%)、

蛋白质（6%）、糖（7%）、纤维（3%）和灰分（1%）。但用于本发明所有方面中的椰子胚乳纤维的形态没有限制。椰子胚乳纤维可是新鲜的或呈任何其它形态，如干椰子肉脱脂干椰子肉（尤其是还称为干椰子肉饼、干椰子肉压饼或干椰子肉粉）、椰子粉、脱脂椰子粉、全脂或脱脂干椰子仁、干椰子肉、或已经过加热处理或酶处理的降解椰子胚乳。

干椰子肉(copra)是本发明的特别适用的椰子胚乳纤维源。干椰子肉是干燥的椰子胚乳（通常日光干燥）。脱脂干椰子肉也是特别适用的。脱脂干椰子肉是已进行过干燥并机械除去椰油的椰子胚乳的典型结果。脱脂干椰子肉饼通过首先获得干椰子肉、然后经挤压机或压榨机将干椰子肉压碎以除去大部分油来获得。剩余的残余物称为干椰子肉饼、干椰子肉压饼、或干椰子肉粉。

在不对本发明进行限制的情况下，在宠物食品产物中添加的椰子胚乳纤维相信可 i) 保持宠物良好的粪便质量或改进粪便质量和/或 ii) 保持良好的 GI 道健康或对之改进，这是通过如下的一或多种方式来实施的：改进粪便水的结合、降低粪便 pH、增加微生物发酵的有益终产物的产生并减少微生物发酵的有害终产物的产生、增加有益细菌种群量、增加在胃肠道中的水/电解质的摄入量、改进结肠结构/健康和提供良好的水结合性以对粪便组织进行平衡。本发明对于健康动物是适用的，包括敏感动物以及粪便质量不良或 GI 道健康不良的动物。对应的，本发明的第一方面还涉及椰子胚乳纤维在制备用于保持或改进宠物动物的粪便质量、或用于保持或改进 GI 道健康的宠物食品产物中的用途。不良的粪便质量在附录 1 中叙述。

粪便质量的评价和对保持或改进粪便质量的确定是现有技术中公知和所使用的技术。有一种以上的方法可使用（单独或结合）。所述方法通常使用一组经训练的观察者（经训练的成员可是公众或专业人员）。收集宠物的粪便样品，并可按附录 1 中所示的分级体系来打分。所确定的良好粪便质量的评价对应于常常反映正常胃肠功能的粪便质量。这通常是粪便的构成坚固并可保持其形状。硬且呈球粒并干燥（可

通过用力来排出)、或其水分含量使得其形状不能保持(包括腹泻)的粪便不能代表正常胃肠功能。精确的最佳粪便稠度在不同类型的宠物动物之间及不同动物物种之间可有一定程度的变化,但本领域普通技术人员通过观察总结可容易地确定。

良好 GI 道健康的评价和对 GI 道健康改进的确定是现有技术中公知和所使用的技术。GI 道健康保持或改进的评价可通过与以相同饮食喂养、但不含椰子胚乳纤维的宠物动物进行对比来确定。结肠(或肠或消化)健康可通过粪便质量和 pH、在 GI 道内腔中和/或粪便中有益和有潜在危害的细菌的存在和数量及全部和特定的短链脂肪酸来确定。这种活体内特征的研究是困难的,不仅由于大肠内难达到及收集其内容物的困难,而且还由于在结肠中所产生的 SCFAs 在体内的不同部位代谢所附加的复杂性,而在所述部位内不通过侵入性技术没有希望来获得样品。使用粪便作为接种体的活体外发酵体系可用作预测活体内纤维的某些生理作用的简便、快速(虽然是特别不确定的)的方法。在这方面,可通过对有益菌群总体的发酵行为进行量化来获得对在结肠中的微生物群落的有益作用的了解。在活体外发酵体系中测量的 SCFA 产量提供了细菌行为的一种指征(参见实施例 3)。

已发现本发明特别适用于增加来自椰子胚乳纤维发酵的丁酸盐(butyrate)的产量,从而增加在肠道中丁酸盐的利用度。由于其对结肠细胞(colonocytes)所施加的营养作用以及其有益的代谢作用,丁酸盐是一种特别令人感兴趣的 SCFA。使用本发明的椰子胚乳纤维,可观察到丁酸盐产量增加(活体外试验),在同一试验体系中,可一并见到使用公知产生高水平丁酸盐的底物如菊粉而导致的丁酸盐水平的增加。

由于其预防或治疗动物大肠中致病菌感染的作用,椰子胚乳纤维还是本发明的一种适用的组分。在大肠中的致病感染可是有症状(clinical)或无明显症状的。两种类型的感染均对动物的健康和动物的粪便质量有害。椰子胚乳纤维作用的其它细节在以下结合本发明的第六和第七方面来叙述。在本发明的第六和第七方面所给出的细节也

适合于本发明的第一至第五方面。

另外，除上述的椰子胚乳纤维的有益作用以外，还发现在宠物食品产物中的椰子胚乳纤维减少了动物结肠的炎性状态或保持了动物结肠的低炎性状态。椰子胚乳纤维在减少动物结肠的炎性状态方面的作用的其它细节以下结合本发明的第八和第九方面来进行叙述。

与椰子胚乳纤维源相结合的宠物食品产物的其余的组分对于本发明不是关键的，通常的标准产物均可与所需的椰子胚乳纤维相混合。最优选的是，本发明的宠物食品产物的结合组分提供了针对所涉及的具体宠物而言的全部的推荐维生素和矿物质（完全和均衡食品），例如，在以下文献中所叙述的：National Research Council, 1985, 《狗的营养要求》 Nutritional Requirements for Dogs, National Academy Press, Washington D.C. (ISBN:0-309-03496-5); National Research Council, 1986, 《猫的营养要求》 Nutritional Requirements of Cats, National Academy Press, Washington D.C. (ISBN:0-309-03682-8)或 Association of American Feed Control Officials, 官方出版物 1996。

由于其它的原因，本发明的椰子胚乳纤维源作为宠物食品产物组分还是特别适用和有效的。这是因为，所述纤维源，在大多数情况下，会含有适用水平的其它营养因子，如脂肪和蛋白质。这些其它营养因子的存在（及其存在的比例）是由于其存在于所述纤维的原始来源（椰子胚乳）中。公知椰子油的中链脂肪酸(MCFAs)含量高，且这种 MCFAs 更易于在动物肠道中吸收。对应的，存在于椰子胚乳纤维源（甚至在以干物质计含有 5-10% 脂肪的脱脂干椰子肉饼中）中的椰子油给动物提供了关键的营养因子。由于这种油是特别好的易吸收的脂肪酸来源，在所述纤维源中所述油的存在对某些组的暴露的 (compromised) 宠物动物是特别适用的。

作为食用纤维向宠物食品产物中加入的椰子胚乳纤维的量没有限制。优选，在宠物食品产物中存在的椰子胚乳纤维组分的量以干物质计为约 0.15 至 8%，优选 0.15 至 5%，所述数量按 Egnlyst 方法测

量(如在Egnlyst H. N. 和 Cumming J. H. (1984), 通过呈糖醇(alditol) 乙酸酯的糖组分的气-液相色谱法来测量总的非淀粉多糖的简化方法。Analyst. 109, 937-942, 将其引入本文作为参考)。通过这种方法测量的水平可为 0.15% 至高达 5%、6%、7%、或 8%。下限可为 1.5%、2% 或 3%。Egnlyst 方法叙述在附录 2 中。大体上是, 在溶解后经酶解来除去淀粉, 并以通过酸水解所释出的糖组分的总量形式来测量 NSP。纤维源的淀粉通过在热水中煮沸来进行胶凝化, 然后用 α -淀粉酶和支链淀粉酶来除去。淀粉和改性、或耐久性(resistant) 淀粉分散于 DMSO 中。然后三种试样经受测量(i) 总 NSP(ii) 水溶性 NSP 和(iii) 纤维素的辅助步骤。在各种情况下用硫酸来对组分进行水解。将糖组分转化为糖醇, 并使用气液色谱法(GLC) 以其糖醇乙酸酯的形式来进行测量。可获得总的食用纤维以及不溶性和可溶性部分的量。可单独来测量纤维素, 并通过测量各种单糖来表征非纤维素多糖。

可通过确定在具体形态的椰子胚乳纤维中的纤维的数量来容易地确定椰子胚乳纤维(根据椰子胚乳的形态可不同, 如干椰子肉或椰子干粉)的添加量。例如, 按照 Egnlyst 方法, 脱脂干椰子肉含有约 33.5% 的总的食用纤维。因此, 按照本发明的第一方面为提供以干物质计约 0.15 至 5% 的优选纤维水平而在宠物食品产物中添加的脱脂干椰子肉的优选量为宠物食品产物的以干物质计的约 0.5 至 15%。

这些范围适用于针对各种宠物动物的本发明的第一方面。本发明特别适用于哺乳宠物动物, 特别是狗、猫和马。

本发明的宠物食品产物优选是市售宠物食品。这种产品优选以宠物食品的形式出售, 尤其是宠物猫或宠物狗的食品。

所述宠物食品产物优选是进行包装的。以这种方式, 消费者能够从包装中明确食品产物中的组分并肯定其适用于所关心的具体宠物。所述包装可是金属包装(通常呈锡或柔性金属箔形式)、塑料、纸或纸板。所述宠物食品可是干燥的、半湿的或湿的产物。湿的食品包括以罐出售的食品, 其水分含量为 70 至 90%。干的食物包括具有类似组成、但含 5 至 15% 水分的食品, 并呈小饼干类碎块来提供。在任何

产物中水分的含量会影响可使用或需要的包装类型。

本发明的宠物食品产物包括了宠物在其饮食中所消耗的任何产品。因而，本发明涵盖了标准食品产物以及宠物食品点心（如点心快、谷物制的条糕、点心、饼干和甜品）。所述食品产物优选是蒸煮产物。它可呈胶凝的淀粉基物形态。它可呈肉汁、果冻、面包块或水的大块状形态。其中可加入肉或动物来源的物质（如牛肉、鸡肉、火鸡、羊肉、猪肉、鱼、血浆、动物髓骨等或其一或多种）。所述产物还可是不含肉的（优选包括肉的替代品如大豆、玉米谷蛋白或大豆产品）以提供蛋白质源。所述产物可含有附加的蛋白质源如大豆蛋白质浓缩物、奶蛋白质、谷蛋白等。所述产物还可含有淀粉源如一或多种谷物（如小麦、玉米、水稻、燕麦、大麦等），或者也可是不含淀粉的。通常，干的狗或猫食品含有约 20-30% 的粗蛋白、约 10-20% 的脂肪，其余是碳水化合物，包括食用纤维和灰分。通常的湿的或含水分的产物含有（以干物质计）约 40% 脂肪、50% 蛋白质，其余为纤维和灰分。本发明特别与作为宠物食品出售的这里叙述的宠物食品产物相关，尤其是狗或猫的宠物食品。按照本发明，猫和狗优选是家猫 (*felis domesticus*) 或家犬 (*canis domesticus*)。

本发明的第二方面提供了椰子胚乳纤维在制备宠物食品产物中的用途。本发明的第二方面不包括制备包含含有椰子胚乳和角叉菜胶的凝胶的宠物食品产物的这类用途。包含含有椰子胚乳和角叉菜胶的凝胶的这类宠物食品产物先前已在 W096/39046 中叙述。在 W096/39046 中的公开内容仅限于包含角叉菜胶和椰子胚乳的凝胶体系。在 W096/39046 中所述胚乳的用途仅是作为凝胶体系组分。

椰子胚乳纤维在制备宠物食品产物中的用途（按照本发明的第二方面）具有上述本发明第一方面的优点。另外，本发明人已确定，椰子胚乳纤维是用于宠物食品制备过程中的特别适用的食用纤维。椰子胚乳用作食用纤维是极令人满意的。与使用其它纤维源相对比，当添加到其余的产物组分中时，椰子胚乳纤维有利且意外地产生较低的乳液粘度。在产物的泵送和成形过程中，这类纤维的优点是特别突出的。

它在制备“大块状物(chunks)”的“乳液研磨”过程中特别适用。另外，使用椰子胚乳纤维源在加工后不导致灰的颜色，而其它一些纤维源常常伴有这种颜色。取而代之的是，获得了在美感上可接受的颜色。

本发明第一方面的优选特征也适合于其第二方面。

本发明的第三方面提供了包含椰子胚乳纤维的宠物食品产物。本发明的第三方面不包括如 W096/39046 中所述的包含含有椰子胚乳和角叉菜胶的凝胶的宠物食品产物。本发明的第三方面的宠物食品产物具有上述本发明第一和第二方面的优点。这些优点包括；促进良好的粪便质量和 GI 健康，尤其是在发酵后 SCFA 丁酸盐的水平，意外的是，促进良好的加工质量。所述宠物食品产物特别适合于饲喂宠物动物。

本发明第一和第二方面的全部优选特征也适合于其第三方面。这些特征包括椰子胚乳纤维的数量和来源、食品产物的类型、所述食品产物的制备和其它组分。

本发明的第四方面提供了制备本发明第三方面的宠物食品的方法，包括混合组分，以及任选进行的加热 / 蒸煮。宠物食品产物可在混合和 / 或加热 / 蒸煮之前或之后进行成形。

如上所述，相对于引入其它纤维而言，椰子胚乳纤维的引入对制备宠物食品产物的方法和所产生的宠物食品产物提供了许多优点。

所述方法包括使椰子胚乳纤维源与一或多种宠物食品产物的组分混合。所述产物可按现有技术中公知的任何其它方法来制备。可在一或多种其它组分加热或蒸煮之前或之后添加所述椰子胚乳纤维。所述方法还可包括从椰子原料中提取椰子胚乳纤维的步骤。

所述食品产物可按照现有技术中公知的任何方法来制备，如在 Waltham 狗和猫营养手册(Waltham Book of Dog and Cat Nutrition)，ATB Edney 编著，由 A. Rainbird 所著章节，名称为“均衡饮食”“A Balanced Diet”第 57 至 74 页，Pergamon Press Oxford 中所述。

在一至三方面中的所有优选特征均也适用于第四方面。这些特征包括椰子胚乳纤维的数量和来源、食品产物的类型、食品产物的制备和其它组分。

本发明的第五方面提供了包括给宠物动物饲喂本发明第三方面的宠物食品产物的方法。本发明的第五方面包括保持或改进宠物动物胃肠道健康的方法，所述方法包括给动物饲喂按照本发明第三方面的宠物食品产物。给宠物动物饲喂本发明第三方面的宠物食品产物通过其中存在的椰子胚乳纤维而保持或改进了所述动物的 GI 健康。给动物饲喂足够数量的所述宠物食品产物并饲喂足够长的时间以保持或改进 GI 健康。具体的 GI 健康的改进是源于产生的 SCFA，尤其是产生的丁酸盐。

本发明的第五方面包括保持或改进宠物动物粪便质量的方法，所述方法包括给动物饲喂按照本发明第三方面的宠物食品产物。

给宠物动物饲喂本发明第三方面的宠物食品产物通过其中存在的椰子胚乳纤维而保持或改进了所述动物的粪便质量。给动物饲喂足够数量的宠物食品产物并饲喂足够长的时间以保持或改进粪便质量。

本发明第五方面的饲喂数量和时间取决于若干种因素，其中包括动物种类、品种、年龄和总体健康状况，而宠物饲养者可容易地用其来确定食物的数量和饲喂的时间。

第五方面的方法可以是但非仅限于兽医治疗。所述饲喂可是非治疗性的。术语“饲喂”还可包括给动物“施用”的意义。所述方法可是预防性的或治疗性的。本发明的第一至第四方面的优选特征也适用于第五方面。这些优选特征包括椰子胚乳纤维的数量和来源、食品产物的类型、食品产物的制备和其它组分。

本发明的第六方面提供了椰子胚乳纤维在制备用于预防或治疗宠物动物大肠致病菌感染的宠物食品产物中的用途。

所涉及的是宠物动物的大肠被致病菌感染。具体的致病菌包括弯曲杆菌属 (*Campylobacter*) (尤其是空肠弯曲杆菌)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 和大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)。造成大多数人类感染的空肠弯曲杆菌也是涉及猫和狗的主要菌类。该类菌可起幼龄狗和猫的病原体作用，并且也可能作为更年长的动物的病原体。狗的临床疾病表现为腹泻，范围从中度至带血粘液腹泻、下坠

(tenesmus)、呕吐、厌食和抑郁。有关玩伴动物中弯曲杆菌属 (*Campylobacter*) 感染的主要担忧是携带和机体分泌所存在的人畜共患危险。据估计, 空肠弯曲杆菌引起的所有人类腹泻中的 5% 是由于与被感染的狗或猫的接触所致。许多最近的研究引证, 拥有狗成为患弯曲杆菌属 (*Campylobacter*) 引起的疾病的主要危险因素。在 Christchurch, New Zealand 进行的研究发现, 与狗的日常接触带来 1.25 至 2 倍的感染弯曲杆菌属的危险。另外, 还令人担忧的是, 通过持续使用抗菌素菌株来减少或消除弯曲杆菌属感染的作法可导致这种机体的耐抗菌素菌株的情况。

包含椰子胚乳纤维的本发明宠物食品产物已发现可有效地预防和治疗宠物动物大肠的致病菌感染。所述动物尤其是猫或狗 (在所述两种情况下, 优选家猫 (*Felis domesticus*) 或家犬 (*Canis domesticus*))。其中病菌尤其包括弯曲杆菌属 (*Campylobacter*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、致病梭菌属 (*Clostridium*) 和大肠埃希氏菌 (*E. coli*), 如致肠病的大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 和致细胞毒素性的大肠埃希氏菌 (*E. coli*)。

本发明的第七方面提供了预防或治疗宠物动物大肠致病菌感染的方法, 所述方法包括给所述宠物动物饲喂包含椰子胚乳纤维的宠物食品产物。

本发明的第八方面提供了椰子胚乳纤维在制备用于预防或治疗宠物动物肠炎的宠物食品产物中的用途。

在狗中, 在结肠中的炎性反应与各种介质的产生有关, 所述介质包括廿烷类前列腺素 E2 (PGE₂)。

本发明表明, 饲喂包含椰子胚乳纤维的宠物食品产物的宠物动物所产生的 PGE₂ 明显少于不含纤维源的相同饮食。

本发明的第九方面提供了预防或减缓宠物动物肠炎的方法, 所述方法包括给所述动物饲喂包含椰子胚乳纤维的宠物食品产物。

按照本发明的第六、第七、第八和第九方面, 所述动物是犬类动物。所述椰子胚乳纤维可呈任何形态, 优选是如本发明的第一至第五

方面所述。按 Englyst 方法来测量，以干物质计，在宠物食品产物中椰子胚乳纤维的含量优选为 0.15 至 5%。所有的其它优选特征如同本发明的第一至第五方面。

以下参照附图对本发明进行叙述，其中图 1 所示为含有干椰子肉压饼的两种饮食之间的粪便分值对比。

图 2 所示为在犬类大肠模型中包含椰子胚乳纤维对空肠弯曲杆菌存活率的影响图；和

图 3 所示为结肠活组织检查试样的平均廿烷类前列腺素 E_2 产量。

以下参照如下的非限制性实施例对本发明进行叙述：

实施例 1

本实施例对脱脂干燥椰子粉的制备和使用进行叙述。

从当地市场购得椰子，并回收白椰肉或胚乳。将胚乳进行微细粉碎并用丙酮重复提取以除去脂肪和水。从而获得干燥脱脂椰子粉。

实施例 2

这一实施例对机械脱脂干椰子饼的制备进行叙述。

将从椰子中剥离的椰子胚乳进行粉碎。使用在油籽加工领域中所广泛公知的技术将粉碎过的所述物质加热至最高 120°C，并通过液压机或压榨机来除去大多数油。如必要，对通过这种方法所获得的提取物进行干燥，以获得水分含量约为 15% 的产物。

实施例 3

对作为食用纤维的椰子胚乳纤维进行评价。

原料

在这种活体外发酵体系中进行评价的原料特别适用于添加到干燥和罐装狗和猫食产品中。

表 1. 纤维源

原料	物理外观
脱脂干椰子肉压饼	粗颗粒的橙色 / 褐色颗粒

使用 Englyst 和 AOAC 方法(表 2)对原料的总食用纤维进行分析。

所述 AOAC 方法可见于 AOAC international 1995, Total, Soluble and Insoluble dietary Fibre in Foods (食品中总的可溶和不可溶食用纤维)。AOAC Official method 991 43, Official methods of Analysis, 16th Ed. 在本文的先前部分和在附录 2 中提到了 Englyst 方法。食用纤维分析表明, 原料之间的总食用纤维量有显著差别。与 Englyst 分析相对比, 通过 AOAC 分析一般得出较高的总食用纤维百分比。Englyst 技术使用酶-化学方法来测量非淀粉多糖 (NSP)-植物细胞壁的主要结构组分, 其覆盖了更传统的食用纤维定义。AOAC 技术使用酶与测重法相结合来测量纤维, 其包含了木质素和一些抗性(resistant)淀粉, 导致较高的总食用纤维量。

表 2. 通过 AOAC 和 Englyst 方法分析原料的总食用纤维(TDF)

纤维	AOAC			Englyst		
	% TDF	可溶	不可溶	% TDF	可溶	不可溶
脱脂干椰子肉压饼	42.5	2.4	40.1	33.5	3.4	30.4

由于干椰子肉压饼的食用纤维含量 (Englyst) 低于 40%, 进一步进行分析来确定这种纤维源的其余的最相近组分 (表 3)。非纤维组分的含量主要是蛋白质 (20.8%)。干椰子肉压饼的蛋白质和游离糖组分可人工地提供给发酵方法的终端产物, 因为它们可能不到达体内的大肠。但是, 这些纤维源大量营养元素的消化取决于它们可接近小肠中的寄主肠淀粉酶和蛋白酶的能力。干椰子肉压饼的相近营养物呈较少量存在, 因而纤维源以其“自然状态”计来考虑。

表 3. 原料的相近组分、游离糖和淀粉分析

纤维	游离糖	淀粉	胶凝化 淀粉	相近组分			
				蛋白质	脂肪	水分	灰分
脱脂干椰子肉压饼	7.7	0	0	20.8	8.2	10.8	5.7

方法

采用的简单的手段来表征纤维在活体外的发酵。在以下文献中报导了类似的技术, 所述文献是 Brøbech Mortensen P., Hove, H., Rye Clausen, M. 和 Holtug, K. (1991) 在人的粪便批次培养物中发酵生成短链脂肪酸和乳酸盐 (Fermentation to short-chain fatty acids and lactate in human faecal batch cultures) . Scand. J. Gastroenterol. 26, 1285-1294, Tigemeyer, E.C., Bourquin, L.D., Fahey, G.C. 和 Garleb, K.A. (1991) 人的粪便细菌活体外发酵各种纤维的能力 (Fermentability of various fibre sources by human faecal bacteria in vitro) . Am.J. Clin.Nutri. 53, 1418-1428, Sunvold, G.D., Fahey, G.C., Merchen, N.R. 和 Reinhart G.A. (1995) 通过狗和猫的粪便接种体体外发酵所选纤维底物: 饮食组成对有机底物的消失和短链脂肪酸的产生的影响 (In vitro fermentation of selected fibrous substrates by dog and cat faecal inoculum: Influence of diet composition on substrate organic matter disappearance and short-chain fatty acid production) . J. Anim. Sci. 73, 1110-1122 和 Edwards, C.A., Gibson, G., Champ, M., Jensen, B-B., Mathers, J.C., Nagengast, F., Rumney, C. 和 Quehl, A. (1996) 通过人的粪便细菌对淀粉进行定量的体外方法 (In vitro method for quantification of the fermentation of starch by human faecal bacteria) . J. Sci. Food Agric. 71, 209-217. 包括在这里所使用的那一种在内的这些体系可用作体外试验来查看粪便发酵结果。然而, 这些试验不是专一性的, 而且尤其不能由于在任何一种动物粪便的微生物群落中的内在变化而绝对地来进行限定。

纤维试样制备 (1 天)

· 以 0.7% (w/v) 的浓度呈干椰子肉压饼来提供纤维底物。称量 0.231g (± 0.05 g) 的干椰子肉压饼加入三个 60ml 的玻璃血清瓶 (Jencons) 中, 并准确记录重量。添加 30ml 的发酵介质 (表 4), 用

原棉塞封住瓶口，并覆盖金属箔。

制备无纤维源的六瓶作为对照。

· 在含有跳蚤(flea)的锥形烧瓶中制备 200ml pH 为 7.4 的 10mM 磷酸钠缓冲液、和 200ml 的苛求厌氧的液体培养基(FAB)，用于粪便再悬浮。在高压灭菌器中对所述瓶进行杀菌（15 分钟，121℃）。将所述瓶置于厌氧箱(Don Whitley)内以在高压灭菌后立即进行前减数(pre-reduce)。

表 4. 发酵介质组成

发酵介质		
		1 升
酵母提取物		2g
蛋白胨水		2g
半胱氨酸 HCl		0.5g
维生素 K(d=0.967g/ml)		5μl
吐温 80		2ml
盐溶液		40ml
氯高铁血红素溶液		5ml
指示剂溶液		5ml
盐溶液		
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.2g	加入 300ml H ₂ O 中
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g	
NaCl	2g	加入 500ml H ₂ O 中
K ₂ HPO ₄	1g	
KH ₂ PO ₄	1g	
NaHCO ₃	10g	
- 用水加至 1 升		
氯高铁血红素溶液		
KOH		0.28g
EtOH 95%		25ml
氯高铁血红素		0.1g
- 用水加至 100ml		
指示剂溶液		
Rezasurin		0.02g
-用水加至 100ml		

猫和狗

· 使用猫或狗粪便来作为体外发酵体系的细菌接种体源。在所述研究开始之前，给猫饲喂如下干燥全价饮食达至少 3 月时间。在所述研究开始之前，给狗饲喂配制用来成年维持的干燥饮食达至少 2 月时间。

· 干燥产品配方：

	猫	狗
家禽	35	30
谷物（稻米&玉米）	55	60
矿物质	5	5
脂肪	5	5
总和	100	100

· 将猫豢养于小屋内 3 周的时间以便能够收集新鲜的粪便，随后中断一周。给猫独自饲喂维持体重所需量的饮食，并可在所有时间内自由饮用新鲜水。

· 给狗独自饲喂维持体重所需的饮食，并可在所有时间内自由饮用新鲜水。

粪便接种（2 天）

· 收集新鲜粪便样品。在排便后 60 分钟内将 20g 湿粪便添加到前减数(pre-reduced)的磷酸缓冲液中。将烧瓶置于厌氧箱中的磁力搅拌器上以产生粪便再悬浮浆液（在搅拌器上约 10 分钟）。除去原棉塞，并将这种 10% (w/v) 的粪便浆液 3ml 等分于厌氧箱中的含有纤维源的各血清瓶中以及未添加纤维的三个对照瓶中。这样在各瓶中提供了约 1% 的粪便接种量。接种三个瓶以覆盖三个时间点的测量。用丁基橡胶帽替代原棉塞，并使用金属帽来密封各瓶。

· 无纤维的三个对照瓶未接种并起介质对照作用。三个无纤维的瓶进行接种并用作介质和粪便对照。将所述瓶在 37°C 下于厌氧箱中培养。在接种粪便后的 0、6 和 24 小时进行时间点测量。

发酵终点测量（2 和 3 天）

(i) SCFA 测量（0、6、24 小时）

· 将 4ml 等份的发酵液添加到 15ml 的含有 1.25ml 20% (w/v) 偏磷酸的塑料皮质(cortex)管中。将所述管翻转并在室温下保持 30 分钟以在用气相色谱法进行分析之前贮存于 -80°C 以前使酸能够沉淀。这会检测到 SCFA; 乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、正戊酸、异戊酸、己酸、异己酸和庚酸。

· 使试样彻底混合并使之沉降。用移液管将 1ml 的 0.01M 混合标准（在蒸馏水中的 0.01M 的乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、异己酸、和己酸）或发酵提取物滴加到磨玻璃口(ground glass neck)的玻璃试管中，并添加约 0.4g 的 NaCl (HPLC 级) 和 0.3ml 的 12M H_2SO_4 。添加 1.5ml 的叔丁基甲基醚 (TBME, HPLC 级, 纯度 99.8 %), 并将所述混合物摇动 1 分钟。使含水和溶剂的层进行 15 分钟的分层, 从而部分除去顶部醚层 (约 0.5ml, 使用橡皮头移液管) 并置于具有外膜密封(parafilm seal)的 2ml 的螺帽瓶中。将这些提取物注入气相色谱仪中, 通过与 VFA 标准溶液对比来测量 SCFA 浓度。

(ii) 气体测量（6、24 小时）

· 从厌氧箱中取出 6 和 24 小时时间点的瓶。提起“撕下”的金属密封以使得可测量瓶内的气体压力。以在各次测量前调到零处的压力计来测量压力的改变 (以 mBar 计)。

(iii) pH 测量（0、6、24 小时）

· 使用相对于公知标准校正过的 pH 计 (Orino, ISE 710A) 对发酵液的 pH 进行测量。

结果

细菌发酵终点

在存在 1% 粪便接种物的条件下, 在接种 6 和 24 小时后, 以体外发酵液所产生的 SCFA、产生的气体和 pH 来测量脱脂干椰子肉压饼对细菌活性的潜在影响。对 14 只猫测量的结果进行分析并列于表 6 中。由狗 (n=6) 得出的结果总结于表 7 中。

不含外部底物的对照试样产生显著数量的 SCFA 和气体。从添加有底物的试样中减去由对照试样的基底产量从而得出由椰子胚乳纤维源所引起的产量。正值表示有高于基底值的附加的产量，负值表示对产量有抑制，或相对于对照有消耗。pH 负值表示 pH 降低（结果示于表 6 和 7 中）。

(a) 总 SCFA

所产生的 SCFA 总量随时间增加（表 6 和 7）。通过对猫和狗进行观察，脱脂干椰子肉压饼导致在 6 小时后总的 SCFA 明显增加 ($p < 0.05$)，高于不含纤维源情况下所产生的值。24 小时情形类似。

通过对组分 SCFA 进行表征来对产生的总 SCFA 更详细地进行研究。在活体内，乙酸、丙酸和丁酸是主要的终点碳水化合物发酵物，且占结肠中总 SCFA 的 90%。对猫和狗在 6 和 24 小时后观察到乙酸和丙酸的明显 ($p < 0.05$) 增加（例外的是对猫 ($n=14$) 在 24 后的乙酸值）。

(i) 丁酸盐

丁酸盐因其可对结肠细胞 (colonocytes) 施加的营养作用以及其有益的代谢作用而特别有意义。猫在 6 和 24 小时后在存在脱脂干椰子肉压饼的情况下产生的丁酸盐明显增加 ($p < 0.05$)，高于对照产量（表 6）。在猫的情形中，在 24 小时后，观察到由脱脂干椰子肉压饼导致的丁酸盐产量增加 80%。这种接近两倍的丁酸盐水平在活体内可具有生物显著性。对于狗在 24 小时后，观察到增加，但不显著（表 7）。

(b) 气体

气体是第二种主要的终点发酵产物。气体的主要组分是 CO_2 、 H_2 和 CH_4 ，其主要来自碳水化合物发酵。气体的产生通过随时间的压力增加 (mBar) 来测量。

在猫和狗的研究中，在 24 小时后脱脂干椰子肉压饼纤维底物产生显著的气体增加 ($p < 0.05$)，高于在不存在纤维的情况下产生的气体的量（表 6）。

表 6. 在用 1% (w/v) 猫粪便匀浆接种 6 和 24 小时后在不存在和存在干椰子肉压饼的情况下 SCFA、气体和氨的产量。所述数值是 n=14 的平均值。

猫 (n=14)	总量				气体	pH
	SCFA#	乙酸盐	丙酸盐	丁酸盐		
6 小时	产生 mmol/L				mBar	单位
对照产量	11.6 ^a	7.01 ^a	1.58 ^a	1.15 ^a	61.2 ^a	6.26 ^a
SE	±0.49	±0.39	±0.08	±0.04	±14.46	±0.02
干椰子饼	3.28 ^b	0.75 ^b	1.74 ^b	0.73 ^b	29.3 ^a	-0.54 ^a
24 小时	产生 mmol/L				mBar	单位
对照产量	16.2 ^a	9.59 ^a	2.20 ^a	1.77 ^a	108.4 ^a	6.27 ^a
SE	±0.26	±0.23	±0.09	±0.05	±8.23	±0.02
干椰子饼	7.27 ^b	2.59 ^a	2.26 ^b	1.47 ^b	93.0 ^b	-0.47 ^a

在各测量点内有不同上标的数值（在任意栏中）有差别 $p < 0.05$ 。

#SCFA 总量是乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、己酸、异己酸、庚酸的总产量。

SE = 标准误差

表 7. 在用 1% (w/v) 狗粪便匀浆接种 6 和 24 小时后在不存在和存在干椰子肉压饼的情况下 SCFA、气体和氨的产量。所述数值是 n=6 的平均值。

狗 (n=6)	总量					
	SCFA#	乙酸盐	丙酸盐	丁酸盐	气体	pH
6 小时	产生 mmol/L				mBar	单位
对照产量	9.81 ^a	6.09 ^a	1.27 ^a	1.16 ^a	42.4 ^a	6.28 ^a
SE	±0.56	±0.34	±0.11	±0.10	±12.24	±0.03
干椰子饼	2.39 ^b	0.06 ^b	2.89 ^b	-0.06 ^a	49.63 ^a	-0.83 ^c
24 小时	产生 mmol/L				mBar	单位
对照产量	13.9 ^a	8.74 ^a	1.88 ^a	1.63 ^a	86.3 ^a	6.27 ^a
SE	±0.67	±0.41	±0.18	±0.09	±10.43	±0.02
干椰子饼	5.43 ^b	0.87 ^a	4.40 ^b	0.12 ^a	89.4 ^b	-0.74 ^b

在各测量点内有不同上标的数值（在任意栏中）有差别 $p < 0.05$ 。

总量#SCFA 是乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、己酸、异己酸、庚酸的总产量。

结论

· 发酵过程在很大程度上是由可利用底物的数量和种类驱动的。这一体系提供了极好的理解纤维底物可发酵性的方法，并对在大肠内微生物群落的作用提供了更好的了解。

· 已有人提出，理想的纤维源应是产生高数量 SCFA（特别是丁酸盐）的缓慢发酵物 (fermenter)。这种缓慢发酵纤维会确保具有残余发酵能力的纤维可达到栖生在结肠末端的细菌。从而可使用这类纤维源来沿大肠的全部长度上“饲喂”细菌。椰子胚乳纤维达到了这类纤维源的标准。

· 猫和狗之间干椰子肉压饼的总体发酵就总 SCFA 和气体产量而言看起来是相似的。

· 总体结果表明，椰子胚乳纤维的使用改进或维持了（良好）粪便质量并改进或维持了（良好）胃肠道健康。

· 对猫观察到的丁酸盐的明显增加，是归因于健康肠环境的重要因素。在猫中，与其它纤维源相对比，作为纤维源的脱脂干椰子肉压饼意外地好，其产生的丁酸盐量明显增加，高于基底值。在狗中观察到脱脂椰子胚乳纤维有类似的结果，但不显著。

实施例 4

介绍

该试验的目的是评价含有脱脂干椰子肉压饼的两种配方的粪便质量性能。

所使用的基础宠物食品是呈胶状物产物的罐装块状物。各种饮食的配方组分是：

饮食（块状物配方）	配方 1	配方 2
肉汁	50	42
肉和蛋白质源	43	45.5
小麦淀粉	1	1
盐	0.5	0.4
额外的水	5	10
脱脂干椰子肉压饼	1.9	1.1
总量（%）	105.9	100.00

配方 1 总量高于 100%，是由于烘箱损失（烘箱产率 90%）。所有罐均在 125°C 下加工 61 分钟。

方法

对代表若干不同品种的一组为 10 只的成年狗，在历经两周的试验中测量粪便质量。

所使用的狗是：

小猎兔犬 (Beagle)	1
小猎兔犬	2

小猎兔犬 3

小猎兔犬 4

小猎兔犬 5

英国施普林格长毛垂耳狗

(English Springer Spaniel) 6

7

金毛猎犬 (Golden Retriever) 8

梗狗 (Cairn Terrier) 9

袖珍髯狗 (Miniature Schnauzer) 10

给所述狗每天提供如下数量的饮食 (g/天, 以维持饲喂量计):

小猎兔 犬 1	小猎兔 犬 2	小猎兔 犬 3	小猎兔 犬 4	小猎兔 犬 5	英国施普 林格长毛 垂耳狗 6	英国施普 林格长毛 垂耳狗 7	金毛猎 犬 8	梗狗 9	袖珍髯 狗 10
1200	1400	1200	1100	1100	1100	1500	2000	600	500

在各试验周开始前, 给所述狗饲喂配方如下的标准宠物食品 2 天。这种例行的作法确保对粪便筛选研究有共同基线。

饮食配方

鱼和家禽 35%

谷物 (玉米、小麦) 20%

肉汁 45%

使用 17 类粪便评分等级对粪便质量进行主观测量, 由此所有通便分级 (以四分之一等级) 为 1 至 5 (参见附录 1)。使用在试验阶段中收集的所有粪便评分对各只狗计算平均粪便评分。通过对各只狗的平均值进行平均来计算对所述饮食的总平均粪便评分值。使用双向-ANOVA 来进行统计分析 (以饮食作为固定因子, 狗作为变化因子)。

结果

接受性

在两周试验中所有狗吃掉了 100% 的所提供的食物。

粪便质量

当按照平均粪便评分值来分类时，对两种饮食来说，总的粪便质量均是极好的。

无论是在 95% 或 90% 的置信水平下，在两种饮食之间平均粪便评分值均无显著性差异 (ANOVA, $p=0.77$)。

		配方 1	配方 2
粪便质量	平均评分值	2.3	2.3
	通便次数	200	207

图 1 表示了所述饮食的平均粪便评分值和 95% LSD (最小方差) 间隔 (interval) 的对比。

所述饮食的营养含量 (% 原状态)

	配方 1	配方 2
水分	81.9	82
蛋白质	7.5	6.9
脂肪	5.4	6.4
灰分	2.9	2.2
粗纤维 (AOAC)	0.2	0.3
不溶性纤维 (AOAC)	1.9	1.5
可溶性纤维 (AOAC)	0.9	0.8

讨论

当按照平均分数粪便来分级时，对两种饮食来说，总的粪便质量均是极好的。

无论是在 95% 或 90% 的置信水平下，在两种饮食之间平均粪便分数均无显著差异 (ANOVA, $p=0.77$)。

实施例 5

介绍

该试验的目的是评价含有干椰子肉压饼的干燥配方的粪便质量性能。

所使用的基础宠物食物是挤出的单组分干燥产物。配方组分如下：

饮食	配方
家禽	13
谷物（小麦&玉米）	17
矿物质	5
脂肪	5
干椰子肉压饼	5
总量（%）	100

方法

对代表许多不同品种的一组为 14 只的成年狗，在一周的试验中测量粪便质量。

所使用于试验的狗是：

1 只拉布拉多猎狗 (Labrador Retriever)

3 只柯利牧羊犬 (Border Collies)

2 只德国牧羊犬

1 只约克郡梗狗 (Yorkshire Terrier)

2 只苏赛克斯长毛垂耳狗 (Sussex Spaniels)

5 只杂交种

给所述狗饲喂以维持所需要的能量。

使用 9 类粪便评分等级对粪便质量进行主观测量，由此所有通便均分级（以二分之一等级）为 1 至 5（参见附录 1）。使用在试验阶段中收集的所有粪便评分值对各只狗计算平均粪便分值。通过对各只狗的平均值进行平均来计算所述饮食的总平均粪便评分值。

结果

接受性

在一周试验中所有狗吃掉了 100% 的所提供的食物。

粪便质量

当按照平均粪便分数来分类时，对所述产物来说，总的粪便质量均是极好的。

平均粪便评分值为 2.5。

结论

在干燥产物中使用脱脂干椰子肉压饼给出理想的粪便质量。

实施例 6

研究椰子胚乳纤维对犬肠中弯曲杆菌存活的影响。

简述

- 弯曲杆菌是引起狗临床和非临床感染的最主要的胃肠病原体之一。
- 已开发出犬大肠的活体外模型来测试新型纤维对犬的细菌病原体存活的影响。
- 在这种模型中加入椰子胚乳纤维导致从体系中消除了存活的空肠弯曲杆菌细胞。

方法

1. 由原种培养来繁殖空肠弯曲杆菌，并在 37°C 微需氧的 (microaerobic) 条件下 (5%O₂, 10%CO₂ 和 85% N₂) 来进行培养。液体培养基以 20ml 体积在 50ml 锥形瓶中进行培养，所述锥形瓶在轨道振荡器 (orbital shaker) 进行摇动。在进行实验之前将在 Mueller Hinton (MH) 肉汤 (Oxoid) 中培养过夜的培养基调整到 A₆₀₀ 1.0。

2. 将 200ml MH 肉汤、1ml 的调整过的空肠弯曲杆菌培养物、和 2g 新鲜粪便装入烧瓶。为对烧瓶进行测试，添加 0.7% (w/v) 的干椰子肉压饼并旋转以进行混合。对照瓶不进行任何添加。

3. 在实验起始 (0 小时) 和结束 (24 小时) 时对烧瓶进行采样，并通过对来自烧瓶试样的连续稀释和在弯曲杆菌选择性琼脂 (LabM) 上的平板稀释来确定空肠弯曲杆菌的活菌计数。所述板以微需氧的条件

培养 48 小时，之后确定存活菌数量。

4. 在实验结束时，使用 Multistix (Bayer) 来确定各烧瓶中的混合物的 pH。

5. 每次使用来自不同狗粪便试样进行六次实验。在研究过程中所有的狗均饲喂市售高级 (premium) (全价和平衡) 干燥食物。

结果

在 24 小时微需氧培养后，由添加了椰子胚乳纤维的烧瓶不能得到存活的空肠弯曲杆菌细胞。相对照的是，由不含椰子胚乳纤维的烧瓶得到的空肠弯曲杆菌细胞约为每 ml 10^8 个细胞。在下表中示出了 6 次独立实验的结果，且在随后的图表中列出了数据：

添加和不添加椰子胚乳纤维的条件下，从犬大肠模型所得到的存活空肠弯曲杆菌细胞数 ($\log^{10}$)。

< - - - - 空肠弯曲杆菌的 $\log^{10}$ 结肠形成单位 - - - >

粪便 试样 (狗 No)	0 小时 < + 0.7 %	0 小时 椰子 无	24 小时 胚乳 + 0.7 %	24 小时 纤维 无 >
1	7.76	7.75	0	7.25
2	7.33	7.64	0	8.56
3	7.77	7.75	0	7.17
4	7.72	7.74	0	7.47
5	7.67	7.71	0	8.59
6	7.16	7.38	0	8.97
平均	7.57	7.66	0	8
STD	0.26	0.14	0	0.79

图 2 表示了在大肠模型中加入椰子胚乳纤维对空肠弯曲杆菌存活的影响。字母表示统计显著性差异。

对各只狗在体系中添加椰子胚乳纤维和从中省略的情况下培养 24 小时后记录的 pH 值。

狗 No.	+0.7%椰子胚乳纤维	无椰子胚乳纤维
1	6.75	7.5
2	6.25	7.5
3	6.75	7.5
4	6.25	7.5
5	6.25	7.5
6	6.25	7.5

在培养阶段结束时，测量在各瓶中的溶液的 pH，发现当从体系中省去椰子胚乳纤维时，pH 为 7.5（SD 为 0）。当在该模型中包含椰子胚乳纤维时，发现 pH 为 6.42（SD 为 0.26）。

结论

在犬大肠模型中包含椰子胚乳纤维导致消除了存活的空间弯曲杆菌细胞。在所述体系不添加椰子胚乳纤维的情况下，在实验期间空间弯曲杆菌细胞的存活性没有表现出损失。由于对弯曲杆菌来说，6.5 至 7.5 的 pH 范围是最佳的，观察到的两种条件下的 pH 的差别不太可能是导致观察到的存活率差别的原因。相反，可能的是，存在于粪便中的非致病、糖分解细菌使椰子胚乳纤维发生代谢。空间弯曲杆菌不能够发酵碳水化合物，因而存在的椰子胚乳纤维给非致病、糖分解细菌提供了益处。

实施例 7

在这项研究中，对在饲喂含有椰子胚乳纤维源的饮食和标准（无纤维）饮食后结肠的炎性状况进行了对比。

方法

该试验涉及代表若干品种的 7 只狗。在饲喂和测量阶段使狗单独居住。该试验交叉进行。给狗饲喂维持体重所需量的单独饮食（ $125 \times BW^{0.75}$ ），在 4 周的所有时间均可自由饮用水，其中进行一周的冲洗

(washout)。试验饮食是全价营养湿形物，其由烘箱成形的罐装于水中的肉块状物组成。椰子胚乳纤维的含量为 7.2(w/w)。所有其它配方组分均按比例减少以添加呈干椰子肉压饼形态的椰子胚乳纤维。冲洗饮食(washout diet)是全价和平衡饮食。

活组织检查试样培养

从中部结肠 (mid-colon)取三个活组织检查试样，转移至组织培养介质 (RPMI+gentomycin)中并称重。将活组织检查试样在新鲜介质中洗涤 30 分钟，并转移至新鲜的含有 1ml 介质的 24 孔的多孔板中，在 37°C 及 5% 的 CO₂ 下培养 24 小时。然后在 13000rpm 下将活组织检查试样离心 (spun down) 5 分钟，并将上清液转移至新鲜的 eppendorf 管中，在 -20°C 下冷冻至直到需用时。将 0.5ml 1% 的 triton 裂解缓冲剂 (20mM Tris Ph7.5, 20mM NaCl₂, 1% triton×100) 添加到活组织检查试样中，并放置最少 1 小时。然后将所述试样进行简短的匀浆，使用 Sigma Microprotein-PR™ 试剂盒来测量总蛋白质含量。发现活组织检查试样总蛋白质与活组织检查试样湿重明显相关，并用来使廿烷类产量相对于活组织检查试样尺寸标准化。

廿烷类产量的测量

通过酶免疫测定法 (EIA) 来测量由中部结肠活组织检查试样所产生的 PGE₂ 的量。将 1 份上清液试样稀释于 10 份新鲜介质中。由 R&D 体系获得 PGE₂ EIA 试验，并如提供的规程表 (protocol sheets) 所述进行。简言之，将 100μl 试样和 PGE₂ 标样添加到 96 孔的微量培养板中，所述培养板预先涂覆山羊抗鼠/兔 (anti-mouse/rabbit) 多克隆抗体。添加 50μl 结合到碱性磷酸酯酶上的 PGE₂ 和 50μl 对 PGE₂ 的鼠多克隆抗体。所述板在室温下在设置在 500±50rpm 的水平轨道平板振荡器上培养 2 小时。在培养后对所述板进行洗涤，并添加 200μl pNPP 底物。在经一小时的培养后，添加 50μl 的终止溶液 (磷酸三钠)，使用设置在 450nm 波长下的微量培养板读数器立即测定各孔的光密度。从标准曲线来计算每 mg 活组织检查试样蛋白质的廿烷类浓度。

结果

结肠活组织检查试样的廿烷类产量。

当给狗饲喂含有椰子胚乳纤维的饮食时，活组织检查试样产生的 PGE_2 明显少于给狗饲喂标准饮食的值 ($P=0.08$)。结果列于下表和图 3 中，其中示出了结肠活组织检查试样的平均 PGE_2 产量。

结肠活组织检查试样的 PGE_2 产量	
饮食 (纤维源)	PGE_2 产量 (ng/mg 蛋白质)
标准 (无纤维)	242.3 ± 182.1 (a)
椰子胚乳纤维	105.4 ± 55.5 (b)
相同字母表示无显著差异 ($p < 0.1$)	

附录 1 - 粪便质量

· 使用 17 点打分等级来评价所有通便情况，由此将粪便以四分之一等级的增量在级别 1 至级别 5 之间打分。

· 如粪便判断为不满或接近半个等级，则将其打分为四分之一等级。二分之一等级在以下划分。

· 使用 9 点打分等级来评价所有通便情况，由此将粪便以二分之一等级的增量在级别 1 至级别 5 之间打分。二分之一等级划分如下：

级别 5 - 水性腹泻

级别 4.5 - 有一些稠性区域的腹泻

级别 4 - 大部分，即使不是全部，失去其形态，稠度不良，粘性

级别 3.5 - 很湿，但仍具有一些确定的形态

级别 3 - 湿、开始失去其形态，当提起时留下明确的痕迹

级别 2.5 - 有良好的形态，表面略湿，留有痕迹，接触时粘附

级别 2 - 有良好的形态，不留痕迹，“可踢动(kickable)”

级别 1.5 - 硬且干燥

级别 1 - 硬、干燥且易碎，“似子弹”

· 以下是表明“理想”和“不可接受”粪便质量范围的打分等级的实例：

不可接受 (或不良粪便质量) (U) = 低于 1.5 和大于 3.5 (不

包括端值)

理想(I) = 介于 1.5 和 2.5 之间 (包括端值)

· 计算由各只狗所产生的平均粪便分数, 然后通过对各只狗的平均粪便分数进行平均来确定对于试验整体的总平均值。

附录 2

Englyst 和 Cummings(Supra)的 Englyst 方法。

实验

装置

在如前所述的 50 - 60ml 螺旋帽玻璃离心管中进行分级 (fractionation) 步骤。用装有火焰电离检测器的 Pye Unicam Series 204 色谱仪来进行气液色谱分析。使用装填有涂覆了 3% SP2330 的 Supelcoport(100-200 目) 的 2.1m × 2mm i. d. 玻璃柱。柱温为 215°C (等温), 进样器和检测器温度为 250°C。载气 (氮) 流量为 20ml 分⁻¹。

试剂

所有分析均使用高纯经过检验的试剂。酶制品如下: 猪胰α-淀粉酶, E. C. 3. 2. 1. 1 (Sigma, Cat. No. A4268); 支链淀粉酶, E. C. 3. 2. 1. 41 (Boehringer, Cat. No. 108944)。

方法

在所述方法中的步骤顺序列于图 1 中。

试样预处理

尽可能在不进行任何预处理的条件下对食品进行分析。如获得代表性试样有困难, 则可将低水分含量的食品进行 2-3 分钟的球磨处理, 而具有高水分含量的则进行均化, 或冷冻干燥和球磨处理。

试样质量(Mass)

准确称量 50 至 1000mg 的试样, 含有不超过 150mg 淀粉和 50mg 的 NSP, 加入到 50 - 60ml 的螺旋帽离心管中并添加搅拌磁子。

脂肪提取和干燥

含干物质 90 至 100% 和含少于 203% 脂肪的试样可直接进行分

析。另外，添加 40ml 丙酮，使用磁力搅拌器混合 30 分钟，离心并通过抽吸在不干扰残余物的情况下除去尽可能多的上清液。将所述管置于在磁力搅拌器热板上的 65°C 水浴中，并混合残余物数分钟直到其看起来是干燥的。可盖住烧杯，并通过水泵来除去丙酮蒸气。

淀粉的分散

添加 2ml 的 DMSO，给所述管盖帽并在沸水浴中加热 1 小时，从开始再沸腾时计时，连续搅拌。然后，在不经冷却的条件下，在 50°C 下，添加 8ml pH 为 5.2 的 0.1M 乙酸钠缓冲液，并立即进行涡流混合。

50 - 200mg 试样

添加 2ml 的 DMSO

在 100°C 下加热 1 小时

添加 pH 为 5.2 的 8ml 缓冲液，和 0.1ml 酶溶液

在 45°C 下培养 16 小时

添加 40ml 的 EtOH

放置 1 小时，离心

用 85% EtOH 洗涤两次，干燥残余物

添加 1ml 的 12M H_2SO_4

在 35°C 下放置 1 小时

添加 11ml 的 H_2O

在 $100^{\circ}C$ 下放置 2 小时

添加 2ml 的内标物

-----13ml 至糖醛酸

1ml

添加 0.2ml 的 12M NH_3 , $5\mu l$ 的辛-2-醇和 0.1ml 的 $NaBH_4$ 溶液

在 $40^{\circ}C$ 下放置 1 小时

添加 0.1ml 的乙酸

向 0.2ml 中添加 0.3ml 的 Nmetlm 和 2ml 的乙酸酐

在 $20^{\circ}C$ 下放置 10 分钟

添加 5ml 的 H_2O , 1ml 的 CH_2Cl_2 , 并进行涡流搅拌

使用 1-2 μl 的下部相(lower phase)来用于 GLC

非淀粉多糖(NSP)的分析方法

淀粉的酶水解

冷却所述管至 $45^{\circ}C$, 立即添加 0.1ml 的每 ml pH 为 5.2 的乙酸盐缓冲液含有 5000 单位 α -淀粉酶和 5 单位支链淀粉酶的酶溶液。在 $45^{\circ}C$ 下培养所述试样 16-18 小时, 优选如前所述连续混合。

在酶处理之后, 添加 40ml 的绝对乙醇, 良好混合, 并在室温下放置 1 小时。离心 10 分钟或者直到得到澄清的上清液。在不干扰残余物

的情况下，通过抽吸除去尽可能多的上清液，并将其舍弃。通过混合形成悬浮液来用 50ml 85% 的乙醇洗涤残余物两次，离心直到清彻，并如前述除去上清液。向洗涤过的残余物中添加 40ml 的丙酮，搅拌 5 分钟，然后离心。通过抽吸除去上清液，并如在“脂肪提取和干燥”部分所述对残余物进行干燥。

酶消化残余物的酸水解

使用涡流搅拌器，将干燥过的残余物分散在 1ml 的 12M 硫酸中。在 35°C 下放置 1 小时以溶解纤维素，然后快速添加 11ml 的水并进行混合。

将所述溶液在沸水浴中加热自再沸腾起始 2 小时，连续搅拌。通过将所述管置于水中来将其冷却至室温，添加 2ml 的内标物（每 ml 饱和苯甲酸溶液 2mg 阿洛糖）并混合管中的内容物。使用 1ml 水解物来制备乙酸多羟糖醇，保存其余物来用于测定糖醛酸。

糖醛酸

所使用的方法是 Scott 方法的变体。将 0.3ml 水解物（如必要，进行稀释，使得其每 ml 含有 25 至 100 μ g 糖醛酸）与 0.3ml 的氯化钠-硼酸溶液混合物（通过向 100ml 水中添加 2g 氯化钠和 3g 硼酸来制备）进行混合。添加 5ml 浓硫酸，并进行涡流混合，然后将所述管置于 70°C 下的加热块(heating block)中。将所述管和内容物放置 40 分钟，然后通过放入水中来将其冷却至室温。当冷却时，添加 0.2ml 的 3, 5-二甲基苯酚溶液（0.1g 的 $(\text{CH}_3)_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{OH}$ 在 100ml 冰醋酸中），并立即混合。在 10 至 15 分钟后，在分光光度计中读取在 400 和 450nm 下相对于水作参照试样的吸光率。对各试样从 450nm 的读数中减去在 400nm 下的读数，并用所得差绘制葡萄糖醛酸标准曲线（范围为 25 - 125 μ f ml⁻¹）。从该图线中读取试样浓度。

乙酸多羟糖醇酯的制备

向 1ml 的水解物中添加 0.2ml 的 12M 氨溶液和 5 μ l 辛-2-醇。测试该溶液为碱性，然后添加 0.1ml 的新制备的在每 ml 3M 氨溶液中的 100mg 四氢硼酸钠（III）（氢硼化钠）的溶液。混合，并将所

述混合物在 40°C 下放置 1 小时, 添加 0.1ml 的冰醋酸。接着, 向 0.2ml 的该酸化溶液中添加 0.3ml 的 N-甲基咪唑和 2ml 的乙酸酐, 并进行混合。将其在 20°C (室温) 下放置 10 分钟, 添加 5ml 的水, 混合, 冷却时添加 1ml 的二氯甲烷, 在涡流搅拌器上剧烈搅拌内容物, 并离心数分钟以将所述混合物分为两相。通过抽吸除去大部分顶层相, 并舍弃, 然后将底层相转移至小的管瓶中, 密封并将其在 -20°C 下贮存。使用 1-2 μ l 用于进样到色谱仪中。

乙酸多羟糖醇酯的另一种制备方法

当使用二氯甲烷作为乙酸多羟糖醇酯的溶剂时, 在无自动 GLC 进样器的一些实验室中观察到, 对于获得可再现的结果来说, 进样技术是关键。如用乙酸乙酯来替代二氯甲烷作为乙酸多羟糖醇酯的溶剂, 则可获得更稳定的方法。所述步骤如下:

向 1ml 的水解物中添加 0.2ml 的 12M 氨溶液和 5 μ l 辛-2-醇。测试该溶液为碱性, 然后添加 0.1ml 的新制备的在每 ml 3M 氨溶液中的 100mg 四氢硼酸钠 (III) 的溶液。混合, 并将所述混合物在 40°C 下放置 1 小时, 添加 0.1ml 的冰醋酸。接着, 向 0.5ml 的该酸化溶液中添加 0.5ml 的 N-甲基咪唑和 5ml 的乙酸酐, 并进行混合。将其在 20°C (室温) 下放置 10 分钟, 然后添加 0.6ml 的乙醇并混合。在 5 分钟后添加 5ml 的水, 置于室温水浴中, 添加 5ml 的 7.5M KOH, 并在数分钟后再添加 5ml 的 7.5M KOH。通过翻转来进行混合, 并放置以分成两相。将顶层相转移至小的管瓶中, 并将在 +5°C 下贮存。使用 1-2 μ l 用于进样到色谱仪中。

其它实施方案

应理解, 虽然已结合其详细说明对本发明进行了叙述, 但前述的说明是说明性的而非限制本发明的范围。在以下给出的权利要求书的范围内, 还存在本发明的其它方面、优点、和改变。

说明书附图

图1

含有干椰子肉压饼的两种产物的对比

各种饮食的平均粪便分数对比。

相同字母表示无显著差异

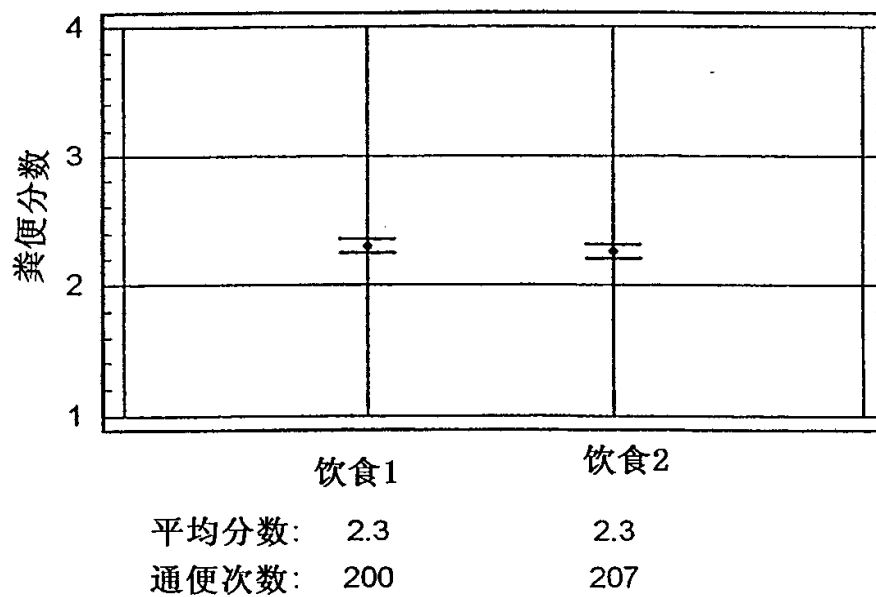
(ANOVA, $p > 0.05$)

图2

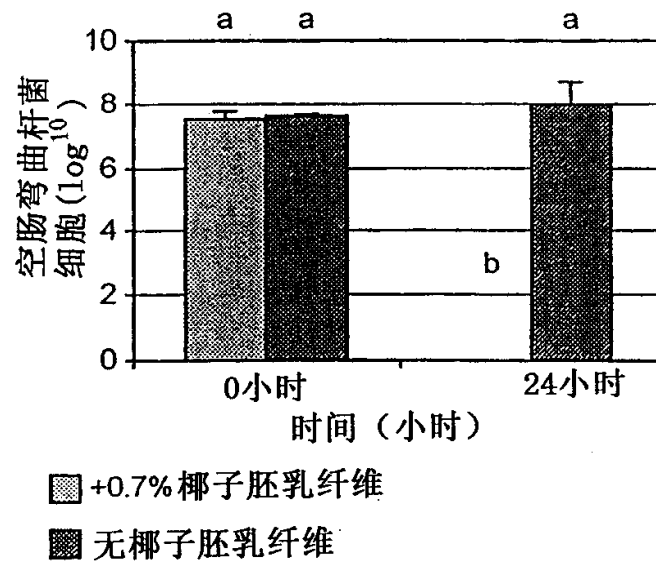


图3

结肠活组织检查试样的平均PGE₂产量

平均和95.0%LSD间隔

