



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106999523 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201580064171.3

(22)申请日 2015.11.27

(30)优先权数据

702454 2014.11.28 NZ

706405 2015.03.27 NZ

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/NZ2015/050200 2015.11.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/085356 EN 2016.06.02

(71)申请人 安娜哲尼知识产权有限公司

地址 新西兰下哈特镇

(72)发明人 朱丽叶·安塞尔

保罗·布拉奇福特

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 36/185(2006.01)

A61P 1/00(2006.01)

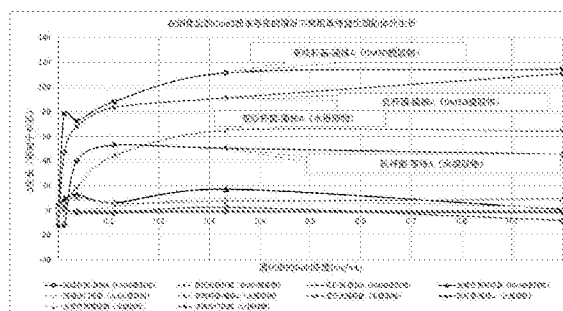
权利要求书5页 说明书60页 附图9页

(54)发明名称

黄金奇异果组合物及其制备和使用方法

(57)摘要

本公开涵盖由奇异果制备的组合物。具体地讲,本发明涵盖由Actinidia chinensis黄金奇异果品种制备的组合物。还涵盖制备这些组合物的方法。还涵盖使用这些组合物的方法,具体地讲,用于治疗或预防胃肠系统紊乱,包括:炎症、便秘、肠道不规律性、微生物群不平衡、肠易激综合征和炎症肠疾病等。



1. 一种制备奇异果组合物的方法,包括:
 - a) 获得Gold3品种或其遗传衍生物的黄金奇异果;
 - b) 去除所述奇异果的果皮,并且制成筛分粒度小于1mm的果泥;以及
 - c) 干燥所述果泥并制成粉末。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括在制成所述果泥之前去除所述奇异果的种子。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述方法还包括将所述果泥干燥24至56小时。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述方法还包括将所述奇异果制成果泥,以获得Brix (白利糖度) 值为16°至21°的果泥。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述方法还包括将所述奇异果制成果泥,以获得在20℃下Brix值为12.5°时测得的粘度为11.0至13.0或者10.0至14.0的果泥。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述方法还包括冻干所述果泥并研磨,以制成所述粉末。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述方法还包括富集所述组合物的多酚。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述方法还包括向所述组合物中加入多酚。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述方法还包括将所述果泥冻干40至56小时。
10. 一种包含Gold3黄金奇异果粉末的组合物,其中所述组合物通过权利要求1至9中任一项所述的方法制备。
11. 根据权利要求10所述的组合物,其中将所述组合物配制成用于经肠施用。
12. 根据权利要求10所述的组合物,其中将所述组合物配制成用于经口施用。
13. 根据权利要求10所述的组合物,其中将所述组合物配制成片剂或胶囊。
14. 根据权利要求13所述的组合物,其中所述胶囊是凝胶胶囊。
15. 根据权利要求13或14所述的组合物,其中将所述片剂或胶囊配制成包含400至800mg所述粉末。
16. 根据权利要求13或14所述的组合物,其中将所述片剂或胶囊配制成包含100至1000mg所述粉末。
17. 根据权利要求10至12中任一项所述的组合物,其中将所述组合物配制成液体。
18. 根据权利要求17所述的组合物,其中将所述液体配制成每个剂量单位包含400至800mg所述粉末。
19. 根据权利要求10至12中任一项所述的组合物,其中将所述组合物配制成果冻或小袋。
20. 根据权利要求10至19中任一项所述的组合物,其中将所述组合物与另外的消化助剂组合配制。
21. 根据权利要求10至19中任一项所述的组合物,其中将所述组合物与一种或多种益生元、益生菌或合生素组合物组合配制。
22. 根据权利要求10至21中任一项所述的组合物,其中将所述组合物与纤维和/或消化

酶组合配制。

23. 根据权利要求10至22中任一项所述的组合物,其中将所述组合物补充多酚。

24. 一种治疗或预防便秘或者维持或改善肠道规律性的方法,包括:

向受试者施用由干燥黄金奇异果制备的组合物,其中所述干燥黄金奇异果是Gold3奇异果或其遗传衍生物,从而治疗或预防所述受试者的便秘或者维持或改善所述受试者的肠道规律性。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中将所述组合物经肠、经口或直肠施用。

26. 根据权利要求24或25所述的方法,其中将所述组合物作为片剂、胶囊、液体、果冻或小袋中的一种或多种施用。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述胶囊是凝胶胶囊。

28. 根据权利要求24至27中任一项所述的方法,其中将所述组合物以每天2000至4000mg粉末的剂量或其液体当量施用。

29. 根据权利要求24至27中任一项所述的方法,其中将所述组合物以每天250至2500mg粉末的剂量或其液体当量施用。

30. 根据权利要求24至29中任一项所述的方法,其中将所述组合物与另外的消化助剂共同施用。

31. 根据权利要求24至29中任一项所述的方法,其中将所述组合物与一种或多种益生菌、益生元或合生素组合物共同施用。

32. 根据权利要求24至31中任一项所述的方法,其中将所述组合物与纤维和/或消化酶共同施用。

33. 根据权利要求24至32中任一项所述的方法,其中将所述组合物补充多酚。

34. 一种治疗或预防消化道中的微生物群不平衡的方法,包括:

向受试者施用由干燥黄金奇异果制备的组合物,其中所述干燥黄金奇异果是Gold3奇异果或其遗传衍生物,从而治疗或预防所述受试者的所述微生物群不平衡。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中将所述组合物经肠、经口或直肠施用。

36. 根据权利要求34或35所述的方法,其中将所述组合物作为片剂、胶囊、液体、果冻或小袋中的一种或多种施用。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述胶囊是凝胶胶囊。

38. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中将所述组合物以每天2000至4000mg粉末的剂量或其液体当量施用。

39. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中将所述组合物以每天250至2500mg粉末的剂量或其液体当量施用。

40. 根据权利要求34至39中任一项所述的方法,其中将所述组合物与另外的消化助剂共同施用。

41. 根据权利要求34至39中任一项所述的方法,其中将所述组合物与一种或多种益生菌、益生元或合生素组合物共同施用。

42. 根据权利要求34至41中任一项所述的方法,其中将所述组合物与纤维和/或消化酶共同施用。

43. 根据权利要求34至42中任一项所述的方法,其中将所述组合物补充多酚。

44. 一种维持或增加消化道中的有益细菌的方法,包括:

向受试者施用由干燥黄金奇异果制备的组合物,其中所述干燥黄金奇异果是Gold3奇异果或其遗传衍生物,从而增加所述受试者的所述消化道中的有益细菌。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中将所述组合物经肠、经口或直肠施用。

46. 根据权利要求44或45所述的方法,其中将所述组合物作为片剂、胶囊、液体、果冻或小袋中的一种或多种施用。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述胶囊是凝胶胶囊。

48. 根据权利要求44至47中任一项所述的方法,其中将所述组合物以每天2000至4000mg粉末的剂量或其液体当量施用。

49. 根据权利要求44至47中任一项所述的方法,其中将所述组合物以每天250至2500mg粉末的剂量或其液体当量施用。

50. 根据权利要求44至49中任一项所述的方法,其中将所述组合物与另外的消化助剂共同施用。

51. 根据权利要求44至49中任一项所述的方法,其中将所述组合物与一种或多种益生菌、益生元或合生素组合物共同施用。

52. 根据权利要求44至51中任一项所述的方法,其中将所述组合物与纤维和/或消化酶共同施用。

53. 根据权利要求44至52中任一项所述的方法,其中将所述组合物补充多酚。

54. 根据权利要求44至53中任一项所述的方法,其中所述有益细菌选自:拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属 (*Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*) 类群、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 物种、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 物种和毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*) 类群。

55. 根据权利要求44至53中任一项所述的方法,其中所述有益细菌选自:普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*)、球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)、脆弱拟杆菌 (*Bacteriodes fragilis*)、多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*)、卵形拟杆菌 (*Bacteroides ovatus*)、解纤维素拟杆菌 (*Bacteroides cellulosilyticus*)、肠道罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia intestinalis*)、食葡糖罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia inulinovorans*)、布氏瘤胃球菌 (*Ruminococcus bromii*) 和生黄瘤胃球菌 (*Ruminococcus flavefaciens*)。

56. 一种维持或增加消化道中的普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*) 的方法,包括:

向受试者施用由干燥黄金奇异果制备的组合物,其中所述干燥黄金奇异果是Gold3奇异果或其遗传衍生物,从而维持或增加所述受试者的所述消化道中的所述普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*)。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中将所述组合物经肠、经口或直肠施用。

58. 根据权利要求56或57所述的方法,其中将所述组合物作为片剂、胶囊、液体、果冻或小袋中的一种或多种施用。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中所述胶囊是凝胶胶囊。

60. 根据权利要求56至59中任一项所述的方法,其中将所述组合物以每天2000至4000mg粉末的剂量或其液体当量施用。

61. 根据权利要求56至59中任一项所述的方法, 其中将所述组合物以每天250至2500mg粉末的剂量或其液体当量施用。

62. 根据权利要求56至61中任一项所述的方法, 其中将所述组合物与另外的消化助剂共同施用。

63. 根据权利要求56至61中任一项所述的方法, 其中将所述组合物与一种或多种益生菌、益生元或合生素组合物共同施用。

64. 根据权利要求56至63中任一项所述的方法, 其中将所述组合物与纤维和/或消化酶共同施用。

65. 根据权利要求56至64中任一项所述的方法, 其中将所述组合物补充多酚。

66. 根据权利要求56至65中任一项所述的方法, 其中所述受试者具有一种或多种炎症症状。

67. 根据权利要求56至65中任一项所述的方法, 其中所述受试者具有以下症状中的一种或多种: 克罗恩病、溃疡性结肠炎、肠易激综合征、炎性肠疾病、胃肠癌、过敏症、特应性或糖尿病。

68. 一种治疗或预防肠易激综合征或炎性肠疾病的方法, 包括:

向受试者施用由干燥黄金奇异果制备的组合物, 其中所述干燥黄金奇异果是Gold3奇异果或其遗传衍生物, 从而治疗或预防所述受试者的所述肠易激综合征或所述炎性肠疾病。

69. 根据权利要求68所述的方法, 其中将所述组合物经肠、经口或直肠施用。

70. 根据权利要求68或69所述的方法, 其中将所述组合物作为片剂、胶囊、液体、果冻或小袋中的一种或多种施用。

71. 根据权利要求70所述的方法, 其中所述胶囊是凝胶胶囊。

72. 根据权利要求68至71中任一项所述的方法, 其中将所述组合物以每天2000至4000mg粉末的剂量或其液体当量施用。

73. 根据权利要求68至72中任一项所述的方法, 其中将所述组合物以每天250至2500mg粉末的剂量或其液体当量施用。

74. 根据权利要求68至73中任一项所述的方法, 其中将所述组合物与另外的消化助剂共同施用。

75. 根据权利要求68至73中任一项所述的方法, 其中将所述组合物与一种或多种益生菌、益生元或合生素组合物共同施用。

76. 根据权利要求68至75中任一项所述的方法, 其中将所述组合物与纤维和/或消化酶共同施用。

77. 根据权利要求68至76中任一项所述的方法, 其中将所述组合物补充多酚。

78. 由干燥黄金奇异果制备的组合物的用途, 其中所述干燥黄金奇异果是Gold3奇异果或其遗传衍生物, 用来制备药物用于:

(i) 治疗或预防受试者的便秘或者维持或改善受试者的肠道规律性;

(ii) 治疗或预防受试者的微生物群不平衡;

(iii) 维持或增加受试者消化道中的有益细菌;

(iv) 维持或增加受试者消化道中的普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*); 或者

(v) 治疗或预防受试者的肠易激综合征或炎性肠疾病。

黄金奇异果组合物及其制备和使用方法

相关申请

[0001] 本申请要求2014年11月28日提交的新西兰专利申请号702454和2015年3月27日提交的新西兰专利申请号706405的权益,这两项专利申请的全部内容以引用方式并入本文。

技术领域

[0002] 本公开涉及由黄金奇异果*Actinidia chinensis*制备的组合物。还涉及制备此类组合物的方法,以及使用此类组合物的方法,包括治疗或预防胃肠系统紊乱的方法。

背景技术

[0003] 胃肠道寄居着大约 10^{14} 个微生物细胞,它们由1000个以上的种类或种系型组成,其中大部分定殖于结肠(Rajilic-Stojanovic和de Vosm,2014年;Qin等人,2010年;Egert等人,2006年)。大肠是代谢活跃的发酵部位,特点是存在对人类健康不可或缺的多且复杂的微生物关系(Backhed等人,2005年)。相关实验数据揭示了结肠微生物群及其人类宿主以微妙的平衡状态存在所达到的程度。相关研究已证实,微生物群与各种各样的健康益处相关,包括改善免疫功能和成熟、改变行为、调节饱腹感、抑制病原体、增强矿物质吸收以及维持能量平衡(Geurts等人,2014年;Parnell和Reimer,2012年;Bravo等人,2011年;Buffie和Pamer,2013年)。

[0004] 已在一项研究中利用小鼠和斑马鱼说明了这种宿主-微生物群的相互依存性,该研究将小鼠和斑马鱼各自的天然微生物群移植到另一物种的无菌代表体内。研究发现,移植后的微生物群组成会恢复到近似于天然宿主的微生物群组成(Rawls等人,2006年)。因饮食、遗传因素、年龄、应激或生物异源物质造成的微生物群落组成失衡可引发微生态失调状态,由此可对疾病更敏感的微生物群起到促进作用。食用某些类型的饮食组分对结肠微生物群落有着重大影响,通常在食用后24小时内便可观察到变化(Wu等人,2011年;Parkar等人,2012年)。

[0005] 在人类胃肠道中,普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)是数量最多的菌种之一,通常观察到其总比例占健康成人的结肠微生物群的5%以上(Miquel等人,2013年)。普拉梭菌属于厚壁菌门,是人类大肠中的共生细菌,已证实其具有体内抗炎特性(Sokol等人,2009年;Furet等人,2010年)。低水平的普拉梭菌时常与一系列肠道紊乱相关,包括肠易激综合征(IBS)、特应性、糖尿病和炎症肠疾病(IBD),诸如克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)(Sokol等人,2009年;Furet等人,2010年;Rajilic-Stojanovic等人,2011年;Candela等人,2012年;Willing等人,2010年)。这些观察结果的一致性表明,普拉梭菌浓度匮乏并不是期望的结果,因此任何可选择性地刺激普拉梭菌增殖的治疗都可能都是有价值的。

[0006] 普拉梭菌推动健康促进作用的机制归因于丁酸盐产生和抗炎作用。Sokol及同事开展的一项小鼠研究发现,普拉梭菌或普拉梭菌上清液减轻了化学诱导性结肠炎的严重程度,促进了抗炎细胞因子的合成,并且减少了促炎细胞因子的产生,由此表明抗炎作用由分泌的代谢物介导(Sokol等人,2008年)。另外,普拉梭菌因碳水化合物发酵而生成了大量丁

酸盐以及一些乳酸盐和甲酸盐 (Duncan等人, 2002年; Duncan等人, 2004年)。

[0007] 便秘是能显著影响个体生活质量的常见病症, 其对生活质量的损害程度可与严重慢性病症诸如糖尿病和骨关节炎相提并论。据估计, 世界人口中高达20%患有便秘, 其中女性及65岁以上的个体是最常累及的人群 (Attaluri等人, 2011年; Udani&Bloom, 2013年)。便秘引起的并发症包括肛裂、直肠脱垂和粪块嵌塞。如果用力排便, 可能会引起痔疮。在便秘后期, 腹部可能变得肿胀、出现硬结且大范围出现压痛。严重病例可表现出肠梗阻的症状, 例如呕吐和腹部疼痛, 以及大便失禁 (大便失禁是指小肠中的软便绕过结肠中的嵌塞粪块)。

[0008] 众所周知, 消化道中的微生物群平衡失调可改变肠动力, 从而导致便秘 (Husebye等人, 2001年; Rhee等人, 2001年)。另外, 患有慢性肠便秘的患者出现微生物群失衡, 特点是有益细菌相对减少, 而潜在致病细菌和真菌增加 (Khalif等人, 2005年)。此类患者表现出大肠杆菌 (*E.coli*)、金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*) 和肠道菌的计数显著增加 (Khalif等人, 2005年)。

[0009] 此外, 慢性便秘的疾病进展较长, 从而导致非期望微生物得分较高, 以及期望微生物得分较低 (Khalif等人, 2005年)。在一项对确诊为慢性便秘的儿童开展的研究中, 在粪便中发现肠道微生态失调, 其中梭菌 (*Clostridium*)、拟杆菌 (*Bacteroides*) 和大肠杆菌的计数显著增加 (Zoppi等人, 1998年)。一项特定研究发现, 便秘个体粪便中的双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 和乳杆菌 (*Lactobacillus*) 菌株的计数显著减少, 其中双歧杆菌属的减少量高达十倍 (Chassard等人, 2012年)。

[0010] 用于便秘的干预措施仍然存在一定困难和挑战性, 许多个体对当前的疗法和药物并不满意。这些措施包括生活方式和饮食调整, 诸如增加水果和蔬菜的食用、补充纤维 (甲基纤维素; 魔芋葡甘聚糖、洋车前子)、增加液体摄入并加强锻炼, 以及用大便软化剂、刺激性泻药和容积性泻药进行药物干预 (Attaluri等人, 2011年; Leung等人, 2011年; Liu, 2011年)。

[0011] 日常使用泻药是禁忌的, 因为患者可能对这些药物的使用产生依赖性。可使用灌肠剂来提供一种机械刺激形式。另一方面, 灌肠剂通常仅对直肠中的粪便起作用, 而不会对肠道中的粪便起作用。目前市面上出现了越来越多宣称有助于通便的中草药产品和其他天然产品 (包括芦荟和大黄 (Udani和Bloom, 2013年))。然而, 有关这些产品在缓解便秘方面的功效和成效还尚待考证。

[0012] 相比之下, 纤维在消化中发挥重要作用是众所周知的, 可溶性纤维可吸水从而有助于延缓消化, 不溶性纤维可增加粪便体积从而有助于通便。酶也对消化有帮助, 其将较大的饮食化合物分解成较小的易处理碎段。例如, 淀粉酶将淀粉分解成单糖, 蛋白酶将蛋白质分解成氨基酸。然而, 单独补充纤维和酶对于慢传输型便秘 (粪便通过结肠的传输延迟) 和排便紊乱在很大程度上是无效的。另外, 这种补充可能具有不必要的副作用, 诸如产生过量气体和腹胀难受。

[0013] 研究人员强调了绿色奇异果 (例如, *Actinidia deliciosa* 的变种海沃德 (Hayward)) 是消化领域的有效产品, 现已有多项研究证明了其功效 (Stonehouse等人, 2012年)。目前一致认为的是, 绿色奇异果的通便作用似乎主要是由于其含有膳食纤维和奇异果酵素 (酶) (Chang等人, 2010年; Rush等人, 2002年; Stonehouse等人, 2012年; Drummond和Gearry, 2013年)。

[0014] 相比之下, 传统上认为黄金奇异果 (例如, *Actinidia chinensis* 的变种霍特16A

(Hort16A))与通便并不相关(Ferguson,2003年;Rush,2002年)。人们发现,与绿色奇异果相比,黄金奇异果具有很少或不具有奇异果酵素含量,并且膳食纤维也较少。人们对Hort16A品种的奇异果在免疫方面的作用进行了研究(Hunter等人,2012年;Skinner,2012年),认为黄金奇异果具有降低或较小的泻药作用,使其成为天然增强免疫力的理想选择,尤其是在可能不希望增强通便的儿童中(Adaim,2010年)。

[0015] 鉴于人群中经常会发生胃肠紊乱,因而需要新的组合物,尤其是来源于天然来源的组合物,用于恢复和维持消化系统健康。

发明内容

[0016] 一方面,本发明包括一种制备奇异果组合物的方法,该方法包括:

- a) 获得Gold3品种或其遗传衍生物的黄金奇异果;
- b) 去除奇异果的果皮,并且制成筛分粒度小于1mm的果泥;以及
- c) 干燥果泥并制成粉末。

[0017] 在各个方面:

[0018] 该方法还包括在制成果泥之前去除奇异果的种子。

[0019] 该方法还包括将奇异果制成果泥,以获得Brix(白利糖度)值为16°至21°的果泥。

[0020] 该方法还包括将奇异果制成果泥,以获得在20℃下Brix值为12.5°时测得的粘度为11.0至13.0或者10.0至14.0的果泥。

[0021] 该方法还包括冻干果泥并研磨,以制成粉末。

[0022] 该方法还包括富集组合物的多酚。

[0023] 该方法还包括向组合物中加入多酚。

[0024] 该方法还包括将果泥干燥24至56小时。

[0025] 该方法还包括将果泥冻干40至56小时。

[0026] 在另一方面,本发明包括由干燥的黄金奇异果制备的组合物,其中干燥的黄金奇异果为Gold3奇异果或其遗传衍生物。粉末可通过前述方面中任一项的方法制成。

[0027] 在各个方面:

[0028] 将组合物配制成用于经肠施用。

[0029] 将组合物配制成用于经口施用。

[0030] 将组合物配制成片剂或胶囊。

[0031] 胶囊是凝胶胶囊。

[0032] 将片剂或胶囊配制成包含400至800mg粉末。

[0033] 或者,将胶囊配制成包含100至1000mg粉末。

[0034] 将组合物配制成液体。

[0035] 将液体配制成每个剂量单位包含400至800mg粉末。

[0036] 将组合物配制成果冻或小袋。

[0037] 将组合物与另外的消化助剂组合配制。

[0038] 将组合物与一种或多种益生元、益生菌或合生素组合物组合配制。

[0039] 将组合物与纤维和/或消化酶组合配制。

[0040] 将组合物补充多酚。

[0041] 在另一方面,本发明包括一种治疗或预防便秘或者维持或改善肠道规律性的方法,该方法包括:

向受试者施用前述方面中任一项的组合物,从而治疗或预防受试者的便秘或者维持或改善受试者的肠道规律性。

[0042] 在各个方面:

[0043] 将组合物经肠施用。

[0044] 将组合物经口或直肠施用。

[0045] 将组合物作为片剂、胶囊或液体施用。

[0046] 将组合物作为果冻或小袋施用。

[0047] 胶囊是凝胶胶囊。

[0048] 将组合物以每天2000至4000mg粉末的剂量或其液体当量施用。

[0049] 或者,剂量为每天250至2500mg粉末或其液体当量。

[0050] 将组合物与另外的消化助剂共同施用。

[0051] 将组合物与一种或多种益生菌、益生元或合生素组合物共同施用。

[0052] 将组合物与纤维和/或消化酶共同施用。

[0053] 将组合物补充多酚。

[0054] 在另一方面,本发明包括一种治疗或预防消化道中的微生物群不平衡的方法,该方法包括:

向受试者施用前述方面中任一项的组合物,从而治疗或预防受试者的微生物群不平衡。

[0055] 在各个方面:

[0056] 将组合物经肠施用。

[0057] 将组合物经口或直肠施用。

[0058] 将组合物作为片剂、胶囊或液体施用。

[0059] 将组合物作为果冻或小袋施用。

[0060] 胶囊是凝胶胶囊。

[0061] 将组合物以每天2000至4000mg粉末的剂量或其液体当量施用。

[0062] 或者,剂量为每天250至2500mg粉末或其液体当量。

[0063] 将组合物与另外的消化助剂共同施用。

[0064] 将组合物与一种或多种益生菌、益生元或合生素组合物共同施用。

[0065] 将组合物与纤维和/或消化酶共同施用。

[0066] 将组合物补充多酚。

[0067] 在另一方面,本发明包括一种维持或增加消化道中的有益细菌的方法,该方法包括:

向受试者施用前述方面中任一项的组合物,从而维持或增加受试者消化道中的有益细菌。

[0068] 在各个方面:

[0069] 将组合物经肠施用。

[0070] 将组合物经口或直肠施用。

[0071] 将组合物作为片剂、胶囊或液体施用。

[0072] 将组合物作为果冻或小袋施用。

[0073] 胶囊是凝胶胶囊。

- [0074] 将组合物以每天2000至4000mg粉末的剂量或其液体当量施用。
- [0075] 或者,剂量为每天250至2500mg粉末或其液体当量。
- [0076] 将组合物与另外的消化助剂共同施用。
- [0077] 将组合物与一种或多种益生菌、益生元或合生素组合物共同施用。
- [0078] 将组合物与纤维和/或消化酶共同施用。
- [0079] 将组合物补充多酚。
- [0080] 有益细菌选自:拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属(*Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)物种、乳杆菌属(*Lactobacillus*)物种和毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)类群。
- [0081] 有益细菌选自:普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)、球形梭菌(*Clostridium coccoides*)、脆弱拟杆菌(*Bacteriodes fragilis*)、多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)、卵形拟杆菌(*Bacteroides ovatus*)、解纤维素拟杆菌(*Bacteroides cellulosilyticus*)、肠道罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia intestinalis*)、食葡萄糖罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia inulinovorans*)、布氏瘤胃球菌(*Ruminococcus bromii*)和生黄瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)。
- [0082] 在另一方面,本发明包括一种维持或增加消化道中的普拉梭菌的方法,该方法包括:
- [0083] 向受试者施用前述方面中任一项的组合物,从而维持或增加受试者消化道中的普拉梭菌。
- [0084] 在各个方面:
- [0085] 将组合物经肠、经口或直肠施用。
- [0086] 将组合物作为片剂、胶囊、液体、果冻或小袋中的一种或多种施用。
- [0087] 胶囊是凝胶胶囊。
- [0088] 将组合物以每天2000至4000mg粉末的剂量或其液体当量施用。
- [0089] 将组合物以每天250至2500mg粉末的剂量或其液体当量施用。
- [0090] 将组合物与另外的消化助剂共同施用。
- [0091] 将组合物与一种或多种益生菌、益生元或合生素组合物共同施用。
- [0092] 将组合物与纤维和/或消化酶共同施用。
- [0093] 将组合物补充多酚。
- [0094] 受试者有一种或多种炎症症状。
- [0095] 受试者有以下症状中的一种或多种:克罗恩病、溃疡性结肠炎、肠易激综合征、炎性肠疾病、胃肠癌、过敏症、特应性或糖尿病。
- [0096] 在另一方面,本发明包括一种治疗或预防肠易激综合征或炎性肠疾病的方法,该方法包括:
- [0097] 向受试者施用前述方面中任一项的组合物,从而治疗或预防受试者的肠易激综合征或炎性肠疾病。
- [0098] 在各个方面:
- [0099] 将组合物经肠、经口或直肠施用。
- [0100] 将组合物作为片剂、胶囊、液体、果冻或小袋中的一种或多种施用。
- [0101] 胶囊是凝胶胶囊。

- [0102] 将组合物以每天2000至4000mg粉末的剂量或其液体当量施用。
- [0103] 将组合物以每天250至2500mg粉末的剂量或其液体当量施用。
- [0104] 将组合物与另外的消化助剂共同施用。
- [0105] 将组合物与一种或多种益生菌、益生元或合生素组合物共同施用。
- [0106] 将组合物与纤维和/或消化酶共同施用。
- [0107] 将组合物补充多酚。
- [0108] 在另一方面,本发明包括使用前述方面中任一项的组合物,用来制备药物用于:
- (i) 治疗或预防受试者的便秘或者维持或改善受试者的肠道规律性;
 - (ii) 治疗或预防受试者的微生物群不平衡;
 - (iii) 维持或增加受试者消化道中的有益细菌;
 - (iv) 维持或增加受试者消化道中的普拉梭菌;或者
 - (v) 治疗或预防受试者的肠易激综合征或炎性肠疾病。
- [0109] 前述发明内容广泛地描述了本发明某些实施方案的特征和技术优点。在以下的本发明具体实施方式和实施例中将描述另外的技术优点。
- [0110] 当结合任何附图和实施例考虑时,根据本发明的具体实施方式,将更好地理解被认为是本发明特点的新颖特征。但是,本文提供的附图和实施例旨在帮助说明本发明或协助形成对本发明的理解,并非旨在限制本发明的范围。

附图说明

- [0111] 图1:消化前和消化后的绿色 (Hayward) 奇异果粉末和黄金 (Gold3) 奇异果粉末的多酚含量。
- [0112] 图2:暴露于水分和消化的黄金 (Gold3) 奇异果粉末的DMSO提取物时细菌菌株的生长变化。
- [0113] 图3:在体外使用混合发酵模型研究黄金 (Gold3) 奇异果粉末对短链脂肪酸的产生的影响。
- [0114] 图4:试验处理、洗脱和抽样点的示意图。
- [0115] 图5A:用GOLD (Gold3) 处理后功能性便秘参与者的消化健康指数的改善情况。
- [0116] 图5B:用GOLD (Gold3) 处理后功能性便秘参与者的普拉梭菌丰度的净差。
- [0117] 图5C:示出用GOLD (Gold3) 处理后功能性便秘参与者的普拉梭菌水平的净差的定量PCR数据(对数转换)。
- [0118] 图6:展示在健康组的每个处理周期之前和之后细菌群体和平均值标准误差(SEM)的LightCycler®480qPCR数据,其中将细菌群体表示为在每克粪便样品中所计算的16S rRNA基因的平均拷贝数(顶行为对数转换,底行为自然数据),将平均值标准误差(SEM)表示为误差条。
- [0119] 图7:展示在功能性便秘组的每个处理周期之前和之后细菌群体和平均值标准误差(SEM)的LightCycler®480qPCR数据,其中将细菌群体表示为在每克粪便样品中所计算的16S rRNA基因的平均拷贝数(顶行为对数转换,底行为自然数据)。

具体实施方式

[0120] 以下描述阐述了许多示例性配置、参数等。但是应当认识到,这种描述不旨在作为对本发明的范围的限制,而是作为对示例性实施方案的描述而提供。

[0121] 本说明书中引用的所有参考文献,包括专利和专利申请据此以引用方式并入。并非承认任何参考文献构成现有技术。对任何参考文献的论述也并非承认该参考文献在新西兰或任何其他国家形成本领域公知常识的一部分。

定义

[0122] 在本文的每个实例中,在本发明的描述、实施方案和实施例中,术语“包含”、“包括”等应被非限制性地扩展解读。因此,除非上下文另有明确要求,否则在整个说明书和权利要求书中,词语“含有”、“包含”等应被解释为具有包容性意义而不是排他性意义,也就是说,是“包括但不限于”的意思。

[0123] “肠道规律性”是指例如每天或每周定期排便。虽然规律性因人而异,但预期的排便次数可在每周至少四次至每天至少一次的范围内。“改善”规律性是指每周增加至少一次排便。

[0124] 术语“肠道不规律性”是指排便的规律性受到破坏。这可能是指例如两次排便之间的时间增加,或者每天或每周的预期排便次数减少。例如,每周减少至少一次排便可能表示肠道不规律性。

[0125] 本文所用的“便秘”是指具有便秘的一种或多种症状,例如以下症状中的一种或多种:排便过程中用力;粪便硬结或成块;有肛门直肠梗阻或阻塞的感觉;有排泄不完全的感觉;进行手动操作以帮助排便;或者一周内排便三次或更少。

[0126] “膳食助剂”是帮助消化系统消化或其他方面的组合物,例如可溶性纤维和不溶性纤维、消化酶、益生菌、益生元和合生素。作为消化助剂,包括以下组合物中的一种或多种:洋车前子、甲基纤维素、葡甘露聚糖、镁、亚麻籽、小麦草、生姜、芦荟(例如,费拉(vera)芦荟汁)和大黄。

[0127] “消化酶”是有助于胃肠系统功能的酶。包括奇异果酵素、淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、乳糖酶、麦芽糖酶、蔗糖酶和纤维素酶。

[0128] “消化道”和“肠道”是指人类和其他动物的消化系统(即胃肠系统)。其包括食管、胃、小肠(包括十二指肠、空肠和回肠)、大肠(包括盲肠、升结肠、横结肠、降结肠和乙状结肠)和直肠。“肠”是肠道的同义词。

[0129] 消化道的“紊乱”包括影响消化系统(即胃肠系统)的疾病或其他病症,可能是急性或慢性病症,诸如炎症、便秘、肠道不规律性、微生物群不平衡(例如,有益生物的水平降低、有益生物的比例改变和/或有害生物的水平增加)。具体的紊乱包括炎性肠疾病和肠易激综合征。本文详细地描述了其他紊乱。

[0130] “Gold3”是指黄金奇异果的具体品种,也被称为“Zesy002”,并且以 ZESPRI® SUNGOLD 奇异果在市场上销售。2009年6月25日以申请号KIWO42申请了Gold3的新西兰植物品种权。Gold3黄金奇异果的植物学名称是 *Actinidia chinensis* Planch.

[0131] 黄金奇异果品种(例如,Gold3品种)的“遗传衍生物”是指从黄金奇异果亲本原种获得的后代、变种或其他栽培品种。其包括从与黄金奇异果亲本的遗传杂交中获得的后代,例如F1子代或F2子代。术语“遗传衍生物”可指衍生的植株、本身或其果实。

[0132] “炎症”是指具有以下一种或多种特点的病症:血管扩张、发热、发红、疼痛、肿胀、水肿、损伤、裂隙、溃疡、白细胞外渗和功能丧失。包括急性形式的炎症和慢性形式的炎症,

慢性形式的炎症包括炎性紊乱,例如自身免疫性疾病。具体地讲,包括炎性肠疾病。其他炎性紊乱在本文件的其他地方描述。

[0133] 如本文所述,术语“冻干”和“冷冻干燥”同义使用。应当理解,术语“冷冻干燥”/“冻干”不排除使用较高温度(即高于冷冻温度)。例如,在冻干/冷冻干燥工序的二次干燥阶段中,可使用较高温度除去残留水分。

[0134] 本文所用的“微生物群”是指生活在人类和其他动物的消化道中的微生物群体。同义术语是“微生物群落”和“微生物组”。

[0135] “微生物群不平衡”(也被称为“微生态失调”)是这样一种病症:消化系统中有益生物的数量减少,有益生物的一种或多种比例改变,并且/或者消化系统有害生物的数量增加。有益生物可包括例如产生乳酸的细菌和产生丁酸盐的细菌。具体的有益生物包括但不限于双歧杆菌菌株、拟杆菌菌株(诸如脆弱拟杆菌);也包括粪便细菌,诸如来自柔嫩梭菌(*Clostridium Zeptum*)系统发育群的有益细菌,包括普拉梭菌。还包括球形梭菌、多形拟杆菌、卵形拟杆菌、解纤维素拟杆菌、肠道罗斯拜瑞氏菌、食葡萄糖罗斯拜瑞氏菌、布氏瘤胃球菌和生黄瘤胃球菌。也包括来自拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属、毛螺菌科和乳杆菌属(*Lactobacilli*)类群的有益生物。作为非限制性示例,有害生物可包括葡萄球菌(*Staphylococcus*)和沙门氏菌(*Salmonella*)菌株,以及肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、巴斯德氏菌科(*Pasteurellaceae*)、韦荣球菌科(*Veillonellaceae*)和梭杆菌科(*Fusobacteriaceae*)的成员。

[0136] “益生元”是增加消化系统中有益生物的数量和/或活性的组合物。通常,益生元包括可发酵组分,并且在胃肠微生物群中的有益细菌群体中产生积极变化(例如,改善水平、活性或比例)。其包括例如产生乳酸的细菌和/或产生丁酸盐的细菌。有益生物的具体示例包括双歧杆菌菌株和栖粪杆菌(*Faecalibacterium*)菌株(包括普拉梭菌),也包括拟杆菌菌株(诸如脆弱拟杆菌)。还包括球形梭菌、多形拟杆菌、卵形拟杆菌、解纤维素拟杆菌、肠道罗斯拜瑞氏菌、食葡萄糖罗斯拜瑞氏菌、布氏瘤胃球菌和生黄瘤胃球菌。也包括拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属、毛螺菌科和乳杆菌属类群,以及本文所述的其他生物。

[0137] “益生菌”是包含一种或多种定殖于消化系统(包括结肠)中的有益生物的组合物,例如产生乳酸的细菌和/或产生丁酸盐的细菌。具体的有益生物包括双歧杆菌属菌株和栖粪杆菌属菌株(包括普拉梭菌),也包括拟杆菌科菌株(诸如脆弱拟杆菌),以及本文所述的其他生物。

[0138] “合生素”是结合一种或多种益生元剂和一种或多种益生菌生物的组合物。

[0139] 如本文所用,“受试者”可以是人类或非人类动物,尤其是哺乳动物,包括牛、绵羊、山羊、猪、马和其他家畜,包括狗、猫和其他驯养宠物。

[0140] 本文所用的“治疗”是指减少、减轻或消除紊乱,例如胃肠紊乱,诸如胃肠系统的疾病或其他病症。治疗将导致减少、减轻或消除一种或多种紊乱症状。

[0141] 本文所用的“预防”是指阻止或延迟紊乱(例如胃肠紊乱,诸如胃肠系统的疾病或其他病症)的发作。预防措施将导致一种或多种紊乱症状停止或延迟,或者如果发生症状,则将导致症状减轻。

黄金奇异果及相关的生物活性

[0142] Gold3是由Zespri®研发的新品种黄金奇异果,已发现这一品种对丁香假单胞菌奇

异果致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv *actinidiae*) (Psa; 细菌奇异果藤蔓病) 具有耐受性, 并且在新西兰正在替代 Hort16A 品种作为新的商业黄金品种选择。Gold3 品种的奇异果的营养组成与其前身相似, 奇异果酵素和膳食纤维含量都少于绿色奇异果 (表1)。

表1: 整个奇异果的营养含量

2009 年 10 月收获的样品的平均营养特性 ¹				
组分	单位	黄金奇异果 (<i>Actinidia chinensis</i>)		绿色奇异果 (<i>Actinidia deliciosa</i>)
		Gold3	Hort16A	Hayward
维生素 C	mg/100g	133	92	89
维生素 E	IU/100g	1.4	2.1	1.4
可溶性膳食纤维	g/100g	2.1	2.2	3.6
不溶性膳食纤维	g/100g	<1	1.1	2.1
β -胡萝卜素	mg/100g	0.016	0.025	0.023
α -胡萝卜素	mg/100g	<0.005	<0.005	<0.005
总糖	g/100g	12.7	12.4	9.5
叶酸	mg/100g	21.4	24.6	29.9
草酸	针晶体/g	585	1267	965
奇异果酵素	FU/100g	88	3.4	334
氮	mg/100g	164	148	135
磷	mg/100g	25.3	23.8	26.8
钾	mg/100g	327.5	305	335
钙	mg/100g	23	31.8	35.3
镁	mg/100g	12.7	15.4	15.3
硫	mg/100g	15.2	15.3	14.8
铁	mg/100g	0.265	0.267	0.323
硼	mg/100g	0.333	0.385	0.33
铜	mg/100g	0.106	0.131	0.095
锰	mg/100g	0.055	0.087	0.139
锌	mg/100g	0.073	0.106	0.104
钠	mg/100g	<1	1.78	1.61

¹ Zespri® 2010 新品种信息指南。

[0143] 鉴于黄金奇异果品种含有较低水平的纤维和奇异果酵素, 而这两种组分被认为是产生绿色奇异果的通便作用的主要原因, 因此预期黄金奇异果源性产品会比绿色海沃德奇异果源性产品具有较小的通便作用。

[0144] 本发明人惊讶地发现, 在健康个体中, Gold3 奇异果源性粉末 (GOLD) 在改善通便方面达到了与绿色 Hayward 奇异果源性粉末 (ACTAZIN™) 相同的程度 (参见本文下面的实施例 5 和实施例 6)。这些结果表明, 存在于 Gold3 粉末中的其他奇异果生物活性组分可能比当前公约规定的组分对所观察到的通便作用具有更大的影响。因此, 该组合物可用于维持或改善肠道规律性和/或治疗或预防便秘。

[0145] 虽然不希望受理论束缚, 但是猜想多酚可能是黄金奇异果品种中的关键活性成分, 尤其是在 Gold3 品种的奇异果中。猜想所观察到的通便效果可能是由于果实中存在纤

维、酶、益生元碳水化合物和多酚的组合。

[0146] 多酚是植物中天然存在的化合物,其特征是存在一个或多个苯酚单元。人们认为,多酚的至少一些健康益处是通过以下过程产生的:多酚促进有益细菌生长,这些细菌将多酚转化成其他生物活性化合物,这些化合物被吸收到血液中并且在肠道和体内其他地方发挥作用(Seeram,2014年;Cardona等人,2013年)。

[0147] 据估计,多酚总摄入量的90%至95%积聚在结肠中,酚类物质在结肠中经由肠道微生物代谢为低分子量代谢物。这些代谢物是可吸收的,并且可能是产生所观察到的多酚健康影响的原因(Cardona等人,2013年)。

[0148] 根据本文所示的结果,本发明人认为,黄金奇异果品种(例如,Gold3或其衍生物)的多酚可能具有益生元的作用。本领域研究人员将益生元描述为“导致胃肠微生物群的组成和/或活性发生特定变化从而赋予宿主健康益处的选择性发酵成分”(Gibson等人,2010年)。

[0149] 值得注意的是,黄金奇异果比绿色奇异果具有更高的多酚水平(参见例如Drummond,2013年;还可参见本文的表5)。此外,本发明人进行的体外研究表明,与消化前相比,消化后(模拟上消化道消化)的Gold3黄金奇异果粉末的多酚分布发生了改变(参见实施例2),但总体酚含量保持不变。虽然绿色奇异果粉末在消化后多酚分布也发生了改变,但消化作用降低了总体含量(参见实施例2)。

[0150] 本发明人由此得出结论:存在于Gold3黄金奇异果粉末中的多酚在胃中幸免于消化,优于绿色奇异果粉末中的多酚。这意味着来自黄金奇异果(诸如,Gold3品种的奇异果)的多酚可生物转化成不同的酚类。

[0151] 不希望受理论束缚,人们认为Gold3黄金奇异果具有独特的分布:富含绿原酸、E-咖啡酰-3-葡萄糖苷、根皮苷、原花青素B2和槲皮素。认为这些酚类保持“未消化”,进而转移到结肠中,在结肠中经由肠道微生物群代谢为代谢物(酚衍生物)。这些衍生物随后可被吸收并且继续在其他代谢途径中相互作用,进而提供健康益处,包括促进通便。

[0152] 已知苯丙烷途径可产生植物中发现的大多数酚类化合物。苯丙烷类可控制植物的修复、生长和防御系统(免疫系统)及其与有益微生物和有益捕食者(营养系统)的相互作用。因此,Gold3品种中的酚类化合物可能是产生植物抗虫性以及本文所公开的Gold3源性粉末的消化益处的原因。

[0153] 本发明人还发现,Gold3黄金奇异果粉末含有耐消化组分,已知这些组分具有益生元性质(参见实施例4)。这些组分有助于调节肠道微生物群并刺激代谢物(诸如短链脂肪酸(SCFA;参见实施例4))的产生,所产生的代谢物是提供各种健康益处的原因。

[0154] 另外,本发明人发现,Gold3黄金奇异果粉末可影响肠道微生物群的生长模式,从而刺激有益细菌相对于有害细菌增加(参见实施例3)。值得注意的是,本发明人还观察到,在用Gold3黄金奇异果粉末处理的便秘患者的粪便样品中,普拉梭菌的相对丰度显著增加(实施例7和实施例8)。通过定量PCR分析证实了这种有益细菌(包括普拉梭菌)的增加(实施例9和实施例10)。

[0155] 这是一个重要的发现,因为,普拉梭菌浓度匮乏与胃肠紊乱有关,尤其与胃肠道的炎症病症有关。应当注意,普拉梭菌的水平降低尤其与肠易激综合征(IBS)和炎性肠疾病(IBD)以及其他健康状况有关。参见,例如Sokol等人,2008年;Sartor,2011年。还可进一步参见下文。

[0156] 因此,显而易见的是,Gold3黄金奇异果及其遗传衍生物可用于组合物中,用于:治

疗或预防便秘,维持或改善肠道规律性,治疗或预防微生物群不平衡,维持或增加消化道中的有益细菌,维持或增加消化道中的普拉梭菌,以及/或者治疗或预防肠易激综合征或炎症性肠疾病。本文详细地描述了组合物的其他用途。

制备奇异果组合物的方法

[0157] 本发明整体涉及一种由黄金奇异果制备的组合物。在一个具体方面,组合物由 *Actinidia chinensis* 制备。优选地,使用Gold3(也被称为G3)品种的黄金奇异果。在其他方面,可使用来自黄金奇异果品种的一种或多种遗传衍生物。例如,可能需要使用包括黄金奇异果品种的亲本原种在内的遗传交叉中的F1子代或F2子代。或者,可使用从亲本获得的任何变种或其他栽培品种。

[0158] 组合物可以粉末形式(例如,冻干粉末)或任何其他合适的剂型制备。在某些方面,可能需要将粉末配制成片剂(包括速溶片剂)或胶囊(包括缓释胶囊)。片剂可以是刻痕剂、咀嚼片、泡腾片、口腔崩解片或用于形成悬浮液的片剂。胶囊可以是凝胶胶囊,包括通过单片凝胶封装和两片凝胶封装制成的凝胶胶囊。还包括非明胶胶囊以及囊片。粉末可以自由流动形式或作为固体块提供。组合物可作为用于形成悬浮液的粉末、用于形成溶液的粉末、散装口服颗粒或散装口服粉末提供。或者,可将组合物配制成滋补剂、酏剂、药糖剂、浓缩物、糖浆、溶液、悬浮液、乳剂、顿服剂、果泥、糊剂或滴剂。在其他方面,可将组合物配制成凝胶或果冻。组合物可以小袋形式提供,例如以粉末小袋或者凝胶或果冻小袋提供。也包括含有薄条的制剂,或胶囊中含有固体以与食物或饮料混合的制剂。其他配制物也是可能的,如下文所述。

[0159] 本发明的组合物可由从一种或多种商业来源获得的黄金奇异果果泥制备。优选地,去除黄金奇异果果泥的种子和果皮。还优选的是,制备筛分粒度为约1mm或更小的果泥。进一步优选的是,果泥的粘度(在20℃下Brix值为12.5°时测得)为约12.0;或者可在10.0至14.0、或11.0至13.0、或11.75至12.25、或11.8至12.2、或11.9至12.1的范围内;或者可为约11.0、约11.25、约11.7、约11.8、约11.9、约12.1、约12.2、约12.3或约12.5。

[0160] 果泥的pH可在3.2至3.8、或3.0至4.0、或3.1至3.9的范围内;或者可为约3.1、约3.2、约3.3、约3.4、约3.5、约3.6、约3.7、约3.8、约3.9或约4.0。在某些情况下,可能需要调节果泥的pH或最终组合物的pH,以接近生理水平。具体地讲,可能有用的是获得6.0至8.0、或6.5至7.5、或6.8至7.2范围内的pH;或者约6.5、约6.7、约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4或约7.5的pH。

[0161] 在某些方面,本发明的组合物可通过新西兰专利No.235972(据此以引用方式并入)中提到的“软制浆”技术来制备,该技术可适用于制备浆状的黄金奇异果果汁。

[0162] 在初始准备阶段,可使黄金奇异果经历预处理过程,可包括奇异果的成熟、检验、分级和/或分选这些熟知的步骤。就成熟而言,优选的是在制备本发明的组合物时使用熟的或成熟的黄金奇异果;但优选地避免腐烂的或腐蚀的材料。

[0163] 可使用本领域中广为人知且常用的方法来评估成熟度。可在采摘或加工黄金奇异果之前测量成熟度。具体地讲,可使用Brix系统测量成熟度。糖水平在16°至21°Brix、或14°至23°Brix、或15°至22°Brix范围内,或者为约14°、约15°、约16°、约17°、约18°、约19°、约20°、约21°、约22°或约23°Brix的黄金奇异果可表示成熟。

[0164] Brix水平超过该值的黄金奇异果可能过度成熟或发酵,并且可能不会产生理想的组合物。Brix低于理想值的奇异果可在使用前进行人工催熟。储存时间可能足以实现熟化。

例如,约5°Brix下采摘的黄金奇异果在0℃下冷藏4至6周可升至10°Brix以上。从冷藏中取出后,这种果实将成熟,达到12°Brix或更高。在成熟期间也会发生其他化学变化,使得奇异果在理想的成熟范围内,以提供最佳产品。

[0165] 作为加工的一部分,可将黄金奇异果灭菌。可使果实通过具有一个或多个辊刷的组件,用于去除任何附着的异物。然后可采用常规的洗涤技术。例如,可使用一系列喷嘴来洗涤奇异果。根据当地法规和要求,可采用洗涤添加剂来帮助清洁或减少奇异果上的细菌数量。例如,果实可用氯洗涤液和/或臭氧浸渍的水洗涤液来洗涤,然后用清水冲洗。

[0166] 然后将灭菌后的黄金奇异果输送到料斗中。料斗可呈锥形以形成漏斗,用于将奇异果逐一引导到切割组件中。切割组件可包括切割装置,诸如水激光器或类似物,其优点在于可防止损坏种子,因此果实的种子不会污染果肉。其他合适的切割装置包括旋转圆形刀片、往复式刀片、流体射流切割装置、摆动刀片等。

[0167] 切割装置可例如沿着黄金奇异果的长度大致将其切割成两半。或者,切割装置可用能够破坏奇异果果皮的软破碎装置来代替。优选地,该过程不会对奇异果造成明显的细胞损伤。例如,可将黄金奇异果引导到辊之间,使得奇异果的果皮被破坏。具体地讲,可通过使奇异果穿过朝向彼此偏置的间隔辊,来使果实爆裂。这种方法可用来挤压果实,使果皮裂开。爆裂的奇异果基本上保持完整,但容易分离成大碎片。可采用其他爆裂方法。

[0168] 切割之后,可使黄金奇异果碎片穿过被设计用于从果肉中分离果皮的压制组件。压制组件可适用于执行制浆或粉碎过程。与常规果实制浆技术相比,这种方法可相对轻柔 and 温和(“软制浆”)。利用软制浆,果实细胞或组分不会产生明显的分解或裂解。优选地,这种方法仅破碎少量(通常小于5%至10%)的种子。软制浆过程不包括化学和/或酶裂解方法、热技术、用于分解细胞的技术以及涉及过度磨碎果实材料的机械技术。

[0169] 在一个实施方案中,压制组件通过在双会聚带压制件之间按压奇异果碎片,来执行黄金奇异果的软制浆。压制带可以是围绕一系列滑轮旋转的多个环。分隔压制带的距离可在奇异果的行进方向上减小。通过这种方式,当奇异果沿着压制组件的长度行进时,施加到奇异果上力可增大。这样可在不明显损坏种子的情况下产生奇异果的碎浆,继而防止了种子污染果肉。

[0170] 从压制组件中产生的果肉可用于筛选过程,以从果肉中分离种子。具体地讲,可使用软机械筛选技术来从种子中分离果肉。例如,可使用打浆机。打浆机包括旋转柔性叶轮,叶轮在具有预定尺寸的孔的锥形筛网内旋转。在具体方面,将孔的尺寸选择为允许奇异果的果肉和果汁穿过筛网,同时将大部分(若非全部)种子保留在由筛网限定的内部空腔内。

[0171] 在某些方面,可能优选的是使用来自黄金奇异果的糊剂而不是果泥。可将奇异果糊剂制成浓缩物。例如,可将果实加热数小时,对其施加应力并使其减少成浓稠形式。去除果皮之后,或在制浆或制泥过程之后,可对果实进行加热。可逐渐加热果实,然后在适当的温度下一边混合一边保持加热。增稠之后,可将糊剂分散在平板上,或者转移到包装(例如,袋、管、罐、瓶或其他容器)中。可在无菌条件下转移糊剂,使其适于人类食用。优选地,奇异果糊剂由成熟的黄金奇异果制备。优选地,糊剂由浆状果实制备。糊剂可以是平滑的制备物,并且可包含约40°Brix、或30°至50°Brix、或35°至45°Brix、或者约35°、约36°、约37°、约38°、约39°、约41°、约42°、约43°、约44°或约45°Brix的浓缩物。

[0172] 然后可通过冷冻步骤加工果肉(例如,呈糊剂或果泥形式)。这一步骤可在干燥步

骤之后进行,也可与干燥步骤同时进行。在替代实施方案中,将果肉干燥并加工成粉末,而不执行中间的冷冻步骤。例如,可使用涉及滚筒干燥的方法。在滚筒干燥过程中,可在相对低的温度下,在用于制备滚筒干燥产品片材的旋转大容量滚筒上干燥果泥或糊剂。在某些方面,可使用添加剂来加速或以其他方式促进干燥过程。例如,可利用豌豆淀粉或其他干燥助剂。然后将干燥的产品研磨成成品薄片或粉末的形式。有利地,滚筒干燥技术可用于制备保留其关键组分(例如,酚类化合物)的干燥组合物,并且可使用液体轻松重构。例如,可将滚筒干燥产品制成冷水溶性的。作为另外的替代形式,可使用带式干燥或对流干燥。这些干燥方法是本领域广为人知且常用的方法。

[0173] 如果使用冷冻,则优选的是在制备果肉之后尽快冷冻果肉,以保持新鲜度。但根据需要,可在24或48小时内进行冷冻。冷冻方法是众所周知的,因此无需要在本文中进行详细描述。鼓风冷冻用于本发明是特别优选的。可在标准尺寸的托盘(pale)中冷冻果肉,托盘用于在加工之后收集新鲜果肉。可将果肉冷冻储存(例如,在-18℃下),直到需要用其来制备组合物。

[0174] 可将冷冻的果肉冷冻干燥,即冻干。冷冻干燥技术是广为人知且常用的。冷冻干燥周期可为约48小时;或者在40至56小时、或12至36小时、或36至60小时的范围;或者为约40小时、约42小时、约44小时、约46小时、约48小时、约50小时、约52小时或约54小时。可使用较长的冷冻干燥周期,例如至少48小时(“温和冷冻干燥”),以保持最大的活性。在具体方面,可执行该过程以避免水形成,并且在加工期间使水分含量最少。

[0175] 可能需要使用具体的冻干方法来获得干燥的产物。例如,可将冻干干燥程序用作自动干燥系统的一部分。冻干过程可包括多个干燥步骤,例如逐步增加温度和降低温度。优选地,初级干燥设置用于升华,随后是一个或多个次级干燥设置,用于除去残留水分。在具体方面,冻干过程的最高温度不超过70℃。在其他方面,冻干过程的温度介于-10℃至70℃之间的范围内。在另一方面,采用长达48小时的冻干。

[0176] 然后可将得到的干燥产物研磨成粉末,然后可在适当的时候使用该粉末。研磨方法是本领域众所周知且广泛使用的。可使用标准筛孔尺寸来制备粉末,例如可使用US 20、US 23、US 30、US 35、US 40、US 45或US 50的筛孔尺寸。用于粉末的筛分粒度可在1.0至0.3mm、或0.84mm至0.4mm、或0.71mm至0.5mm的范围内;或可为约1.0mm、约0.84mm、约0.71mm、约0.59mm、约0.5mm、约0.47mm、约0.465mm、约0.437mm、约0.4mm、约0.355mm或约0.3mm。

[0177] 为了确保奇异果成分的最小降解,制备过程可在低于40℃的温度下进行。在各种实施方案中,该过程在-4℃至40℃、或-1℃至10℃、或1℃至6℃范围内的温度下进行;或在大约0℃、大约1℃、大约2℃、大约3℃、大约4℃、大约5℃或大约6℃的温度下进行。可在整个制备过程中(包括在整个果实的储存中、在破碎果实之前以及在制浆/制泥过程中)保持这些温度。为了获得最佳结果,至少从已将果实时便开始保持这些温度。使用这些温度可避免果实氧化和避免使用还原剂。在某些情况下,有可能需要获得有机认证。

[0178] 优选地执行该加工方法,以防止对黄金奇异果中的活性物质造成任何损坏或影响或者至少使损坏或影响最小。为了确保最佳的生产方法,可监测所得组合物的活性,例如监测多酚含量。可预期该组合物含有至少以下多酚化合物:绿原酸、E-咖啡酰-3-葡萄糖苷、新绿原酸、根皮苷、原花青素B2和槲皮素鼠李糖苷。多酚化合物也可以是儿茶素、表儿茶素、E-咖啡酰-4-葡萄糖苷和槲皮素芸香糖苷。这些多酚的水平在下文中描述。多酚的测定是本领域众所周知的,也在下文中描述。具体地讲,可以测定没食子酸当量(GAE)来确定总多酚含

量。例如,可使用福林-酚(Folin-Ciocalteu)法(利用福林-酚试剂,也被称为福林酚(Folin's phenol)试剂或福林-丹尼斯(Folin-Denis)试剂)在体外对酚类化合物进行比色测定(Singleton 等人,1999年)。

[0179] 另选地或除此之外,可测试组合物刺激有益生物(例如,乳杆菌和/或双歧杆菌)的生长,或测试短链脂肪酸(例如,乙酸盐、丁酸盐和/或丙酸盐)的增长水平。这些生长水平和有机酸水平在下文中描述。相应的测定法是广为人知的,并且在本文中进行了详细描述。优选地,例如,如通过体外消化所测定的,就刺激细菌生长和有机酸水平所述的活性以及所述的多酚含量在消化组合物后仍然存在。在具体方面,可使用本发明人在本文中所述的体外消化测定法。其他体外测定法是本领域已知且常用的(参见例如,Kaur等人,2010年)。

[0180] 在一些情况下,可以使用黄金奇异果原种(例如,Gold3原种)的遗传衍生物来获得本发明的组合物。预期从这种衍生物获得的组合物将具有与从黄金奇异果原种获得的组合物相同的一个或多个特点。示例性特征包括:多酚水平和多酚分布、奇异果酵素水平、纤维水平、维生素水平、刺激有益生物的生长和提高有机酸水平,如上文详细所描述和公开。

[0181] 就果实本身而言,预期从遗传衍生物获得的奇异果将与黄金奇异果亲本具有类似的组成。例如,果实的维生素C含量可为每100g果实中100至150mg、或90至200mg、或80至220mg;或者为约80mg、约90mg、约100mg、约115mg、约130mg、约140mg、约150mg、约160mg、约170mg或约180mg。果实的奇异果酵素含量可为每100g果实中60至110FU、或70至100FU、或80至90FU;或者为约60FU、约70FU、约80FU、约90FU、约100FU、约110FU或约120FU。果实的总多酚含量可为每100g果实中250至450mg GAE、或200至800mg GAE、或300至600mg GAE、或270至430mg GAE、或280至420mg GAE、或290至410mg GAE、或300至400mg GAE、或310至390mg GAE、或320至380mg GAE。

包含黄金奇异果的组合物

[0182] 本发明人发现,Gold3黄金奇异果粉末包含可用于维持消化系统的健康以及治疗和预防消化问题和/或胃肠紊乱的有益成分。本发明人表明,Gold3黄金奇异果粉末对于改善肠道规律性特别有效。Gold3粉末对刺激有益细菌相对于有害细菌的生长也是有效的,尤其是增加普拉梭菌。

[0183] 因此,本发明的黄金奇异果组合物可用于支持或改善总体肠道健康以及/或者治疗或预防消化道的各种疾病或其他病症,包括炎症、便秘、微生物群不平衡、肠易激综合征和炎性肠疾病。另外,该组合物可用于维持或改善肠道规律性,以及维持或增加消化道中的有益细菌,包括普拉梭菌。

[0184] 可将黄金奇异果粉末制成胶囊、制成片剂,或者将其加入或掺入其他产品中。具体包括缓释配制物、延释配制物以及快速崩解配制物。具体地讲,包括凝胶胶囊以及小袋和咀嚼片。另外还包括组合配制物,其包括本发明的粉末与其他有益试剂(例如,一种或多种益生菌、益生元、合生素或其他消化助剂)混合。在替代实施方案中,可将粉末重构为液体,例如用于经口施用的浓缩物、糖浆、悬浮液或滋补剂,或者用于直肠施用的灌肠剂或灌肠组合物。还包括直肠栓剂。

[0185] 在优选方面,将所得的干燥黄金奇异果粉末制成胶囊,并且每个胶囊含有大约500mg或大约600mg的干燥粉末;或者50至650mg、或150至850mg、或200至800mg、或300至700mg、或550至750mg范围内的干燥粉末;或者大约50mg、大约100mg、大约150mg、大约

200mg、大约250mg、大约300mg、大约350mg、大约400mg、大约450mg、大约500mg、大约550mg、大约575mg、大约590mg、大约610mg、大约625mg、大约650mg、大约675mg、大约700mg、大约750mg、大约800mg或大约850mg的干燥粉末。

[0186] 在某些情况下,可能需要从黄金奇异果中分离或富集多酚。具体地讲,可能是有利的是使用黄金奇异果来获得富含多酚的组合物、酚类浓缩物或包含所分离酚类的组合物。例如,本发明的组合物可富含多酚,使得多酚的浓度相对于黄金奇异果的其他组分(例如,纤维、糖和/或蛋白质)有所增加。在具体方面,本发明的组合物可包含从黄金奇异果的其他组分中分离出(例如,纯化)的多酚。

[0187] 富集和提取多酚的方法在本领域中是广为人知的(参见例如Sun-Waterhouse等人,2009年;Eidenberger等人,2014年)。优选地,与不执行多酚富集或分离步骤制备的组合物相比,所得的组合物具有至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍或至少10倍的多酚量。可将多酚富集组合物、酚类浓缩物和包含所分离酚类的组合物干燥为粉末,并根据本发明使用该粉末。在具体方面,将这种粉末制成胶囊,并且每个胶囊含有大约100mg、大约150mg、大约200mg、大约250mg、大约300mg、大约350mg或大约400mg的粉末;或者100至200mg、或100至300mg、或200至400mg范围内的粉末。

[0188] 剂型可包含赋形剂,例如一种或多种抗粘附剂、粘结剂、包衣、崩解剂、风味剂、着色剂、甜味剂、润滑剂、助流剂、流动剂、抗结剂、吸附剂或防腐剂。有用的赋形剂包括但不限于:硬脂、硬脂酸镁和硬脂酸;糖类及其衍生物,例如二糖:蔗糖、乳糖;多糖及其衍生物,例如淀粉、纤维素或改性纤维素(诸如微晶纤维素)和纤维素醚(诸如羟丙基纤维素);糖醇,诸如异麦芽酮糖醇、木糖醇、山梨糖醇和麦芽糖醇;蛋白质,诸如明胶;合成聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇;脂肪酸、蜡类、虫胶、塑料和植物纤维,例如玉米醇溶蛋白;羟丙基甲基纤维素;交联聚合物,例如交联聚乙烯吡咯烷酮(交联维酮)和交联羧甲基纤维素钠;羧基乙酸淀粉钠;二氧化硅、煅制氧化硅、滑石和碳酸镁。

[0189] 预期本发明的黄金奇异果组合物将包含各种组分,例如碳水化合物、膳食纤维、多酚和奇异果酵素。在各个方面,每25mg粉末可含有10至20mg碳水化合物、0.5至5.5mg膳食纤维、0.1至0.5mg GAE多酚以及100至500AU奇异果酵素。在一个具体方面,每25mg粉末可含有大约18mg碳水化合物、大约3.0mg膳食纤维、大约0.28mg GAE多酚以及大约230AU奇异果酵素。

[0190] 本发明的黄金奇异果组合物可包含特定多酚作为活性组分。组合物中的多酚在消化(例如,如本文详细描述体外消化)组合物后可能仍然存在。例如,在消化之后,基于干重,组合物的绿原酸含量可为至少40 μ g/g、至少45 μ g/g、至少50 μ g/g或至少55 μ g/g;或者为40至60 μ g/g或45至55 μ g/g。基于干重,组合物的E-咖啡酰-3-葡萄糖苷含量可为至少45 μ g/g、至少50 μ g/g、至少55 μ g/g、至少60 μ g/g、至少65 μ g/g、至少70 μ g/g或至少75 μ g/g;或者为40至80 μ g/g或50至70 μ g/g。基于干重,组合物的表儿茶素含量可为至少6 μ g/g、至少7 μ g/g、至少8 μ g/g、至少9 μ g/g、至少10 μ g/g、至少11 μ g/g、至少12 μ g/g、至少13 μ g/g或至少14 μ g/g;或者为8至12 μ g/g或9至11 μ g/g。基于干重,组合物的新绿原酸含量可为至少15 μ g/g、至少18 μ g/g、至少20 μ g/g、至少22 μ g/g、至少25 μ g/g、至少30 μ g/g或至少35 μ g/g;或者为10至30 μ g/g或15至25 μ g/g。

[0191] 在其他方面,在消化之后,基于干重,黄金奇异果组合物的根皮苷含量可为至少45 μ g/g、至少50 μ g/g、至少55 μ g/g、至少60 μ g/g、至少65 μ g/g、至少70 μ g/g或至少75 μ g/g;或者为40至80 μ g/g或50至70 μ g/g。基于干重,原花青素B2含量可为至少15 μ g/g、至少20 μ g/g、至

少25μg/g、至少30μg/g、至少35μg/g、至少40μg/g或至少45μg/g；或者为20至40μg/g或25至35μg/g。基于干重，组合物的槲皮素鼠李糖苷含量可为至少15μg/g、至少18μg/g、至少20μg/g、至少22μg/g、至少25μg/g、至少30μg/g或至少35μg/g；或者为10至30μg/g或15至25μg/g。

[0192] 在其他方面，在消化之后，基于干重，黄金奇异果组合物的儿茶素含量可为至少0.5μg/g、至少1μg/g、至少2μg/g或至少3μg/g；或者为1至4μg/g或2至3μg/g。基于干重，组合物的E-咖啡酰-4-葡萄糖苷含量可为至少3μg/g、至少4μg/g、至少5μg/g、至少6μg/g、至少7μg/g、至少8μg/g或至少9μg/g；或者为4至8μg/g或5至7μg/g。基于干重，组合物的槲皮素芸香糖苷含量可为至少1μg/g、至少2μg/g、至少3μg/g、至少4μg/g或至少5μg/g；或者为1至5μg/g或2至4μg/g。

[0193] 在不消化的情况下，基于干重，每100g本发明的黄金奇异果组合物可包含1000至1200mgGAE、或900至1300mg GAE、或800至1400mg GAE的总多酚含量。E-咖啡酰-3-葡萄糖苷的含量可为60至120μg/g、或80至100μg/g、或90至110μg/g；或者为约80μg/g、约90μg/g、约100μg/g、约110μg/g、约115μg/g或约120μg/g。基于干重，表儿茶素的含量可为20至60μg/g或30至50μg/g；或者为约20μg/g、约30μg/g、约40μg/g、约45μg/g、约50μg/g或约60μg/g。基于干重，新绿原酸的含量可为20至60μg/g或30至50μg/g；或者为约20μg/g、约30μg/g、约39μg/g、约40μg/g、约41μg/g、约50μg/g或约60μg/g。基于干重，原花青素B2的含量可为40至120μg/g、或50至100μg/g、或65至90μg/g、或60至80μg/g；或者为约40μg/g、或约50μg/g、或约60μg/g、或约70μg/g、或约75μg/g、或约80μg/g、或约90μg/g、或约100μg/g。

[0194] 本发明的黄金奇异果组合物还可包含纤维作为活性组分。在具体方面，基于干重，总纤维含量可为12.4%至12.7%、或12.0%至13.0%、或10%至15%；或者为约10%、约11%、约12%、约13%、约14%或约15%。在其他方面，基于干重，可溶性纤维含量可为3.4%至3.5%、或3.0%至4.0%、或3.2%至3.8%；或者为约3.0%、约3.1%、约3.2%、约3.3%、约3.4%、约3.5%、约3.6%、约3.7%、约3.8%、约3.9%或约4.0%。在其他方面，基于干重，不溶性纤维含量可为8.9%至9.3%、或8.0%至10.0%、或8.5%至9.5%；或者为约8.0%、约8.5%、约9.0%、约9.5%或约10.0%。

[0195] 本发明的黄金奇异果组合物还可包含各种糖，包括中性糖和糖醛酸。具体地讲，本发明的组合物包含果胶多糖。就中性糖而言，本发明的组合物可包含以下物质中的一种或多种：鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和葡萄糖。

[0196] 本发明的黄金奇异果组合物还可包含奇异果酵素酶。在具体方面，每克组合物中奇异果酵素水平可为8,000至11,000AU、或6,000至16,000AU、或7,000至11,000AU、或8,000至10,000AU；或者为约8,000AU、约9,000AU、约10,000AU、约11,000AU或约15,000AU。用于测定奇异果酵素水平的方法是本领领域广为人知且常用的。参见例如Drummond, 2013年和Kaur等人, 2010年。例如，可以例如在25℃ (即77°F) 下测量N-α-CBZ-赖氨酸-对硝基苯酚(Z-赖氨酸-pNp；西格玛奥德里奇私人有限公司(Sigma Aldrich Pty Ltd)) 消化，以确定奇异果酵素水平/活性(Boland和Hardman, 1972年)。组合物的测量结果可表示为AU/g或AU/mg。或者，可以使用荧光测定法来测量奇异果酵素水平，以评估半胱氨酸蛋白酶的活性(Nieuwenhuizen等人, 2012年；Maddumage, 2013年)。具体地讲，可使用荧光底物Z-FRAMC(苜蓿氧羰基-苯丙氨酸-精氨酸-7-氨基-4-甲基香豆素)、H-D-丙氨酸-亮氨酸-赖氨酸-AMC或Bz-精氨酸-AMC(Feinchemikalien AG公司)。组合物的这些测量结果可表示为FU/g或FU/mg。

[0197] 预期本发明的黄金奇异果组合物对于刺激有益肠内生物(例如有益细菌)的生长

有积极作用,有益肠内生物为诸如乳杆菌属或双歧杆菌属类群的成员,以及梭菌目(Clostridiales)类群的某些成员,包括如本文所证实的普拉梭菌。其他有益生物也可表现出生长增加,例如丹毒丝菌目(Erysipelotrichales)和拟杆菌目(Bacteroidales)菌株。有益生物还包括球形梭菌、多形拟杆菌、卵形拟杆菌、解纤维素拟杆菌、肠道罗斯拜瑞氏菌、食葡萄糖罗斯拜瑞氏菌、布氏瘤胃球菌和生黄瘤胃球菌。有益生物还包括拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属和毛螺菌科,以及本文所述的其他生物。

[0198] 在本发明的各个方面,黄金奇异果组合物(例如,25mg粉末,可以0.3至0.5mg/ml稀释)可使一种或多种乳杆菌和/或双歧杆菌菌株的生长(例如,从10亿cfu开始)增加至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%或至少110%。在一个具体方面,可通过将25mg粉末加入10亿cfu的益生菌生物中,来实现比对照(已归一化为0%)大50%的生长速率。在消化(例如,如本文详细描述体外消化)组合物后仍然可观察到这种增加。优选地,不会伴随有害肠内生物(例如有害细菌)的增加,有害肠内生物为诸如沙门氏菌和/或葡萄球菌菌株。在一些情况下,可以实现一种或多种有害生物的减少。

[0199] 本发明的黄金奇异果组合物对于刺激粪便细菌的生长也可有积极作用,粪便细菌包括梭菌目细菌,诸如来自柔嫩梭菌系统发育群的那些细菌,尤其是栖粪杆菌属菌株,包括普拉梭菌。在用黄金奇异果粉末处理受试者(例如便秘受试者)之后,普拉梭菌的相对丰度可增加至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少150%或至少200%;或者增加20%至200%、或50%至150%、或70%至100%。

[0200] 本发明的黄金奇异果组合物表现出增加短链脂肪酸水平的活性。在本发明的具体方面,组合物(例如10mg粉末)可使乙酸盐、丁酸盐和丙酸盐中一种或多种的水平增加至少10%、至少15%、至少18%、至少20%、至少22%、至少25%、至少28%或至少30%。在消化(例如,如本文详细描述体外消化)组合物后仍然可观察到这种增加。

使用奇异果组合物的方法

[0201] 如上所述,本发明的黄金奇异果组合物可用于支持或改善总体肠道健康以及/或者治疗或预防消化道的各种病症,包括炎症、便秘、微生物群不平衡、肠易激综合征和炎症肠疾病。另外,该组合物可用于维持或改善肠道规律性,以及维持或增加消化道中的有益细菌,包括普拉梭菌。

[0202] 便秘可能由肠功能紊乱或结构性问题引起,并且可能具有一种或多种以下症状:排便减少、排便不完全和需要辅助排便、用力排便、粪便呈硬结或成块形式、腹胀、肠胃气胀、腹痛和依赖泻药。便秘的常见原因包括:饮水不足、饮食中的纤维不足、正常饮食或日常饮食受到破坏、活动或锻炼不足、食用大量乳制品、压力过大、逃避排便(例如由于疼痛)、过度使用泻药或大便软化剂、甲状腺功能减退、神经学病症(诸如帕金森病或多发性硬化)、含钙或铝的抗酸药物、药物(尤其是止疼药,诸如麻醉剂、抗抑郁剂或铁补充剂)、抑郁、饮食紊乱、肠易激综合征、怀孕、结肠癌和在肠中缺乏神经和肌肉功能。

[0203] 微生物群不平衡(例如,有益生物减少、有益生物的比例改变和/或有害生物增加)的病因学相当复杂,目前尚未完全阐明。不平衡可能由某些药物(诸如抗生素)、消化道紊乱或饮食不足引起。肠道微生物群不平衡可表现为一种或多种以下症状:腹泻(尤其是与抗生素相关的腹泻)、拉稀、便秘和/或腹胀。

[0204] 微生物群不平衡与胃肠系统的各种紊乱以及其他紊乱相关。具体地讲,微生物群

不平衡可能与炎症肠疾病、肠易激综合征、乳糜泻、克罗恩病、溃疡性结肠炎、坏死性小肠结肠炎、肠炎、肠道感染、癌变(包括胃癌、结直肠癌)、胆石病、内毒素血症、肝脏疾病(诸如肝硬化和肝性脑病)有关。

[0205] 消化道中的微生物不平衡与许多不同健康状况有关,包括:

紊乱类型	观察结果	受影响的系统/器官	参考文献
克罗恩病	多样性下降—普拉梭菌减少	GIT	(Fujimoto 等人, 2013 年; Willing 等人, 2010 年)
溃疡性结肠炎	多样性下降—嗜粘蛋白阿克曼氏菌(<i>A. muciniphila</i>)和普拉梭菌减少	GIT	(Lepage 等人, 2011 年; Sokol 等人, 2009 年)
肠易激综合征	梭菌属 LK 族增加, 拟杆菌属物种减少	GIT	(Jeffery 等人, 2012; Maccaferri 等人, 2012 年)
GIT 癌	多样性下降, 拟杆菌属物种出现变种, 梭杆菌属物种增加, 普拉梭菌减少	GIT	(Chen 等人, 2012; Wang 等人, 2012 年)
过敏症/特应性	多样性下降, 肠杆菌科增加, 嗜粘蛋白阿克曼氏菌和普拉梭菌减少	全身	(Abrahamson 等人, 2012 年; Candela 等人, 2012 年)
乳糜泻	组成改变, 尤其是在小肠中。乳杆菌和双歧杆菌较少	GIT	(de Sousa Moraes 等人, 2014 年; Kalliomaki 等人, 2012 年)
糖尿病	双歧杆菌属物种和普拉梭菌减少	全身	(Fuxet 等人, 2010 年; Wu 等人, 2010 年)
肥胖症	厚壁菌门与拟杆菌门之比增加	全身	(Ley 等人, 2006 年; Turnbaugh 等人, 2008 年)
自闭症	萨特氏菌属(<i>Sutterella</i>)物种增加, 嗜粘蛋白阿克曼氏菌种和双歧杆菌属物种减少	脑	(Wang 等人, 2011 年; Williams 等人, 2012 年)
动脉粥样硬化 ¹	涉及韦氏球菌属(<i>Weillonella</i>)物种、链球菌属(<i>Streptococcus</i>)物种和普雷沃氏菌属肠道型	动脉	(Koeth 等人, 2013 年; Koren 等人, 2011 年)
抑郁症和焦虑症 ¹	肠道微生物群整体变化, 双歧杆菌属物种减少	脑	(Desbonnet 等人, 2008 年; Neufeld 等人, 2011 年)
婴儿腹绞痛 ¹	变形菌门(<i>Proteobacteria</i>)增加, 双歧杆菌和乳杆菌减少	GIT	(de Weert 等人, 2012 年; Savino 等人, 2007 年)
多发性硬化 ¹	肠道微生物群整体变化, 存在 B 型产气荚膜梭菌(<i>Clostridium perfringens</i>)	脑	(Lee 等人, 2011 年; Rumm 等人, 2013 年)
帕金森病 ¹	普雷沃氏菌科减少, 梭菌属物种增加	脑	(Murata 等人, 2013 年; Scheperjans 等人, 2014 年)
类风湿性关节炎 ¹	肠道微生物群整体变化, 拟杆菌属物种减少	全身	(Abdollahi-Roodsaz 等人, 2008 年; Vahtovuo 等人, 2008 年)

*结肠微生物群与这些紊乱类型之间存在相关性仅有初步证据。GIT, 胃肠道。上表修改自de Vos&de Vos 2012。

[0206] 消化道的炎症可能与各种病症有关, 包括萎缩性舌炎、口角炎、口面部肉芽肿病、食管炎、胃炎(包括萎缩性胃炎)、幽门狭窄、结肠炎、回肠炎、克罗恩病、乳糜泻、炎性肠疾病、肠易激综合征、损伤、裂隙和各种溃疡(包括口腔溃疡、食管溃疡、胃溃疡和肠溃疡, 具体包括溃疡性结肠炎)。炎症还可能与有害生物有关, 诸如细菌、原生动物和/或病毒生物, 包括以下群组/生物: 肠杆菌科、巴斯德氏菌科、韦荣球菌科、梭杆菌科、变形菌门、弯曲菌属(*Campylobacter*)、志贺氏杆菌(*Shigella*)、耶尔森菌属(*Yersinia*)、李斯特菌属(*Listeria*)、沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、鸟型结核分支杆菌(*Mycobacterium avium*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、可变梭杆菌(*Fusobacterium varium*)、贾第虫属(*Giardia*)、痢疾变形虫(*Entamoeba histolytica*)、轮状病毒、诺瓦克病毒、腺病毒、星状病毒和麻疹病毒。在某些情况下, 炎症可能是由于受伤、用药或手术引起的。

[0207] 发现本发明的黄金奇异果组合物可用于治疗或预防胃肠炎症、便秘、肠道不规律性、微生物群不平衡、肠易激综合征、炎性肠疾病或本文描述的其他病症。作为示例性剂量, 组合物可以每天250至2500mg、500至5000mg、1000至4000mg、1500至4500m、2000至3000mg, 或者约250mg、约500mg、约600mg、约800mg、约1000mg、约1200mg、约1500mg、约1700mg、约1800mg、约2000mg、约2200mg、约2300mg、约2400mg、约2500mg、约2600mg、约2700mg、约2800mg、约2900mg、约3000mg、约3200mg、约3500mg、约3600mg、约4000mg、约4200mg、约4800mg、约5000mg、约5400mg、约6000mg或约6600mg的黄金奇异果粉末施用; 或者如果使用液体形式, 则以等效剂量施用。可每天施用一次、两次或三次。可与食物一起施用或饭前施用。适当的剂量和剂型将由本领域技术人员轻松确定。

[0208] 各种施用途径可用于本发明的黄金奇异果组合物, 包括经肠施用、经口施用和直肠施用。经口施用可通过片剂、胶囊、小袋、滴剂、酏剂、药糖剂、溶液、乳液、悬浮液、顿服剂、果泥、糊剂、糖浆、凝胶、果冻、滋补剂或其他已知方式进行。经肠施用可通过十二指肠管或胃管(包括鼻胃管)进行。直肠施用可通过灌肠剂、栓剂或其他合适的方式进行。不同的施用方式是本领域已知的, 并且可由技术人员使用。本发明的组合物不限于具体的施用形式。

[0209] 在具体方面, 可将本发明的组合物与一种或多种益生菌生物共同施用。例如, 可将黄金奇异果组合物与一种或多种益生菌配制成组合剂型。或者, 可将黄金奇异果组合物与一种或多种益生菌作为分开的剂型施用。示例性益生菌生物包括但不限于: 凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*), 例如GBI-30和6086菌株; 长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*), 例如婴儿(*infantis*) 35624亚种; 嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*), 例如NCFM和CL1285菌株; 副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*), 例如St11和NCC2461菌株; 约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*), 例如Lal和NCC533菌株; 乳杆菌LC1; 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*), 例如299v和HEAL9菌株; 罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*), 例如ATCC 55730、SD2112、Protectis (DSM 17938、ATCC 55730的子菌株)、Prodentis (DSM 17938/ATCC 55730和ATCC PTA 5289的组合) 和RC-14[®]菌株; 鲍氏酵母菌(*Saccharomyces boulardii*); 鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*), 例如GR-1[®]菌株; 干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*), 例如LBC80R菌株; 保加利亚乳杆菌

(*Lactobacillus bulgaricus*) ;嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) ;以及双叉乳杆菌 (*Lactobacillus bifidus*) 。可用作益生菌的其他生物包括栖粪杆菌属菌株 (包括普拉梭菌) ,也包括拟杆菌科菌株 (诸如脆弱拟杆菌) 。

[0210] 在其他方面,可将本发明的黄金奇异果组合物与一种或多种益生元剂共同施用,例如作为组合剂型或作为分开的剂型。如前所述,益生元剂由穿过消化道上部的非消化性纤维或可发酵化合物组成,并且通过充当定殖于大肠的有益生物的底物来刺激有益生物的生长和/或活性。

[0211] 这些试剂可以是短链益生元、长链益生元或全谱益生元。短链益生元每个糖分子包括2至8个键。长链益生元每个糖分子包括9至超过60个键。全谱益生元每个糖分子包括2至超过60个键的全范围分子链接长度。示例性益生元剂包括但不限于:低聚果糖、菊粉、富集低聚果糖的菊粉、低聚果糖、低聚木糖、聚葡萄糖、低聚半乳糖、反式低聚半乳糖、低聚甘露糖、乳果糖、塔格糖和淀粉。

[0212] 根据本文所示的结果,认为存在于所公开的组合物中的多酚可充当益生元剂。因此,可能有用的是将一种或多种酚类化合物加入本发明的组合物中,以补充其中的益生元活性。示例性化合物包括但不限于:酚类衍生物 (诸如酚酸)、黄酮类 (诸如木质素)、原花色素、花色素苷、花色素、异黄酮、儿茶素、丹宁酸、槲皮素、柚皮素和橙皮素。具体包括从以下一种或多种物质中提取的酚类化合物:茶、可可、葡萄酒、大豆、费约果、柑橘类水果、苹果、葡萄、浆果和奇异果,尤其是黄金奇异果,包括Hort16和Gold3。来自Gold3黄金奇异果的具体酚类包括但不限于:儿茶素、绿原酸、E-咖啡酰-3-葡萄糖苷、E-咖啡酰-4-葡萄糖苷、表儿茶素、新绿原酸、根皮苷、原花青素B1和B2、槲皮素鼠李糖苷和槲皮素芸香糖苷。

[0213] 在其他方面,可将本发明的组合物与一种或多种合生素 (组合益生元和益生菌) 共同施用。例如,可将黄金奇异果粉末与一种或多种合生素配制成组合剂型。或者,可将黄金奇异果与一种或多种合生素作为分开的剂型施用。例如,可将双歧杆菌或乳杆菌与低聚果糖或菊粉或低聚半乳糖组合。具体的合生素组合包括但不限于:双歧杆菌和低聚果糖、鼠李糖乳杆菌 (例如GG菌株) 和菊粉。

[0214] 作为另外的方面,可将本发明的组合物与纤维和/或消化酶共同施用。例如,可将黄金奇异果粉末与一种或多种包含纤维和/或消化酶的组合物配制成组合剂型。或者,可将黄金奇异果粉末与一种或多种包含纤维和/或消化酶的组合物配成分开的剂型施用。示例性纤维组合物包括可溶性纤维组合物和/或不溶性纤维组合物,例如包括小麦糊精、聚卡波非钙、洋车前子、菊粉、甲基纤维素、葡甘露聚糖、亚麻、亚麻籽、小麦草、阿拉伯胶树和大黄中的一种或多种的组合物。示例性消化酶包括但不限于:奇异果酵素、蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、纤维素、胰酶、胃蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶。可使用消化酶的组合,例如蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的组合,包括添加或未添加奇异果酵素的组合。

[0215] 在其他方面,可将本发明的黄金奇异果组合物与一种或多种抗炎剂和/或抗微生物剂共同施用。特别令人感兴趣的是在抗生素处理期间和/或之后使用本发明的组合物作为益生元补充剂。例如,可将黄金奇异果粉末与一种或多种抗炎剂/抗微生物剂配制成组合剂型。或者,可将黄金奇异果与一种或多种抗炎剂/抗微生物剂作为分开的剂型施用。示例性抗炎剂/抗微生物剂包括但不限于:氨基水杨酸盐例如美沙拉嗪 (例如, Pentasa®) 和柳氮磺胺吡啶 (例如, Salazopyrin®)、皮质类固醇例如布地奈德 (例如, Entocort®) 和醋酸氢化

可的松(例如,Colifoam®),并且还包括硫唑嘌呤(例如,Azasan®、Imuran®)、巯基嘌呤(例如,Purinethol®、Purixan™)、环孢素(例如,Gengraf®、Neoral®、Sandimmune®)、英夫利昔单抗(例如,Remicade®)、阿达木单抗(例如,Humira®)、高利单抗(例如,Simponi®)、甲氨蝶呤(例如,Rheumatrex™、Methoblastin™)、那他珠单抗(例如,Tysabri™)、维多珠单抗(例如,Entyvio™)、优特克单抗(例如,Stelara®)和包括甲硝唑(例如,Flagyl®)和环丙沙星(例如,Cipro®,Ciplox™)在内的抗生素。

实施例

[0216] 提供本文所述的实施例是为了说明本发明的具体实施方案,并非旨在以任何方式限制本发明。

实施例1:奇异果粉末的制备

[0217] 从新西兰陶兰加的奇异果加工有限公司(Kiwifruit Processing Company Ltd, Tauranga, New Zealand)获得冷冻黄金奇异果果泥(冷冻黄金奇异果果泥单一强度(无种子))。该果泥由100%新西兰黄金奇异果(*Actinidia chinensis* G3)制成,该黄金奇异果按照Zespri®出口标准栽培并通过手工分级。该果泥通过制造工艺生产,以去除果皮和种子,留下一个光滑丰富的果泥。

[0218] 冷冻黄金奇异果果泥的产品规格如下:

[0219] 颜色为奇异果金色,颜色有些变化属正常。味道为成熟黄金奇异果的典型味道。质地光滑无籽。果泥不含腐烂或发酵的果实或异物,并且不含可检测的大肠杆菌。白利糖度值为16°至21°。粘度(12.5°Brix, 20°C)为大约12.0,但当果实保持整个季节时粘度可能变化。pH为3.2至3.8。筛分粒度<1mm。将产品冷冻保存在-18°C直到使用。

[0220] 另外,从新西兰陶兰加的奇异果加工有限公司(Kiwifruit Processing Company Ltd, Tauranga, New Zealand)获得冷冻绿色奇异果果泥(冷冻绿色奇异果果泥单一强度(无种子))。该果泥由100%新西兰绿色奇异果(*Actinidia deliciosa*, Hayward品种)制成,该绿色奇异果按照Zespri®出口标准栽培并通过手工分级。该果泥通过制造工艺生产,以去除果皮和种子,留下一个光滑丰富的果泥。

[0221] 冷冻绿色奇异果果泥的产品规格如下:

[0222] 颜色为奇异果绿色,颜色有些变化属正常。味道为成熟绿色奇异果的典型味道。质地光滑无籽。果泥不含腐烂或发酵的果实或异物,并且不含可检测的大肠杆菌。白利糖度值为13°至18°。粘度(12.5°Brix, 20°C)为大约12.0,但当果实保持整个季节时粘度可能变化。pH为3.2至3.8。筛分粒度<1mm。将产品冷冻保存在-18°C直到使用。

[0223] 获得奇异果粉末的过程如下:

1) 从新西兰陶兰加的奇异果加工有限公司(Kiwifruit Processing Company Ltd, Tauranga, New Zealand)购买冷冻Gold3果泥。

2) 将冷冻果泥冻干(冷冻干燥)。冻干过程通常在不超过70°C的温度下进行约48小时。然后将所得的干燥材料通过US 20的筛孔进行研磨,以产生自由流动的粉末。

3) 使用相同的方法获得绿奇异果粉末。

实施例2:奇异果粉末的多酚测量

[0224] 检测绿色奇异果粉末和黄金奇异果粉末的多酚分布。根据实施例1制备冻干(冷冻干燥)的绿色(Hayward)奇异果粉末和黄金(Gold3)奇异果粉末。

[0225] 使用Monro等人2010年所述的体外上消化道模型来消化粉末。简单地讲,将20mL水和5mL 20%盐水溶液加入5g样品中,pH为2.5,然后涡旋。然后加入1mL 1%胃蛋白酶的0.05M盐酸溶液,然后用慢速恒定混合器(220rpm)在37℃下温育30分钟。将样品pH调节至6.5,然后加入5mL从西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich)获得的2.5%胆汁提取物和1mL 5%胰酶的3%氯化钠(NaCl)溶液。

[0226] 然后将样品涡旋,并且用慢速恒定混合器(220rpm)在37℃下温育2小时。然后将消化后的样品转移到透析袋(500Da MWC0,从赛默飞世尔科技公司(Thermofisher Scientific)获得)中,并且在4℃下在10mM NaCl中透析过夜,然后改变透析液在2℃下再透析2小时,这个过程代表小肠中的吸收。将样品保存在-80℃,然后冷冻干燥。

[0227] 用5mL乙醇/水/甲酸(80:20:1)提取冷冻干燥的绿色粉末和金色粉末(100mg)的消化前和消化后样品。将提取混合物超声处理30分钟,然后储存过夜。将样品全速离心以除去微粒,稀释2倍,然后进行液相色谱-质谱(LC-MS)分析。详细信息在下表2中提供。

表2:消化前和消化后的奇异果粉末的LC-MS分析

LCMS	Dionex Ultimate® 3000 快速分离液相仪(LC)和 microTOF QII 质谱仪(MS)
柱子	Zorbax™ SB-C18 2.1m×100mm, 1.8μm
流动相流量	350μL/min
溶剂	A=100%乙腈 B=0.2%甲酸
梯度	10% A, 90% B, 0-0.5min 线性增加至 50% A, 50% B, 0.5-18min 线性增加至 100% A, 18-30min 在 100% A 下保持 30-40min 线性增加至 10% A, 90% B, 40-40.2min
进样体积	2μL
MS 参数:	干燥 N ₂ 温度: 200℃ 干燥 N ₂ 流量: 8L/min 雾化器 N ₂ : 1.5bar 质量范围: 100-1500Da 采集率: 2 次扫描/s

[0228] 使用由真正标准物获得的校准曲线来计算化合物浓度。

[0229] 如图1所示,与消化(模拟上消化道消化)前相比,消化后的Go1d3粉末的多酚分布发生了改变(图1),但总体酚含量保持不变。具体地讲,对于Go1d3粉末,观察到消化前的多酚含量为269μg/g,消化后的苯酚含量为264μg/g(图1,检测酚类化合物的总和)。绿色奇异果粉末在消化后多酚分布也发生了改变,但消化作用降低了总体含量(图1)。对于绿色奇异果粉末,消化前的总体多酚含量为258μg/g,消化后为153μg/g(图1,检测酚类化合物的总和)。

实施例3:奇异果粉末的微生物高通量测定

[0230] 从用豌豆淀粉(14.28:1湿重)进行滚筒干燥的糊剂配制物(由新西兰的Cedenco Foods公司制备)获得Gold3黄金奇异果粉末。使用实施例2中所述的上消化道模型在体外消化5g粉末样品。

[0231] 然后将消化后的材料溶于水或二甲基亚砜(DMSO)中至100mg/mL的均匀浓度。然后将样品用无菌去离子水稀释100倍,以将DMSO减少到可控的浓度防止细菌裂解。将水和DMSO“提取物”加入微生物高通量测定孔中,最终浓度为1.0mg/mL。

[0232] 研究中所用的生物包括益生菌尼氏大肠杆菌1917、鼠李糖乳杆菌HN001(DR20)、乳酸双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*) HN019(DR10)以及致病性肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)血清型鼠伤寒ATCC 1772和金黄色葡萄球菌ATCC 25932。

[0233] 本研究使用Rosendale等人2008年所述的测定光密度(OD)的96孔微板生长生物测定法。计算生长变化(Δ 生长),所计算的生长变化用来表示效果的大小。通过将OD转化为对照OD的百分比,然后减去100,并将对照生长有效地归一化为0基线值来计算生长变化。

[0234] 每个微板使用一种细菌菌株,并且每种提取物以一系列浓度(0,0.0124mg/mL、0.037mg/mL、0.1111mg/mL、0.333,1mg/mL)一式四份地在每个微板上分析。用等体积(50 μ L)细菌接种物接种微板,并且立即用酶标仪器(FLUOstar Optima[®])在595nm波长下测量OD,以测定空白/零生长值。将微板在37℃下温育24小时,然后测定OD以测定培养物的生长。

[0235] 结果表明,与对照组相比,Gold3金色粉末支持双歧杆菌和乳杆菌菌株的生长,但不影响致病细菌数量的显著变化(图2)。

实施例4:用于测试奇异果粉末的混合发酵模型

[0236] 从用豌豆淀粉(14.28:1湿重)进行滚筒干燥的糊剂配制物(由新西兰的Cedenco Foods公司制备)获得Gold3黄金奇异果粉末。根据实施例2消化5g粉末样品。将消化后的样品溶于水中至10mg/mL的最终浓度。

[0237] 从三名健康的人类志愿者收集新鲜粪便样品。将消化后的金色粉末在接种有来自单个粪便捐助者的混合微生物群的试管中温育,对三个捐助者中的每一个都如此重复。在二氧化碳下,向含有预还原的发酵培养基(9mL)的Hungate管中补充1mL样品或对照,并且用1mL 10%(w/v)粪便浆液接种。将管在37℃下温和地(150rpm)轨道振荡温育。定期(第0、5、10、24、48小时)用注射器和22号针穿过橡胶隔片取出子样品,以防止样品暴露于大气中。

[0238] 将从发酵管中移除的样品收集到1.5mLEppendorf[®]管中,并且立即以13,000 $\times$ g离心5分钟。将无细胞和无颗粒的上清液收集到新的Eppendorf[®]管中,并且在-80℃下冷冻直到需要。

[0239] 将上清液解冻,并用0.01M磷酸盐缓冲液以1:4稀释,2-丁酸乙酯(最终浓度为5mM)作为内标。然后将样品在4℃下以3,000 $\times$ g离心5分钟。将上清液(0.25mL)用浓盐酸(0.125mL)酸化,加入二乙醚(0.5mL),然后涡旋并以10,000 $\times$ g离心5分钟(4℃)。收集上层二乙醚相,用硫酸镁干燥,并用含有1%叔丁基二甲基氯硅烷的N-叔丁基二甲基硅烷基-N-甲基三氟乙酰胺,通过加热至80℃保持20分钟来衍生化。

[0240] 按照下表3中的气相色谱(GC)对发酵样品中微生物有机酸代谢物的浓度进行定量分析。

表3:有机酸代谢物的GC分析

GC	配备有火焰离子化检测器 (FID) 的 Shimadzu GC-17A
柱子	10m×0.53mm ID×2.65 μm
载气	氮
流量	37mL/min
压力	7kPa, 以 0.8kPa/hr 的速度增加至 15kPa
	保持 4min
温度程序	70℃, 以 10℃/min 的速度增加至 80℃ 以 20℃/min 的速度增加至 255℃ 保持 5min
进样器和检测器温度	260℃
进样体积	1μL, 不分流

[0241] 将浓度已知的有机酸标准混合物与样品一起分析,用于形成标准曲线,将相对峰面积标准化为2-丁酸乙酯响应。结果表示为μmol有机酸/mL发酵液。

[0242] 如图3所示,Go1d3黄金奇异果粉末的存在促进了有机酸产量的增加,尤其是在暴露后前12小时。鉴于观察到的增加现象,表明金色粉末中的非消化性可发酵组分(碳水化合物和多酚)被分解并且用作生长和产生能量的底物。这与益生元的作用是一致的。

实施例5:测试Go1d3黄金奇异果粉末改善规律性的临床试验

[0243] 临床方案概述

[0244] 该研究被设计为随机双盲安慰剂对照交叉试验,其中参与者食用四种不同的干预物,每次干预持续4周,每两次干预之间的洗脱持续2周。试验设计的示意图如图4所示。

[0245] 临床试验参与者

[0246] 通过报纸和广播广告、社区、当地地区卫生委员会、坎特伯雷大学(新西兰克赖斯特彻奇)、林肯大学(新西兰林肯市)、时事通讯、医生全科医学手术的海报以及通过之前参与者的现有数据库招募两组参与者。

[0247] 从总共51名志愿者中招募了29名参与者。将参与者分为两组:第1组(“健康组”):参与者无便秘临床症状;第2组(“功能性便秘组”):根据罗马III标准将参与者归类为患有C3功能性便秘。

[0248] 罗马III标准:

1) 必须包括以下症状中的两个或更多个:a)至少25%的排便期间用力排便;b)至少25%的排便存在粪便硬结或成块;c)至少25%的排便有肛门直肠梗阻或阻塞的感觉;d)至少25%的排便有排泄不完全的感觉;e)至少25%的排便需要手动操作以帮助排便;f)每周排便三次或更少;

2) 如果不使用泻药,松散粪便很少存在;以及

3) 不足以达到肠易激综合征标准。

[0249] 入选标准为:年龄为18-60;BMI限于19与30 kg/m^2 之间;空腹血糖低于5.6 mmol/L ;受试者必须愿意在整个研究期间维持习惯性食物和饮料摄入(除了替代类似产品的研究食品)以及身体活动模式;要求受试者拒绝高纤维补充剂,诸如Metamucil[®]、Benefiber[®]和Phloem[™],以及在研究期间避免吃新鲜奇异果;要求参与者在研究期间避免海外旅行,因为这可能对饮食有影响。

[0250] 排除标准为:存在胃肠道警示症状(包括便血、频繁腹泻、不断腹痛);节食者或食用素食、生食饮食或极高纤维饮食的人;患有胃轻瘫或乳糖不耐症;经历过减肥手术(胃束带手术或胃旁路手术);孕妇;临床上显著表现出肾、肝脏、内分泌、心脏、肺、胰腺、神经、血液或胆紊乱;以及已知对奇异果过敏或敏感。

[0251] “健康”组由无便秘临床症状的参与者组成。“功能性便秘”(FC)组根据罗马III标准(Drossman, 2006年)被选择为患有C3功能性便秘。20名参与者(2名男性和18名女性)被招募到健康组。平均年龄为38岁(23-56岁),平均身体质量指数为23 kg/m^2 (19-29 kg/m^2)。9名参与者(1名男性和8名女性)被招募到FC组。平均年龄为44岁(38-54岁),平均身体质量指数为25 kg/m^2 (21-29 kg/m^2)。还可进一步参见下表6。

[0252] 健康组的20名参与者中有19名完成了研究。1名女性参与者由于个人原因退出了研究。FC组的9名参与者都完成了研究。参与者进行干预的顺序由生物统计学家使用威廉姆斯拉丁方格设计(Williams Latin Square design)和计算机生成的随机编号随机分配。在完成分析之后,公开研究揭露干预顺序。本研究经过快速审查获得了新西兰人力残疾与伦理委员会(New Zealand Human Disability and Ethics Committee)的伦理批准(申请号12/STH/72/AM01),并且在澳大利亚新西兰临床试验注册处(Australia New Zealand Clinical Trials Registry)进行了注册(注册号ACTRN:12612001270808)。

[0253] 临床测试方法

[0254] 干预通过由新西兰惠灵顿的Anagenix有限公司(Anagenix Limited, Wellington, New Zealand)提供的4 $\times$ 600mg胶囊递送,这些胶囊被制备成看起来相同,以保持盲法干预(表4)。

表4:干预组合物说明

干预	处理	剂量	递送—胶囊/天
ACTAZIN [®] L	绿色奇异果粉末	600mg	1 $\times$ ACTAZIN [®] + 3 $\times$ 安慰剂
ACTAZIN [®] H	绿色奇异果粉末	2400mg	4 $\times$ ACTAZIN [®]
GOLD	黄金(G3)奇异果粉末	2400mg	4 $\times$ GOLD
安慰剂	绿色异麦芽酮糖醇(E102, E142)	2400mg	4 $\times$ 安慰剂

表5:所用干预ACTAZIN[™]和GOLD的营养信息

营养信息 (每100g)	GOLD	ACTAZIN TM
能量, kJ	1420	1435
蛋白质, g	3.9	3.4
总脂肪, g	1.8	3.0
- 饱和脂肪, g	0.34	0.75
- 不饱和脂肪, g	1.4	2.4
- 单不饱和脂肪, g	<0.10	0.53
- 多不饱和脂肪, g	1.4	1.8
碳水化合物, g	71	67
- 总糖, g	58	46
- 蔗糖, g	<0.05	<0.05
- 葡萄糖, g	27	21
- 果糖, g	31	25
- 乳糖, g	<0.05	<0.05
- 麦芽糖, g	<0.05	<0.05
膳食纤维, g	12	16
钠, mg	18	13
总多酚, mg GAE	1100	900
奇异果酵素, AU/g	9100	40700

[0255] 所有参与者食用了四种不同的干预物组合:安慰剂(绿色异麦芽酮糖醇)(2400mg/天)、ACTAZINTML(600mg/天)、ACTAZINTMH(2400mg/天)和GOLD(2400mg/天),每次干预持续28天,每两个处理阶段之间的洗脱时间为14天。

[0256] ACTAZINTML(低剂量,绿色奇异果)和ACTAZINTMH(高剂量,绿色奇异果)由冷加工的Actinidia deliciosa“Hayward”绿色奇异果配制而成,而GOLD由冷加工的黄金奇异果Actinidia chinensis“Zesy002”Gold3金色新鲜奇异果配制而成。参见实施例1。

[0257] 在每个为期4周的干预阶段开始和结束时,要求参与者提供粪便样品。选择2周的洗脱时间,使得有足够的时间将肠道习惯恢复到所测量参数(微生物生态、微生物代谢物)的基线。

[0258] 在每个干预阶段开始和结束时,还要求参与者提供粪便样品并完成伯明翰(Birmingham)肠易激综合征(IBS)症状问卷调查(Johnston等人,2010年)以及与健康相关的IBS特定生活质量问卷调查(Patrick等人,1998年)。

[0259] 从基线到研究结束的每一天,参与者在提供的日常日记中记录各种参数。这些参数包括:1)排便次数;2)不完全排便和辅助排便;3)用力排便;4)根据布里斯托尔粪便量级(Bristol stool scale)确定的粪便形式;5)腹胀;6)肠胃气胀;7)腹痛;8)使用泻药。

[0260] 使用GenStat(v.16,2013年,英国赫默尔亨普斯特德(Hemel Hempstead,UK)的VSNi有限公司(VSNi Ltd.))中的方差分析(ANOVA)来分析数据。分别对两组数据进行了分析。将每个观察阶段的结果作为完整区组设计进行分析,参与者和参与者×阶段为块,阶段(1、2、3或4)和干预(包括洗脱)为因素。平均洗脱数据用作统计分析目的的基线。检查残留物以确保方差分析的假设得到满足(将必要的数据进行对数转换以稳定方差)。

[0261] 使用Cochran Q检验对健康组进行事后子组分析,以比较响应于每次干预的参与

者(即,在前一次洗脱阶段每周至少增加一次排便)。然后将参与者归类为响应者(表现出对至少一个非安慰剂干预有响应)或非响应者;使用ANOVA分析响应子组(19名参与者中有14名(74%))的数据。

[0262] 主要研究结果是排便频率显著增加。

实施例6:改善规律性的处理结果

[0263] 参与者的人口统计资料如表6所示。健康组和功能便秘组的依从性分别为98%±9和99%±8。

表6:研究参与者的人口统计资料

基线特点	健康	功能性便秘
N	20	9
男性	2	1
女性	18	8
年龄(岁)(平均值±标准差)	38±11	44±6
年龄(范围)	23-56	38-54
体重(kg)(平均值±标准差)	68±13	67±8
体重(范围)	47-101	53-79
BMI (kg/m ²)(平均值±标准差)	23±3	25±2
BMI (范围)	19-29	21-29
依从性(%)	98±9	99±8

BMI-身体质量指数;SD-标准差

[0264] 本研究的结果总结在表7和表8中。

[0265] 在健康组(n=19)中,在各个干预与洗脱之间观察到每日排便次数(p=0.002)、布里斯托尔粪便得分(Bristol stool score)(p=0.036)、用力排便(p=0.044)和肠胃气胀(p=0.007)的显著差异。与洗脱相比,ACTAZIN-H和GOLD干预的每日排便次数显著地更高(分别p=0.014和p=0.00),其中每次干预每周增加大约0.8次排便(表7)。

[0266] 与洗脱相比,在响应者子组(n=14)中,食用ACTAZIN-L、ACTAZIN-H和GOLD导致每日排便显著增加(分别p=0.005,p<0.001,p=0.001)(表7)。

[0267] 如果食用干预物28天,一般耐受性良好,没有报告严重的不良事件,除了自我报告肠胃气胀(高于健康组ACTAZIN-H组(p=0.007))之外,对日常问卷调查中记录的健康参数没有影响(p<0.05)(表7)。

[0268] 在功能性便秘个体(n=9)中,与洗脱相比,饮食干预没有显著增加排便频率(表8)。这是因为该研究的样品量较小,检测排便频率的显著差异的统计学能力有限。但功能性便秘组表现出消化参数整体改善,并且其他便秘症状有所减轻。

[0269] 在功能性便秘组中,观察到消化健康指数得以全面改善(图5A)。功能性便秘参与者的9名中有8名表现出胃肠道健康参数有所改善,这是根据洗脱的平均变化(用力排便、排泄不完全、手动操作、腹胀、肠气、使用泻药和疼痛)总和计算得出的(图5A)。每个参数的得分是从参与者的日常日记中获得的。

[0270] 在有症状的人群中,每周增加一次以上的排便被认为是临床上有意义的影响(食品和药物管理局(Food and Drug Administration),2012年),并且将可能改善轻度或偶发

便秘患者的症状。已经证明来源于绿色奇异果 (Hayward) 和黄金奇异果 (Gold3) 的 ACTAZIN™ 和 GOLD 在健康人群中的这种功效程度。具体地讲,与洗脱相比,在健康组的响应者子组中观察到每周增加大约 1.5 次排便。

[0271] 总之,这项研究表明,ACTAZIN™ 和 GOLD 在不影响健康组的粪便形式的情况下改善了规律性和通便。对于功能性便秘组, GOLD 改善了整体消化参数,缓解了便秘的主要症状,包括用力排便、排泄不完全、手动操作、腹胀、肠气、使用泻药和疼痛。

表 7: 健康组的日常日记、伯明翰 IBS 症状和 IBS 生活质量问卷调查结果的方差分析结果

健康组 (n=19)	方式		方差分析 P 值				事后 P 值	
	处理		洗脱与平均处理 (LdF)		处理差异 (LdF)		洗脱与 L 组	
	洗脱	ACTAZIN™ H	GOLD	洗脱	洗脱	洗脱	ACTAZIN™ L	GOLD
日常日记问卷调查								
每日排便次数	1.12	1.16	1.19	1.30	1.08	0.002	0.918	0.377
希里斯托尔参数	8.61	8.52	8.61	8.62	3.42	0.036	0.805	0.134
用力排便	0.22	0.22	0.24	0.22	0.28	0.044	0.349	0.157
排便不完全	0.14	0.14	0.13	0.17	0.18	0.137	0.432	0.310
腹胀	0.17	0.15	0.13	0.16	0.14	0.497	0.493	0.223
肠胃气胀	0.60	0.64	0.67	0.64	0.58	0.007	0.572	0.511
手动操作	0.00	0.02	0.01	0.02	0.01	0.869	0.339	0.347
泻药	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.785	0.703	0.156
腹痛	0.12	0.11	0.05	0.08	0.08	0.339	0.375	0.021
伯明翰 IBS 症状问卷调查								
便秘	1.73	1.94	1.43	2.06	2.23	0.093	0.243	0.218
肠泻	1.22	1.32	1.43	1.28	1.11	0.222	0.861	0.591
疼痛	1.57	1.11	0.69	0.82	1.10	0.707	0.109	0.037
IBS 生活质量问卷调查								
烦躁不安	8.61	8.36	8.33	8.27	8.38	0.891	0.272	0.134
活动受到干扰	7.39	7.68	7.93	7.42	7.65	0.743	0.604	0.186
身体意象	4.41	4.67	4.45	4.35	4.63	0.114	0.592	0.202
担心健康问题	3.61	3.46	3.60	3.35	3.67	0.667	0.907	0.646
进食	3.87	4.25	4.42	4.25	4.22	0.855	0.063	0.128
社会反应	4.26	4.27	4.33	4.16	4.35	0.874	0.323	0.289
性	2	2	2	2	2			
人际关系	3.09	3.27	3.43	3.05	3.24	0.675	0.058	0.149

响应者 (n=14)

响应者 (n=14)	方式		方差分析 P 值				事后 P 值	
	处理		洗脱与平均处理 (LdF)		处理差异 (LdF)		洗脱与 L 组	
	洗脱	ACTAZIN™ H	GOLD	洗脱	洗脱	洗脱	ACTAZIN™ L	GOLD
日常日记问卷调查								
每日排便次数	1.27	1.35	1.39	1.38	1.18	<0.001	0.999	0.117
表 8: FC 组的日常日记、伯明翰 IBS 症状和 IBS 生活质量问卷调查结果的方差分析结果								
响应者 (n=14)								
便秘与干燥的粪便								
P 值								
ANOVA P 值								
1.90								

	总均值与平均干		干燥之间的差		干燥与干		干燥		ACTAZIN		GOLD3	
	预	后	预	后	预	后	预	后	预	后	预	后
日常日记问卷调查												
每日排便次数	0.96	0.92	0.88	0.89	0.93	0.99	0.99	0.94	0.894	0.479	0.548	0.548
布里斯托尔粪便	3.09	2.48	2.92	2.92	2.78	0.210	0.210	0.215	0.388	0.799	0.457	0.457
腹泻	0.55	0.43	0.38	0.41	0.49	0.321	0.321	0.327	0.433	0.147	0.305	0.305
用力排便	0.52	0.40	0.41	0.39	0.44	0.720	0.720	0.671	0.153	0.957	0.749	0.749
排便不完全	0.69	0.14	0.12	0.14	0.12	0.286	0.286	0.323	0.189	0.958	0.481	0.481
腹胀	0.40	0.52	0.49	0.23	0.43	0.254	0.254	0.228	0.158	0.474	0.015	0.015
排气	0.93	0.94	0.81	0.94	0.87	0.699	0.699	0.115	0.152	0.072	0.140	0.140
手动操作	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.613	0.613	0.967	0.795	0.454	0.673	0.706
泻药	0.27	0.12	0.15	0.12	0.17	0.961	0.961	0.639	0.424	0.316	0.813	0.523
佐明翰 IBS 症状问卷调查												
便秘	6.06	5.65	6.21	4.10	6.19	0.189	0.189	0.261	0.872	0.510	0.982	0.018
腹泻	1.58	1.95	2.20	2.19	2.01	0.873	0.873	0.781	0.441	0.968	0.738	0.872
疼痛	3.06	1.97	2.17	1.42	2.96	0.022	0.022	0.971	0.622	0.070	0.156	0.004
IBS 生活质量问卷调查												
烦躁不安	12.30	11.94	11.12	11.39	11.28	0.963	0.963	0.703	0.524	0.931	0.106	0.252
活动受到干扰	11.53	11.29	10.68	10.54	11.03	0.924	0.924	0.984	0.296	0.582	0.459	0.275
身体形象	8.57	8.51	8.23	7.69	8.81	0.012	0.012	0.887	0.230	0.431	0.122	0.005
身心健康问题	5.74	6.45	6.24	6.24	6.61	0.039	0.039	0.323	0.014	0.626	0.217	0.291
饮食	6.01	6.81	5.87	6.05	5.99	0.586	0.586	0.681	0.975	0.116	0.817	0.905
社会反应	6.89	7.03	6.72	6.91	6.79	0.583	0.583	0.382	0.929	0.326	0.988	0.610
性	2.94	3.00	2.63	2.93	2.99	0.013	0.013	0.239	0.969	0.028	0.920	0.070
人际关系	4.68	4.97	4.25	4.59	4.76	0.449	0.449	0.963	0.773	0.473	0.090	0.571

1.50—两种方式之间的最小显著差异为6%。

实施例7:评估Gold3黄金奇异果粉末对结肠微生物群体的影响的临床试验

[0272] 概述

[0273] 利用实施例5中描述的人体干预研究来确定奇异果源性补充剂对结肠微生物组成和代谢的影响。如上所述,两种奇异果源性补充剂,即绿色新鲜ACTAZIN™ (*Actinidia deliciosa* “Hayward”)和金色新鲜GOLD (*Actinidia chinensis* “Zesy002”Gold3) (新西兰惠

灵顿的Anagenix有限公司(Anagenix Ltd,Wellington,New Zealand))在试验中用作膳食干预。这些胶囊是冷加工的膳食补充剂,被配制成用来维持奇异果固有化合物的完整性。根据上述实施例1进行制备。

[0274] 评估ACTAZIN™(2400mg和600mg)和GOLD(2400mg)奇异果补充剂的结果。在招募的试验者中,健康组有19名参与者,功能性便秘组有9名参与者,每名参与者都以随机交叉方式食用所有处理剂和安慰剂,持续4周,中途穿插2周的洗脱阶段。通过16S rRNA基因测序法测定结肠微生物群组成的变化,并且采用气相色谱法测定代谢终产物。

[0275] 在功能性便秘组中观察到,在补充GOLD之后,普拉梭菌的相对丰度从3.4%显著增加到7.0%($P=0.024$)。普拉梭菌的比例较低通常与胃肠紊乱有关,尤其与炎症性病变紊乱有关。补充GOLD增加了普拉梭菌丰度这一发现为纠正结肠微生物群微生态失调提供了策略,因为普拉梭菌是一种重要的丁酸盐生产者,并且已证明其具有抗炎作用。

[0276] DNA提取、PCR和16S rRNA基因测序

[0277] 将所有粪便样品通过干冰送到北帕默斯顿的植物与食品研究所(Plant&Food Research,Palmerston North),该研究所接收这些样品并将其储存在 -20°C 。将每个样品称取250mg到无菌微管中,并使用MO-BIO PowerSoil®DNA分离试剂盒(#12888,美国加利福尼亚州卡尔斯巴德的MO-BIO实验室公司(MO-BIO Laboratories,Carlsbad,CA,US))从每个样品中提取DNA。

[0278] 使用正向引物Bakt_341F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG(SEQ ID NO:1)和反向引物Bakt_805R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC(SEQ ID NO:2),进行PCR扩增16S rRNA基因的可变区V3-V4(大肠杆菌rRNA基因中的第341至805位)(Herlemann等人,2000年; $W=A/T,H=A/C/T,V=G/C/A,N=G/A/T/C$)。粗体显示的引物序列用于结合目的扩增子区域,其余的引物序列用于结合Illumina®索引接头。

[0279] 每次PCR在50μL总体积中进行,该总体积包括25μL HotStarTaq®Master Mix(澳大利亚墨尔本的快而精公司公司(QIAGEN,Melbourne,Australia))、1μL模板DNA或阴性对照(无菌 H_2O)以及12μL正向引物和12μL反向引物(最终浓度为 $0.1\mu\text{M}$)。PCR条件包括 95°C 预变性15分钟,然后运行以下过程30个循环: 95°C 变性30秒; 55°C 退火30秒, 72°C 延伸30秒,最后 72°C 延伸5分钟。

[0280] 使用QIAquick PCR纯化试剂盒(澳大利亚墨尔本的快而精公司公司(QIAGEN,Melbourne,Australia))对PCR产物进行柱纯化,使用Qubit®2.0荧光计(生命技术公司(Life Technologies™))对PCR产物进行定量分析,并将PCR产物送到新西兰基因组学有限公司(NZGL)的新西兰梅西基因组服务(MGS)。在NZGL,进行第二PCR步骤,对扩增子进行表达库QC检验,并将其稀释和合并。然后将表达库通过三个 $2\times 250\text{bp}$ 的双末端(PE)运行加载到Illumina®MiSeq仪器上。

[0281] 生物信息学

[0282] 通过软件(定量分析微生物生态(QIIME,Quantitative Insights into Microbial Ecology)软件1.8.0版;Caporaso等人,2010年)分析Illumina®MiSeq测序数据。为了将双末端片段拼接成单个连续序列,使用PANDASeq进行,将参数设置为至少重叠40bp,最小长度350bp,最大长度500bp(Masella等人,2012年)。使用USEARCH和UCLUST(Edgar,2010年),基于97%的同一性阈值,从序列中过滤推定的嵌合体,并且将测序片段聚类成操作分类单位(OTU)。

从总测序片段中抽取子样品,以便更快处理样品,并且以每个样品大约15,000bp的测序片段进行归一化,这足以用于系统发育和分类分配(Caporaso等人,2011年;Schloss等人,2012年)。

[0283] 使用PyNAST (Caporaso等人,2010年)并参考Greengenes核心参考数据库(13_8版)(DeSantis等人,2006年)进行序列比对。使用RDP朴素贝叶斯分类器进行分类分配(Wang等人,2007年)。分别对健康组和FC组进行分析,并且通过将每次处理之后每种菌属的平均丰度(八个样品中至少一个中的丰度大于1%)与处理之前的平均值进行比较,确定四种处理中的每一种对微生物群落组成的影响。

[0284] 通过GC定量分析有机酸

[0285] 称取每个粪便样品的一部分(500至1000mg)到干净的管中,并用磷酸盐缓冲液(PBS)以1:10稀释。还包括内标(丁酸乙酯),其最终浓度为5mM。使用如前所述的改良方法通过GC定量分析有机酸(Richardson等人,1989年)。

[0286] 在配备有火焰离子化检测器且装有HP-1柱(美国加利福尼亚州圣克拉拉的安捷伦科技公司(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA))的气相色谱系统(GC-17A,日本京都的岛津公司(Shimadzu, Kyoto, Japan))上进行分析。使用GC溶液色谱数据系统软件(岛津公司(Shimadzu), 2.3版)控制仪器并获取色谱图。对甲酸、乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、乳酸、琥珀酸、异戊酸、戊酸、庚酸和己酸的标准溶液进行分析之后,制作标准曲线。有机酸浓度表示为 $\mu\text{mol/g}$ 粪便。

[0287] 统计分析

[0288] 在R Studio中使用统计包进行统计计算(R Studio, 2012年)。进行威尔科克森符号秩检验(Wilcoxon Signed Rank test),评估分类学在属水平之间的显著差异以及每次处理前后有机酸浓度之间的显著差异。在R Studio(Benjamini和Hochberg, 1995年)的p.adjust函数中使用错误发现率(FDR)方法校正多重比较之后,P值小于0.05被认为是显著的。

实施例8:对结肠微生物群体的处理结果

[0289] 16S rRNA基因测序

[0290] 对扩增自源于粪便样品的细菌DNA的16S rRNA基因的可变区进行高通量测序。这样得到2630万个测序片段。在质量过滤、嵌合体去除和二次采样之后,总共获得了372万个测序片段,平均每个样品获得了14879个(最小14139个至最大14999个)序列。

[0291] 在所有样品中,以97%的序列同一性阈值观察到218种物种水平的种系型。在健康组中,GOLD补充后梭菌目显著增加,从5.0%增至7.6%($P=0.042$) (表9)。在FC组中,经GOLD处理后,普拉梭菌显著增加,从3.4%增至7.0%($P=0.024$),增加了两倍,而经ACTAZIN™H处理后,多尔氏菌属(Dorea)物种从0.9%增加至1.4%($P=0.008$) (表10)。对于FC组,在安慰剂处理周期后,瘤胃球菌属物种从9.9%减少至5.6%($P=0.024$) (表10)。

[0292] 在FC组的食用GOLD的九名参与者中,有八名记录到普拉梭菌的净增加,仅一名观察到轻微的减少(图5B)。当比较健康组和FC组时,观察的属中有许多在不同组之间具有显著差异,最显著的是在健康组中显著更高的拟杆菌属物种和瘤胃球菌科(Ruminococcaceae)以及在FC组显著升高的阿克曼氏菌属(Akkermansia)物种。

[0293] 有机酸产量

[0294] 在本研究中未检测粪便样品中的乳酸盐、甲酸盐和异戊酸盐。在健康组中,经GOLD处理后,己酸盐的浓度显著降低,从 $0.6\mu\text{mol/g}$ 降至 $0.2\mu\text{mol/g}$ ($P=0.030$) (表11)。在FC组

中,经安慰剂处理后,琥珀酸盐的浓度显著降低,从 $2.3\mu\text{mol/g}$ 降至 $1.7\mu\text{mol/g}$ ($P=0.040$) (表12)。在这些处理中的任一种中,有机酸浓度没有其他显著变化。每种处理前后之间的定量差异通常是适度的,除了乙酸盐在一些处理后增加或减少高达 $13\mu\text{mol/g}$ 。

表 9: 健康组中常见细菌群体的相对丰度对处理的反应

	安慰剂		GOLD		ACTAZIN [®] L		ACTAZIN [®] H	
	处理前	处理后	处理前	处理后	处理前	处理后	处理前	处理后
拟杆菌属	18.8±4.0	18.0±3.2	23.1±4.6	22.0±4.2	16.7±3.1	18.4±3.9	19.4±3.2	18.1±3.8
瘤胃球菌科 [†]	16.3±3.4	19.6±3.0	17.4±2.3	17.8±2.5	19.9±2.5	22.2±3.8	18.4±2.6	19.9±3.3
毛螺菌科 [†]	10.8±1.3	11.0±1.5	11.9±1.9	9.5±1.3	11.6±1.6	9.3±1.7	11.6±1.6	11.0±1.4
梭状杆菌属 (<i>Faecalibacterium</i>)	7.0±1.5	5.7±1.0	7.2±1.6	5.3±0.9	6.3±1.6	4.6±0.8	6.7±1.1	6.5±1.6
梭菌目 [†]	5.9±0.9	5.7±1.0	5.0±0.9	7.6±1.1	5.9±0.7	5.0±1.1	6.6±1.2	5.6±0.9
粪球菌属 (<i>Coproccoccus</i>)	6.6±1.0	5.5±0.8	5.9±1.1	5.1±0.7	5.4±0.8	5.2±0.8	5.1±0.8	4.9±0.8
劳特氏菌属 (<i>Blautia</i>)	5.8±0.9	4.7±1.0	4.3±0.6	4.8±1.0	4.7±0.7	6.3±1.7	4.8±1.1	6.1±1.8
瘤胃球菌属	4.9±1.0	6.6±1.6	4.2±0.6	4.4±1.0	6.4±1.0	7.2±1.3	4.1±0.8	5.6±1.2
理研菌科 (<i>Rikenellaceae</i>) [†]	2.8±0.9	2.7±0.7	2.7±0.7	2.9±1.0	2.8±1.0	2.5±0.9	3.0±0.6	3.5±0.8
双歧杆菌属	3.0±1.0	2.3±0.6	2.5±1.2	2.1±0.6	2.0±0.4	3.5±1.1	2.7±0.9	2.6±0.8
拟杆菌目 [†]	2.2±1.0	2.2±0.8	2.0±0.9	1.9±0.8	1.3±0.4	1.2±0.3	2.6±1.1	1.7±0.6
毛螺菌属 (<i>Lachnospira</i>)	1.6±0.5	1.1±0.2	1.3±0.3	1.5±0.5	1.0±0.2	1.1±0.3	1.8±0.5	1.3±0.4
副拟杆菌属 (<i>Parabacteroides</i>)	1.2±0.3	1.6±0.5	1.8±0.6	1.1±0.2	1.3±0.3	1.0±0.2	1.7±0.3	1.5±0.3
柯林斯菌属 (<i>Collinsella</i>)	1.8±0.7	1.2±0.4	0.9±0.4	1.3±0.4	1.6±0.6	1.2±0.3	1.5±0.6	1.1±0.3
阿克曼氏菌属	1.3±0.5	1.4±0.6	1.8±0.7	1.6±0.7	1.6±0.6	1.8±0.5	1.4±0.4	1.0±0.3
螺菌属 (<i>Oscillospira</i>)	1.1±0.2	1.1±0.2	1.1±0.2	1.6±0.3	1.4±0.2	1.5±0.5	1.2±0.1	1.5±0.2
普雷沃氏菌属	1.5±0.7	2.6±1.8	0.8±0.4	2.1±1.5	2.5±1.3	0.7±0.3	0.9±0.5	1.6±0.9

多尔氏菌属	1.2±0.4	1.2±0.3	0.9±0.2	1.4±0.4	1.1±0.2	0.9±0.2	0.8±0.2	1.0±0.2
梭菌科 (<i>Clostridiaceae</i>) [‡]	1.2±0.4	0.9±0.3	0.9±0.2	0.9±0.2	0.8±0.2	1.2±0.4	0.8±0.2	0.9±0.3
未分配	0.8±0.1	1.0±0.2	0.8±0.1	1.0±0.2	0.9±0.1	0.9±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1

Illumina® MiSeq 测序数据显示在至少一个样品中以大于百分之一的丰度存在的属。数据是所有参与者的计算平均值±每个处理周期前后的平均值标准误差 (SEM)。* $P \leq 0.05$ 基于威尔科克森符号秩检验 (Wilcoxon Signed Rank test)。对多重比较进行伪发现率校正之后，与处理前相比显著不同。[‡]一些细菌只能按照秩序或家族水平分类。

表 10: 功能性便秘组中常见细菌群体的相对丰度对处理的反应

	安慰剂		GOLD		ACTAZIN™ L		ACTAZIN™ H	
	处理前	处理后	处理前	处理后	处理前	处理后	处理前	处理后
瘤胃球菌科*	17.2± 2.3	19.9± 2.9	17.1± 3.8	16.3± 2.1	17.9± 2.6	15.0± 2.3	16.5± 3.1	18.8± 2.1
	12.6± 3.1	14.4± 2.2	14.2± 2.6	15.5± 2.6	13.9± 2.2	12.2± 2.5	14.0± 2.9	16.3± 3.1
拟杆菌属	11.4± 1.6	8.0± 2.3	10.0± 2.5	13.9± 3.3	10.8± 3.1	11.0± 2.3	11.7± 2.5	8.7± 2.2
	7.9± 2.8	5.8± 2.1	3.4± 1.0	7.0± 1.1*	4.9± 1.7	5.0± 1.4	7.7± 2.1	3.1± 1.0
梭杆菌属	4.8± 0.6	6.8± 1.7	6.4± 1.3	5.5± 1.1	6.4± 1.2	6.7± 1.7	6.0± 1.4	7.5± 1.8
	6.5± 1.4	6.1± 1.1	6.7± 1.7	6.6± 1.4	6.9± 1.4	8.6± 1.2	6.0± 1.2	7.1± 1.9
类球菌属	6.6± 1.8	3.5± 0.9	7.1± 2.0	6.0± 1.5	6.9± 1.5	7.5± 1.8	5.9± 2.1	5.4± 1.3
	9.9± 2.6	5.6± 1.0*	6.4± 1.4	5.5± 0.7	6.2± 2.0	7.4± 1.5	5.5± 1.1	7.2± 1.3
双歧杆菌属	2.6± 1.3	2.6± 1.0	3.5± 1.5	2.6± 1.0	2.7± 1.5	2.7± 0.9	4.0± 1.6	1.8± 0.8
	2.7± 1.7	4.8± 2.0	5.0± 1.8	2.6± 1.0	3.3± 1.1	3.3± 1.5	3.6± 1.0	5.6± 2.3
阿克曼氏菌属	2.3± 0.6	3.1± 0.6	3.9± 1.2	2.4± 0.5	4.0± 1.1	3.9± 1.3	2.6± 0.7	3.2± 0.9
	1.0± 0.6	1.5± 0.6	2.2± 1.4	1.1± 0.6	1.8± 0.8	1.4± 0.6	2.3± 1.6	2.2± 1.3
普雷氏氏菌属	1.8± 1.1	0.6± 0.3	0.2± 0.1	0.5± 0.3	0.5± 0.3	0.9± 0.5	2.0± 1.1	0.2± 0.1

柯林斯菌属	1.6±0.6	1.2±0.3	1.6±0.4	1.3±0.3	1.2±0.4	1.8±0.7	1.6±0.6	1.4±0.3
未分配	1.0±0.1	1.1±0.1	1.1±0.2	1.0±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1	1.3±0.4	1.0±0.1
副拟杆菌属	1.3±0.4	1.3±0.4	1.2±0.3	1.3±0.4	1.7±0.4	1.2±0.4	1.3±0.4	1.5±0.3
颤螺菌属	1.3±0.1	1.5±0.3	1.6±0.2	1.8±0.3	1.6±0.2	1.5±0.3	1.3±0.2	1.8±0.3
毛螺菌属	1.0±0.5	1.0±0.4	0.6±0.2	1.6±0.9	1.3±0.5	1.2±0.5	1.3±0.6	0.5±0.1
多尔氏菌属	1.5±0.4	1.4±0.3	1.3±0.3	1.2±0.3	1.2±0.3	1.2±0.4	0.9±0.2	1.4±0.3*
红螺菌科 (Cariobacteriaceae)†	0.9±0.3	1.2±0.5	1.5±0.4	1.2±0.5	1.1±0.3	1.1±0.3	0.8±0.2	1.2±0.4
巴氏菌科 (Barnesiellaceae)†	0.9±0.3	4.0±2.4	1.0±0.4	1.0±0.3	1.1±0.3	1.4±0.5	0.8±0.3	0.8±0.3
梭菌科*	0.4±0.1	1.1±0.7	0.9±0.5	1.0±0.7	0.3±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1

11umina MiSeq 测序数据显示在至少一个样品中以大于百分之一的丰度存在的菌属。数据是所有参与者的计算平均值±每个处理期前后的平均值标准误差 (SEM)。* $P \leq 0.05$ -基于威尔科克森符号秩检验 (Wilcoxon Signed Rank test)，对多重比较进行伪发现率校正之后，与处理前相比显著不同。†一些细菌只能按照族序或家族水平分类。

表11:健康组中粪便样品中有机酸浓度对四种处理的反应

	处理前平均值	处理前 SEM	处理后平均值	处理后 SEM	P值	差异
安慰剂						
乙酸盐	36.7	5.8	43.2	5.2	1.00	6.5
丁酸盐	10.5	2.4	13.9	2.6	0.28	3.4
庚酸盐	0.0	0.0	0.0	0.0	0.84	0.0
己酸盐	0.4	0.2	0.6	0.2	0.58	0.2
异丁酸盐	0.6	0.2	0.8	0.2	0.82	0.2
丙酸盐	7.8	1.7	10.6	2.3	0.74	2.8
琥珀酸盐	1.6	0.6	1.0	0.1	0.48	-0.6
戊酸盐	1.5	0.2	2.0	0.3	0.34	0.5
GOLD						
乙酸盐	43.7	5.5	31.4	4.8	0.05	-12.3
丁酸盐	14.2	3.0	9.5	2.7	0.18	-4.7
庚酸盐	0.1	0.1	0.0	0.0	0.20	-0.1
己酸盐	0.6	0.2	0.2	0.1	0.03*	-0.4
异丁酸盐	0.6	0.2	0.4	0.1	0.92	-0.2
丙酸盐	7.0	1.4	6.0	1.4	0.96	-1.0
琥珀酸盐	1.5	0.6	0.9	0.1	1.00	-0.6
戊酸盐	1.6	0.2	1.3	0.1	0.30	-0.3
ACTAZIN™ L						
乙酸盐	42.8	5.9	44.0	6.1	1.00	1.2
丁酸盐	15.3	2.2	13.5	2.2	1.00	-1.8
庚酸盐	0.1	0.1	0.0	0.0	1.00	-0.1
己酸盐	0.7	0.3	0.8	0.3	1.00	0.1
异丁酸盐	0.8	0.3	0.7	0.2	1.00	-0.1
丙酸盐	8.9	1.3	9.9	1.5	1.00	1.0
琥珀酸盐	2.2	0.8	1.1	0.2	0.52	-1.1
戊酸盐	1.7	0.3	1.8	0.2	1.00	0.1
ACTAZIN™ H						
乙酸盐	45.2	6.7	32.8	5.0	0.32	-12.4
丁酸盐	11.9	2.5	10.0	2.4	0.70	-1.9
庚酸盐	0.0	0.0	0.0	0.0	1.00	0.0
己酸盐	0.3	0.1	0.4	0.2	1.00	0.1
异丁酸盐	0.7	0.2	0.5	0.1	0.78	-0.2
丙酸盐	8.5	1.1	7.7	1.7	1.00	-0.8
琥珀酸盐	2.7	1.6	1.1	0.2	1.00	-1.6
戊酸盐	1.5	0.2	1.5	0.2	1.00	0.0

通过气相色谱法 (GC) 测量的水平,以 $\mu\text{mol/g}$ 粪便表示。差异表示处理后是否观察到净增加(正值)或净减少(负值)。* $P \leq 0.05$ -基于威尔科克森符号秩检验 (Wilcoxon signed Rank test),对多重比较进行伪发现率校正之后,与处理前相比显著不同。

表12:功能性便秘组中粪便样品中有机酸浓度对四种处理的反应

	处理前平均值	处理前 SEM	处理后平均值	处理后 SEM	P值	差异
安慰剂						
乙酸盐	33.7	7.2	34.7	3.9	1.00	1.0
丁酸盐	7.0	2.5	5.9	2.1	1.00	-1.1
庚酸盐	0.0	0.0	0.2	0.2	1.00	0.2
己酸盐	0.2	0.1	0.2	0.1	1.00	0.0
异丁酸盐	1.2	0.3	1.5	0.3	1.00	0.3
丙酸盐	8.5	1.5	9.0	1.4	1.00	0.5
琥珀酸盐	2.3	0.3	1.7	0.2	0.04*	-0.6
戊酸盐	1.4	0.3	1.5	0.3	1.00	0.1
GOLD						
乙酸盐	40.5	8.7	39.1	7.4	1.00	-1.4
丁酸盐	8.3	3.8	8.5	2.3	1.00	0.2
庚酸盐	0.0	0.0	0.0	0.0	0.22	0.0
己酸盐	0.1	0.1	0.4	0.2	0.56	0.3
异丁酸盐	1.0	0.3	1.5	0.2	0.72	0.5
丙酸盐	9.2	2.1	10.4	2.2	1.00	1.2
琥珀酸盐	1.7	0.2	1.8	0.2	1.00	0.1
戊酸盐	1.4	0.3	1.8	0.3	1.00	0.4
ACTAZIN™ L						
乙酸盐	35.2	5.4	44.7	10.2	1.00	9.5
丁酸盐	9.4	2.4	10.3	3.1	1.00	0.9
庚酸盐	0.1	0.0	0.1	0.1	1.00	0.0
己酸盐	0.3	0.2	0.7	0.5	1.00	0.4
异丁酸盐	1.6	0.3	1.6	0.3	1.00	0.0
丙酸盐	9.2	1.7	10.5	2.1	1.00	1.3
琥珀酸盐	1.8	0.1	1.7	0.1	0.60	-0.1
戊酸盐	1.9	0.3	2.0	0.3	1.00	0.1
ACTAZIN™ H						
乙酸盐	46.0	10.0	32.3	4.2	0.72	-13.7
丁酸盐	9.5	3.7	4.0	1.2	1.00	-5.5
庚酸盐	0.2	0.2	0.0	0.0	0.28	-0.2
己酸盐	0.3	0.2	0.1	0.0	0.40	-0.2
异丁酸盐	1.2	0.4	1.4	0.3	0.72	0.2
丙酸盐	10.8	3.2	7.5	1.0	1.00	-3.3
琥珀酸盐	2.0	0.2	1.9	0.2	1.00	-0.1
戊酸盐	1.4	0.4	1.3	0.2	1.00	-0.1

通过气相色谱法 (GC) 测量的水平,以 $\mu\text{mol/g}$ 粪便表示。差异表示处理后是否观察到净增加(正值)或净减少(负值)。* $P \leq 0.05$ -基于威尔科克森符号秩检验 (Wilcoxon Signed Rank test),对多重比较进行伪发现率校正之后,与处理前相比显著不同。

[0295] 讨论

[0296] 确定的是,在食用奇异果源性补充剂后,数种细菌群体的丰度发生显著变化。在健康组中,在补充GOLD (Gold3) 后,梭菌目细菌增加2.6%,但这种增长的含义仍在研究中。在

补充基于黄金奇异果的GOLD 4周后,FC组中的普拉梭菌相对丰度显著升高(3.6%)。

[0297] 值得注意的是,普拉梭菌是已知的丁酸盐生产者。丁酸盐是结肠上皮细胞的优选能源,在减轻炎症以及减缓致癌作用、致病菌定殖和氧化应激方面发挥作用(Hamer等人,2008年;Macfarlane和Macfarlane,2011年)。在最近的研究中,证明了施用产生丁酸盐的细菌,酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*),保护小鼠免于葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎(Hudcovic等人,2012年)。因此,增加结肠中普拉梭菌的量可有助于通过提高丁酸盐的生产来缓解胃肠紊乱的症状。

[0298] 由于人类胃肠道包含大约 10^{14} 个微生物细胞(Egert等人,2006年)且普拉梭菌的丰度为约5%(Miquel等人,2013年),这相当于大约五万亿普拉梭菌细胞的浓度,其可对微生物活动和代谢产生明显影响。本研究显示,FC组中所有样品中的普拉梭菌的丰度的总比例为5.6%(FC组中所有样品的平均值,包括所有处理的和洗脱的),而在健康组观察到6.1%。在施用GOLD补充剂之前,FC组中参与者的样品具有3.4%的相对低的普拉梭菌丰度,其在GOLD处理后增加2倍,达到7.0%。在健康组中观察到从7.2%降低至5.3%,这可能是由于基线水平已经很高。在其他研究中已经观察到这一点,其中细菌群体的基线浓度对观察到的响应于饮食干预的效果大小具有实质性影响(Kolida等人,2007年;Tuohy等人,2001年)。

[0299] 处理后,有机酸之间存在微小差异,这可归因于使用粪便样品作为原位测定有机酸组成和浓度的代用品。有机酸浓度在大肠远端下降,这是由于有机酸(特别是丁酸盐)二次发酵、吸收进入血液和/或被结肠细胞利用(Bach等人,2000年)。因此,粪便样品中有机酸的测量结果可能会大大低估原位有机酸的浓度(Millet等人,2010年)。

[0300] 丁酸盐在FC组的参与者的粪便样品中略高,与增加的普拉梭菌丰度一致。未检测研究中任一组的粪便样品中的乳酸盐、甲酸盐和异戊酸盐。在健康个体的粪便样品中通常检测不到高浓度的乳酸盐,因为它是许多代谢网络中的中间体,被微生物群的成员作为正常代谢的一部分消耗(Duncan等人,2004年;Belenguer等人,2011年)。甲酸盐也作为中间体,可转化为甲烷、二氧化碳和水,而且只在发酵的初始阶段产生,通常在近端结肠中(Pryde等人,2002年;Huda-Faujan等人,2010年)。

[0301] 普拉梭菌的良好特征在于其代谢能力和发酵特性,但它是难以在实验室培养的氧敏感细菌(Duncan等人,2002年)。尽管普拉梭菌在肠道中具有数量优势并且具有生产丁酸盐的性质,但尚未将其用于改善消化健康。鉴于在许多胃肠紊乱疾病中观察到普拉梭菌的丰度减少,已经提出,可将普拉梭菌配制为益生菌并且施用于IBS或IBD患者(Sokol等人,2008年;Sartor,2011年)。然而,这项工作仍在进行中。普拉梭菌的氧敏感性使得将其作为益生菌组合物的组分进行配制充满挑战性。

[0302] 源于黄金奇异果的补充剂GOLD提供了选择性刺激共生普拉梭菌增殖的方式,因此被认为对炎症相关的胃肠紊乱特别有用。总之,GOLD改善了功能性便秘参与者体内普拉梭菌减少的生态失调情况。因此,发现Go1d3黄金奇异果粉末可用于利用抗炎效果和较高原位丁酸盐浓度使微生物群恢复至健康状态。

实施例9:用于人类临床试验的微生物组的qPCR分析

[0303] 概要

[0304] 本研究在人类干预研究以及体外发酵实验中对ACTAZIN™(2400mg)和GOLD(2400mg)奇异果补充剂对粪便微生物浓度的影响进行了研究。目的是确定基于奇异果的干

预对样品的微生物组成的影响。通过实时定量聚合酶链反应 (qPCR) 测定结肠微生物群组成的变化,其补充了先前获得的现有16S rRNA基因测序数据。参见上面的实施例7和8。

[0305] 实时qPCR是用于研究胃肠道微生物生态学的常用方法。它已被广泛应用于许多研究中,并且可给出微生物数量的定量指示。在Roche LightCycler®480仪器上进行定量。除了总细菌外,单独定量的细菌群体为球形梭菌类群、毛螺菌科、拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属类群、双歧杆菌、乳杆菌和普拉梭菌。还针对体外发酵工作对上述细菌群体进行了定量,先前检测的乳杆菌除外。

[0306] 在功能性便秘组中,普拉梭菌的浓度随GOLD补充而增加,只是没有统计学意义。普拉梭菌的比例较低通常与胃肠紊乱有关,尤其与炎症性病变紊乱有关。GOLD补充增加普拉梭菌浓度的发现与测序数据中发现的丰度显著增加一致,并且为食用GOLD的益生元效果提供支持。

背景技术

[0307]

[0308] 已证实绿色奇异果改善胃肠道健康的多个方面,包括改变结肠环境的微生物生态 (Blatchford等人,2015a;Blatchford等人,2015b;Parkar等人,2012年)。这些益处被认为是源于耐消化碳水化合物 (DRC)、多酚和维生素C的固有水平 (Chan等人,2007年;Ferguson和Ferguson,2003年)。黄金奇异果的益处尚未明确。本研究详细介绍了使用来自现有人类临床试验 (实施例5中所述) 的样品进行的实验。随机双盲安慰剂对照交叉试验,研究了两种源于奇异果的成分ACTAZIN™ (绿色奇异果) 和GOLD (Gold3黄金奇异果) 对消化健康的作用。

[0309] 在初始试验中测量的主要终点是排便频率、粪便形式和生活质量评分。参见实施例5和6。次要终点包括测量短链脂肪酸 (SCFAs),并且还使用16S rRNA基因测序来测量粪便微生物群体相对丰度的变化。16S rRNA基因测序分析 (以相对丰度百分数的形式) 给出了样品的微生物生态学特征的整体情况,但没有定量的结果。参见上面的实施例7和8。

[0310] 因此,将得自初始试验的以下DNA样品用于本试验:(之前和之后)GOLD 2400mg干预样品 (n=52)、ACTAZIN™ 2400mg干预样品 (n=52) 和安慰剂样品 (n=52)。这些样品用于使用qPCR确定选择细菌群体的浓度,其产生样品中细菌浓度的定量测量。

[0311] 材料和方法

[0312] 如实施例5所详述,研究设计是随机双盲安慰剂对照交叉试验,参与者在四周里接受四种不同的处理,每次处理之间有两周洗脱。这些干预物在被配制成外表一样的4×600mg胶囊中递送,以保持盲法处理,如下表13所示。也参见实施例5。如上所述,粉末成分分别由新西兰绿色奇异果和黄金奇异果制备。参见实施例1和5。

表13:干预组合物说明

干预	组合物	剂量	递送 (胶囊) /天
ACTAZIN	绿色奇异果粉末	2400mg	4×ACTAZIN™
GOLD	黄金奇异果粉末	2400mg	4×GOLD
安慰剂	绿色异麦芽酮糖醇 (E102、E142)	2400mg	4×安慰剂

[0313] 选择细菌用作所评估的七个细菌群体各自的代表属(表14)。除非另有说明,否则使用用丁基橡胶塞子密封的Hungate管让所有分离物在37℃下无氧生长过夜。除非另有说明,否则所有的培养基都得自奥克索伊德有限公司(Oxoid)(澳大利亚阿德莱德(Adelaide,Australia))。

[0314] 罗伊氏乳杆菌(DPC 16)在de Man-Rogosa-Sharpe (MRS)肉汤中生长;两岐双岐杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) (DSM 20082)在补充有0.05% (w/v) L-半胱氨酸盐酸盐(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))的MRS肉汤中生长;肠道罗斯拜瑞氏菌(DSM 14610)在瘤胃细菌培养基(DSMZ Medium 330)中生长;多对毛螺菌(*Lachnospira multipara*) (ATCC 19207)在补充有过滤的瘤胃液的RM02培养基中(Leahy等人,2010年)生长;脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*) (ATCC 25285)在补充0.05% (w/v) L-半胱氨酸盐酸盐(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))的Wilkins-Chalgren厌氧肉汤中生长2天;普拉梭菌(DSM 17677)在补充有0.5% (w/v) 酵母提取物、0.0005% (w/v) 氯高铁血红素(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))、0.0005% (w/v) 维生素K(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))和0.2% L-半胱氨酸盐酸盐(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))的脑心浸液(BHI)肉汤中生长;大肠杆菌(Nissle)在37℃下在胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)中有氧生长。

表 14：所用引物表-基于 16S rDNA 序列的设计

目标细菌	细菌标准	引物序列(5' →3')	退火温度 (°C)	退火时间 (s)	参考文献
总细菌	大肠杆菌 K12ssle	Fwd: SEQ ID NO:3 TCCTACGGGAGCGCAGT Rev: SEQ ID NO:4 GGACTACCAGGGTATCTAATCCGT	60	60	(Nadkarni 2002)
		Fwd: SEQ ID NO:5 GGGTGGTAATGCCGGATG Rev: SEQ ID NO:6 CCACCGTTACACCCGGAA			
双歧杆菌	两歧双歧杆菌 DSM 20082	Fwd: SEQ ID NO:7 CCATGACGTGCTAGGCTGTGGA Rev: SEQ ID NO:8 CAAGATGTCACACCTGGTAAG	60	30	(Yu 等人 2006)
乳杆菌	罗伊氏乳杆菌 DPC16	Fwd: SEQ ID NO:9 GGTGTGGGCTTAAGTGCCAT Rev: SEQ ID NO:10 CGGATGTAAGGCGCGTGC	63	20	(Rinttila 2004)
拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属	脆弱拟杆菌 ATCC 25285	Fwd: SEQ ID NO:11 GGAGGAAGAAGGTCTTCGG Rev: SEQ ID NO:12 AATTCGCGCTACCTTGCCT	60	20	(Ramirez-Farias 等人 2009)
普氏梭菌	普氏梭菌 DSM 17677	Fwd: SEQ ID NO:13 AAATGACGGTACCTGACTAA Rev: SEQ ID NO:14	50	30	(Matsuki 2002)
球形梭菌属类群	肠结罗斯氏梭菌 DSM 14610				

毛螺菌科	多对毛螺菌 ATCC 19207	CTTTGAGTTTCATTCTTGGAA	Fwd: SEQ ID NO: 15 GACCGTACCTGACTAAGAAGC Rev: SEQ ID NO: 16 AGTTTCATTCTTGGAAAGT	63	30	(Patari 2014)	等人
------	---------------------	-----------------------	--	----	----	------------------	----

[0315] 使用SnapGene® 软件进行计算机分析,评估每种标准菌株对引物的特异性(www.snapgene.com)。使用Neubauer血球计测定细胞密度,根据需要将培养物稀释或浓缩

至 1.0×10^8 或 1.0×10^9 个细胞/mL。然后使用MO-BIO PowerSoil® DNA分离试剂盒 (MO-BIO PowerSoil® DNA Isolation Kit) (美国加利福尼亚州卡尔斯巴德的MO-BIO实验室公司 (MO-BIO Laboratories, Carlsbad, CA, US), US#12888) 提取DNA。使用代表各个群体的细菌菌株的稀释系列构建标准曲线。样品和标准物在Roche LightCycler® 480实时PCR仪器上通过绝对定量一式三份运行分析。Roche SYBR Green I Master Mix (04707516001) 检测化学用于检测双链DNA扩增。总反应体积为20 μ L, 由10 μ L SyBr Green I Master mix、4 μ L正向引物 ($5 \times 2.5 \mu$ M浓缩物)、4 μ L反向引物 ($5 \times 2.5 \mu$ M浓缩物) 和2 μ L DNA模板或无菌水构成 (无模板对照)。

[0316] 每次qPCR运行包括一个激活循环 (95 $^{\circ}$ C) 5分钟、32个至40个运行循环 (包括95 $^{\circ}$ C (30s) 下的变性步骤, 如表14中的退火步骤和在72 $^{\circ}$ C下1min的延伸步骤) 以及一次熔融曲线循环 (60至95 $^{\circ}$ C, 0.1 $^{\circ}$ C/秒, 连续荧光采集), 随后是40 $^{\circ}$ C下的冷却循环。熔解曲线T_m调用循环使得目标产物和非特异性双链产物诸如引物二聚体之间能够产生差异。引物在PCR级水中稀释至2.5 μ M的浓度。然后以1:5将其稀释, 以在PCR反应中获得0.5 μ M浓缩溶液。

[0317] 在R中使用统计包进行统计计算 (R开发核心团队 (R Development Core Team), 2008年)。进行威尔科克森符号秩检验 (Wilcoxon Signed Rank test), 以评估每次处理前后的显著差异。对于体外发酵, 通过将时刻0与其他时间点进行比较来确定显著差异。在R Studio (Benjamini和Hochberg, 1995年) 的p.adjust函数中使用伪发现率 (FDR) 方法校正多重比较之后, P值小于0.05被认为是显著的。

实施例10: 人类临床试验中微生物组的qPCR分析结果

[0318] qPCR数据的结果描述了所评估的每个细菌群体随时间推移的相对稳定的微生物分布。每次处理后均观察到中度升高或降低。表15示出了展示在健康组的每个处理周期之前和之后细菌群体和平均值标准误差 (SEM) 的LightCycler® 480qPCR数据, 其中将细菌群体表示为在每克粪便样品中所计算的16S rRNA基因的平均拷贝数 (转换的对数)。表16示出了展示在功能性便秘组的每个处理周期之前和之后细菌群体和平均值标准误差 (SEM) 的LightCycler® 480qPCR数据, 其中将细菌群体表示为在每克粪便样品中所计算的16S rRNA基因的平均拷贝数 (转换的对数)。

[0319] 如表15和图6所示, 在GOLD处理后的健康组中, 观察到总细菌、球形梭菌、毛螺菌科、乳杆菌、双歧杆菌和拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属类群的中度增加, 而普拉梭菌的浓度保持不变。补充ACTAZIN™时, 总细菌、拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属、乳杆菌、双歧杆菌和普拉梭菌类群略有下降, 而球形梭菌类群保持不变, 毛螺菌科类群略有增加。安慰剂处理显示, 总细菌和拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属的浓度升高, 球形梭菌、毛螺菌科、乳杆菌、双歧杆菌和普拉梭菌类群的浓度稍有降低。

[0320] 如表16和图7所示, 在GOLD处理后的功能性便秘组中, 观察到总细菌、球形梭菌、毛螺菌科、拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属和乳杆菌类群的中度增加, 以及双歧杆菌属物种的略微降低。普拉梭菌的浓度增加最多, 从对数7.03增至7.45, 几乎达到显著 ($P=0.0503$), 并且与16S rRNA基因测序数据中报道的类似升高一致。实际数量的增量为2.319亿16S rRNA基因拷贝数, 即在GOLD处理后增加了179%。经ACTAZIN™处理后, 在所有细菌群体中都观察到了减少。九名功能性便秘参与者中有八名显示, 经过GOLD处理后, 普拉梭菌水平上升。参见图5C。安慰剂处理显示, 除了毛螺菌科保持不变以外, 其他所有细菌群体的浓

度升高。

表 15: 健康组的 LightCycler® 480 qPCR 数据

	GOLD					
	处理前平均 值	处理后 SEM	处理后平均 值	处理后 SEM	p 值	fdr p 值
总细菌	9.63	0.17	9.77	0.09	0.99	1.00
球形梭菌属类群	8.91	0.21	9.03	0.15	0.84	1.00
毛螺菌科类群	7.42	0.18	7.53	0.12	0.81	1.00
拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属类群	7.44	0.17	7.59	0.13	0.44	0.88
乳杆菌属物种	7.59	0.14	7.63	0.13	0.95	1.00
双歧杆菌属物种	6.36	0.23	6.42	0.19	0.99	1.00
普拉梭菌	6.87	0.18	6.87	0.13	0.72	1.00
ACTAZIN [®]						
总细菌	9.79	0.09	9.69	0.17	0.98	1.00
球形梭菌属类群	8.79	0.11	8.79	0.22	0.56	1.00
毛螺菌科类群	7.51	0.08	7.52	0.12	0.91	1.00
拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属类群	7.6	0.1	7.43	0.16	0.60	1.00
乳杆菌属物种	7.53	0.07	7.44	0.14	0.91	1.00
双歧杆菌属物种	6.49	0.18	6.41	0.24	0.90	1.00
普拉梭菌	6.97	0.12	6.78	0.21	0.31	0.62
安慰剂						
总细菌	9.71	0.17	9.74	0.1	0.82	1.00
球形梭菌属类群	8.98	0.22	8.87	0.19	0.35	0.70
毛螺菌科类群	7.56	0.2	7.47	0.15	0.51	1.00
拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属类群	7.47	0.18	7.56	0.14	0.87	1.00
乳杆菌属物种	7.62	0.19	7.6	0.13	0.66	1.00
双歧杆菌属物种	6.59	0.22	6.55	0.18	0.56	1.00

普拉梭菌	6.91	0.21	6.83	0.17	0.60	1.00
------	------	------	------	------	------	------

表 16: 功能性便秘组的 LightCycler® 480 qPCR 数据

	GOLD					
	处理前平均值	处理后 SEM	处理后平均值	处理后 SEM	p 值	Fdr p 值
总细菌	10.01	0.09	10.21	0.07	0.16	0.32
球形梭菌属类群	9.35	0.17	9.5	0.16	0.86	1.00
毛螺菌科类群	7.85	0.11	7.96	0.11	1.00	1.00
拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属类群	7.65	0.15	7.88	0.15	0.22	0.44
乳杆菌属物种	7.64	0.11	7.79	0.07	0.49	0.98
双歧杆菌属物种	6.76	0.3	6.64	0.35	0.80	1.00
普拉梭菌	7.03	0.16	7.45	0.13	0.05	0.10
ACTAZIN™						
总细菌	10.13	0.15	9.98	0.11	0.34	0.68
球形梭菌属类群	9.11	0.2	8.93	0.19	0.60	1.00
毛螺菌科类群	7.78	0.19	7.56	0.17	0.55	1.00
拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属类群	7.82	0.17	7.5	0.13	0.16	0.32
乳杆菌属物种	7.75	0.15	7.67	0.12	0.73	1.00
双歧杆菌属物种	6.95	0.15	6.43	0.27	0.22	0.44
普拉梭菌	7.19	0.29	6.86	0.2	0.33	0.66
安慰剂						
总细菌	9.96	0.16	10.08	0.12	0.49	0.98
球形梭菌属类群	9.23	0.2	9.35	0.17	0.60	1.00
毛螺菌科类群	7.8	0.17	7.8	0.17	1.00	1.00

拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属类群	7.65	0.24	7.84	0.15	0.49	0.98
乳杆菌属物种	7.24	0.1	7.29	0.12	0.93	1.00
双歧杆菌属物种	6.53	0.32	6.93	0.26	0.26	0.52
普拉梭菌	7.12	0.29	7.16	0.26	0.73	1.00

[0321] 图6和图7分别用图表展示了健康组和功能便秘组的对数转换和自然数据形式的细菌浓度数据。以这种形式查看数据突显出了粪便微生物群的组成随时间变化的稳定程

度。

[0322] 应当注意,拟杆菌属-普雷沃氏菌属-卟啉单胞菌属类群中的细菌在人类结肠群落中构成了相当大的主要降解者集合。它们利用专门的清除机制在获取未吸收的碳水化合物方面发挥重要作用。这些细菌主要是纤维素、淀粉、菊粉和木聚糖降解者,诸如多形拟杆菌、卵形拟杆菌和解纤维素拟杆菌(Flint等人,2008年;Walker等人,2008年)。肠道罗斯拜瑞氏菌、食葡萄糖罗斯拜瑞氏菌、布氏瘤胃球菌和生黄瘤胃球菌也是关键的降解者,它们是球形梭菌属类群的成员(Kurakawa等人,2015年)。

[0323] 球形梭菌属类群构成结肠中最大的细菌亚群,通常占总细菌丰度的25%-60%(Hold等人,2002年),并且由大部分的丁酸盐生产者构成(Louis和Flint,2009年)。已经证明具有益生菌状态的两种主要微生物是双歧杆菌和乳杆菌。双歧杆菌通常与健康微生物群有关,是乙酸盐生产者,可对宿主健康具有有益作用。乳杆菌由一群乳酸共生细菌组成,这些共生细菌已经在乳制品生产中应用了几个世纪,并且已经在数百个关于其益生菌功效的试验中进行了研究(Reid,1999年)。

[0324] 在补充基于Gold3黄金奇异果的GOLD 4周之后,普拉梭菌浓度的增加接近显著($P=0.0503$)。普拉梭菌是人类胃肠道中数量最多的物种之一,通常观察到其占健康成年人结肠微生物群的总比例的5%以上(Miquel等人,2013年)。普拉梭菌属于厚壁菌门,是人类大肠中的共生细菌,已证实其具有体内抗炎特性(Furet等人,2010年;Sokol等人,2009年)。普拉梭菌产生丁酸盐(由于碳水化合物发酵)以及乳酸盐和甲酸盐(Duncan等人,2002年;Duncan等人,2004年)。丁酸盐是结肠上皮细胞的优选能源,在减轻炎症以及减缓致癌作用、致病菌定殖和氧化应激方面发挥作用(Hamer等人,2008年;Macfarlane和Macfarlane,2011年)。GOLD选择性地刺激共生普拉梭菌的增殖,因此可被认为有助于炎症相关的胃肠紊乱。

[0325] 综上所述,qPCR数据证实了微生物相对丰度数据,并且表明Gold3黄金奇异果源性补充剂增加了功能性便秘参与者的普拉梭菌浓度。这证明了结果是有益的,因为已知普拉梭菌在大肠中生长并且在肠道中产生具有保护功能/健康益处的丁酸盐。

[0326] 这些结果被认为是非常重要的,因为普拉梭菌对氧极为敏感(Rigottier-Gois,2013年),将其作为益生菌剂配制和储存具有挑战性。因此,本发明的黄金奇异果组合物提供了增加普拉梭菌水平的高效和有效方式,而以其他方式很难调节普拉梭菌水平。

[0327] 本领域普通技术人员可利用本文的公开内容和教导内容来产生其他实施方案和变型而无需进行过度实验。所有这些实施方案和变型均被认为是本发明的部分。

[0328] 因此,本领域普通技术人员通过本公开将容易理解,根据本发明的这些相关实施方案,可利用发挥与本文所述的实施方案基本相同的功能或实现与本文所述的实施方案基本相同的结果的后续修改形式、替换形式和/或变化形式。因此,本发明旨在在其范围内涵盖本文公开的过程、制造、物质的组合物、化合物、方式、方法和/或步骤的修改形式、替换形式和/或变化形式。

参考文献

[0329] Abdollahi-Roodsaz S,Joosten LA,Koenders MI,Devesa I,Roelofs MF,Radstake TR,Heuvelmans-Jacobs M,Akira S,Nicklin MJ,Ribeiro-Dias F,van den Berg WB 2008.Stimulation of TLR2and TLR4differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis.Journal of Clinical Investigation 118(1):

205-16.

[0330] Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC 2012. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 129(2):434-40, 440e1-2.

[0331] Adaim A. 2010. Investigating the effect of gold kiwifruit consumption on the incidence and symptoms of upper respiratory tract infections in preschool children: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Masters of Sciences in Human Nutrition and Human Health, Massey University, Auckland, New Zealand.

[0332] Attaluri A, Donahoe R, Valestin J, Brown K, Rao SSC 2011. Randomised clinical trial: dried plums (prunes) vs. psyllium for constipation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 33(7):822-828.

[0333] Bach Knudsen KE, Jørgensen H, Canibe N. Quantification of the absorption of nutrients derived from carbohydrate assimilation: model experiment with catheterised pigs fed on wheat- or oat-based rolls. *The British Journal of Nutrition*. 2000;84:449-58.

[0334] Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307:1915-20.

[0335] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate—a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B—Methodological*. 1995;57:289-300.

[0336] Belenguer A, Holtrop G, Duncan SH, Anderson SE, Calder AG, Flint HJ, et al. Rates of production and utilization of lactate by microbial communities from the human colon. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011;77:107-19.

[0337] Bentley-Hewitt KL, Blatchford PA, Parkar SG, Ansell J, Pernthaner A. Digested and fermented green kiwifruit increases human beta-defensin 1 and 2 production in vitro. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2012;67:208-14.

[0338] Blatchford P, Bentley-Hewitt KL, Stoklosinski H, McGhie T, Gearry R, Gibson G, Ansell J 2015a. In vitro characterisation of the fermentation profile and prebiotic capacity of gold-fleshed kiwifruit. *Benef Microbes* pages 1-12. Published online at DOI: <http://dx.doi.org/10.3920/BM2015.0006>.

[0339] Blatchford P, Stoklosinski H, Walton G, Swann J, Gibson G, Gearry R, Ansell J 2015b. Kiwifruit fermentation drives positive gut microbial and metabolic changes irrespective of initial microbiota composition. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 6(1):37-45.

[0340] Boland, M. J., Hardman, M. J. 1972. Kinetic studies on the thiol protease from *Actinidia chinensis*. *FEBS Letters*, 27(2):282-284.

[0341] Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central

GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:16050-5.

[0342] Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13:790-801.

[0343] Candela M, Rampelli S, Turrone S, Severgnini M, Consolandi C, De Bellis G, et al. Unbalance of intestinal microbiota in atopic children. *BMC Microbiology*. 2012;12:95.

[0344] Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*. 2010;26:266-7.

[0345] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010;7:335-6.

[0346] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 Suppl 1:4516-22.

[0347] Cardona F, Andres-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuno MI. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24:1415-1422.

[0348] Chan AO, Leung G, Tong T, Wong NY. Increasing dietary fiber intake in terms of kiwifruit improves constipation in Chinese patients. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2007;13:4771-5.

[0349] Chang C, Lin T, Lu Y, Liu T, Liu J. 2010. Kiwifruit improves bowel function in patients with irritable bowel syndrome with constipation. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 19(4):451-457.

[0350] Chassard, C, Dapoigny, M, Scott, KP, Crouzet, L, Del'homme, C, Marquet, P, Martin, JC, Pickering, G, Ardid, D, Eschalier, A, Dubray, C, Flint, HJ and Bernalier-Donadille, A. 2012. Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 35:828-838.

[0351] Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. 2012. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PloS One* 7(6):e39743.

[0352] DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72:5069-72.

[0353] de Sousa Moraes LF, Grzeskowiak LM, de Sales Teixeira TF, Gouveia

Peluzio Mdo C 2014. Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. *Clinical Microbiology Reviews* 27 (3):482-9.

[0354] de Vos WM, de Vos EA 2012. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutrition Reviews* 70 Suppl 1:S45-56.

[0355] de Weerth C, Fuentes S, Puylaert P, de Vos WM 2013. Intestinal microbiota of infants with colic: development and specific signatures. *Pediatrics* 131 (2): e550-8.

[0356] Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG 2008. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of Psychiatric Research* 43 (2):164-74.

[0357] Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology*. 2006;130:1377-90.

[0358] Drummond L. 2013. The composition and nutritional value of kiwifruit. *Advances in Food and Nutrition Research* 68:33-57.

[0359] Drummond L, Gearry RB. 2013. Kiwifruit modulation of gastrointestinal motility. *Advances in Food and Nutrition Research* 68:219-232.

[0360] Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJ, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002;52:2141-6.

[0361] Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;70:5810-7.

[0362] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010;26:2460-1.

[0363] Egert M, de Graaf AA, Smidt H, de Vos WM, Venema K. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. *Trends in Microbiology*. 2006;14:86-91.

[0364] Eidenberger T, Selg M, Fuerst S, Krennhuber K. 2014. In-vitro inhibition of human lipase PS by polyphenols from kiwi fruit. *Journal of Food Research*. 3 (4):71-77.

[0365] Ferguson AR, Ferguson LR. Are kiwifruit really good for you? In: Huang HW, editor. *Proceedings of the Fifth International Symposium on Kiwifruit*. 2003. 131-8.

[0366] Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol* 6 (2):121-31.

[0367] Fu CJ, Carter JN, Li Y, Porter JH, Kerley MS 2006. Comparison of agar

plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces. *Letters in Applied Microbiology* 42(5):490-494.

[0368] Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, Kasumi E, Bamba S, Fujiyama Y, Andoh A 2013. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 28(4):613-9.

[0369] Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouilliot JL, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*. 2010;59:3049-57.

[0370] Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, Gareau M, Murphy EF, Sulnier D, Loh G, MacFarlane S, Delzenne N, Ringel Y, Kozianowski G, Dickmann R, Lenoir-Wijnkoop I, Walker C, Buddington R. 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 7:1-19.

[0371] Geurts L, Neyrinck AM, Delzenne NM, Knauf C, Cani PD. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Beneficial Microbes*. 2014;5:3-17.

[0372] Gostner A, Blaut M, Schaffer V, Kozianowski G, Theis S, Klingenberg M, et al. Effect of isomalt consumption on faecal microflora and colonic metabolism in healthy volunteers. *Br. J. Nutr.* 2006;95:40-50.

[0373] Guidance for industry: irritable bowel syndrome-clinical evaluation of drugs for treatment. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM205269.pdf>

[0374] Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: The role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2008; 27:104-19.

[0375] Hazenberg MP, van de Merwe JP, Pena AS, Pennock-Schroder AM, van Lieshout LM. Antibodies to *Coprococcus* comes in sera of patients with Crohn's disease. Isolation and purification of the agglutinating antigen tested with an ELISA technique. *Journal of Clinical & Laboratory Immunology*. 1987;23:143-8.

[0376] Herlemann DPR, Labrenz M, Juergens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME Journal*. 2011;5:1571-9.

[0377] Hold GL, Pryde SE, Russell VJ, Furrie E, Flint HJ 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 39(1):33-9.

- [0378] Huda-Faujan N, Abdulamir AS, Fatimah AB, Anas OM, Shuhaimi M, Yazid AM, et al. The impact of the level of the intestinal short chain fattyacids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. *TheOpen Biochemistry Journal*. 2010;4:53-8.
- [0379] Hudcovic T, Kolinska J, Klepetar J, Stepankova R, Rezanka T, Srutkova D, et al. Protective effect of *Clostridium tyrobutyricum* in acute dextran sodium sulphate-induced colitis: differential regulation of tumournecrosis factor-alpha and interleukin-18 in BALB/c and severe combined immunodeficiency mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 2012;167:356-65.
- [0380] Husebye E, Hellström PM, Sundler F, Chen J, and Midtvedt T. 2001. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology* 280:G368-G380.
- [0381] Hunter DC, Skinner MA, Wolber FM, Booth CL, Loh JMS, Wohlers M, Stevenson LM, Kruger MC. 2012. Consumption of gold kiwifruit reduces severity and duration of selected upper respiratory tract infection symptoms and increases plasma vitamin C concentration in healthy older adults. *British Journal of Nutrition* 108:1235-1245.
- [0382] Jeffery IB, O'Toole PW, Ohman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EM, Simren M 2012. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 61(7):997-1006.
- [0383] Kalliomaki M, Satokari R, Lahteenoja H, Vahamiko S, Gronlund J, Routi T, Salminen S 2012. Expression of microbiota, Toll-like receptors, and their regulators in the small intestinal mucosa in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 54(6):727-32.
- [0384] L Kaur, SM Rutherford, PJ Moughan, L Drummond, and MJ Boland. 2010. Actinidin enhances protein digestion in the small intestine as assessed using an in vitro digestion model, *J. Agric. Food Chem.* 58(8):5074-5080.
- [0385] Khalif IL, Quigley EMM, Konovitch EA and Maximova ID. 2005. Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. *Digestive and Liver Disease* 37:838-849.
- [0386] Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warriar M, Brown JM, Krauss RM, Tang WH, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL 2013. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine* 19(5):576-85.
- [0387] Kok RG, DeWaal A, Schut F, Welling GW, Weenk G, Hellingwerf KJ 1996. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in

infant feces. *Applied and Environmental Microbiology* 62(10):3668–3672.

[0388] Kolida S, Gibson GR. 2007. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *The Journal of Nutrition*, 137(11):2503S–2506S.

[0389] Kolida S, Meyer D, Gibson GR. A double-blind placebo-controlled study to establish the bifidogenic dose of inulin in healthy humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2007; 61:1189–95.

[0390] Koren O, Spor A, Felin J, Fak F, Stombaugh J, Tremaroli V, Behre CJ, Knight R, Fagerberg B, Ley RE, Backhed F 2011. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108Suppl 1:4592–8.

[0391] Kurakawa T, Ogata K, Matsuda K, Tsuji H, Kubota H, Takada T, Kado Y, Asahara T, Takahashi T, Nomoto K 2015. Diversity of Intestinal *Clostridium coccoides* group in the Japanese population, as demonstrated by reverse transcription-quantitative PCR. *PLoS One* 10(5):e0126226.

[0392] Leahy SC, Kelly WJ, Altermann E, Ronimus RS, Yeoman CJ, Pacheco DM, Li D, Kong Z, McTavish S, Sang C, Lambie SC, Janssen PH, Dey D, Attwood GT 2010. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. *PLoS One* 5(1).

[0393] Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK 2011. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108Suppl 1:4615–22.

[0394] Lepage P, Hasler R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, Ott S, Kupcinskas L, Dore J, Raedler A, Schreiber S 2011. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 141(1):227–36.

[0395] Leung L, Riutta T, Kotecha J, Rosser W. 2011. Chronic constipation: An evidence-based review. *The Journal of the American Board of Family Medicine* 24(4):436–451.

[0396] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI 2006. Microbial ecology—Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444(7122):1022–1023.

[0397] Liu LWC. 2011. Chronic constipation: current treatment options. *Canadian Journal of Gastroenterology* 25(Suppl B):22B–28B.

[0398] Louis P, Flint HJ 2009. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 294(1):1–8.

[0399] Maccaferri S, Candela M, Turrone S, Centanni M, Severgnini M, Consolandi C, Cavina P, Brigidi P 2012. IBS-associated phylogenetic unbalances of the

intestinal microbiota are not reverted by probioticsupplementation.Gut Microbes 3(5):406-13.

[0400] Macfarlane GT,Macfarlane S.Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution ofprebiotics.J.Clin.Gastroenterol.2011;45Suppl:S120-7.

[0401] R Maddumage,NJ Nieuwenhuizen,SM Bulley,JM Cooney,SA Green,RG Atkinson.2013.Diversity and relative levels of actinidin,kiwellin,and thaumatin-like allergens in 15 varieties of kiwifruit (Actinidia).J.Agric.Food Chem.61:728-739.

[0402] Masella AP,Bartram AK,Truszkowski JM,Brown DG,Neufeld JD.PANDAseq: PAired-eND Assembler for Illumina sequences.BMC Bioinformatics.2012;13:31.

[0403] Matsuki T,Watanabe K,Fujimoto J,Miyamoto Y,Takada T,Matsumoto K, Oyaizu H,Tanaka R 2002.Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces.Appl Environ Microbiol68(11):5445-51.

[0404] Metcalf AM,Phillips SF,Zinsmeister AR,MacCarty RL,Beart RW,Wolff BG.Simplified assessment of segmental colonictransit.Gastroenterology.1987; 92:40-7.

[0405] Millet S, Van Oeckel MJ,Aluwe M,Delezie E,De Brabander DL.Prediction of in vivo short-chain fatty acid production in hindgut fermenting mammals: problems and pitfalls.Crit.Rev.Food Sci.Nutr.2010;50:605-19.

[0406] Miquel S,Martin R,Rossi O,Bermudez-Humaran LG,Chatel JM,Sokol H,et al.Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health.Current Opinion in Microbiology.2013;16:255-61.

[0407] Monroe JA,Mishra S,Venn B.2010.Baselines representing blood glucose clearance improve in vitro prediction of the glycaemic impact of customarily consumed food quantities.British Journal of Nutrition,103(2):295-305.

[0408] Murata Y,Ohmori H,Ichikawa M,Harada A,Agari M,Fukuba H,Yamasaki M, Yasuzawa M,Takemoto M,Ikeda M,Matsumoto N,Tamura T,Sumimoto R,Namba K 2013.Fecal microbiota and fecal characteristics of patients with Parkinson's disease.Journal of Intestinal Microbiology 27(4):211-215.

[0409] Nadkarni MA,Martin FE,Jacques NA,Hunter N 2002.Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal)probe and primers set.Microbiology-Sgm 148:257-266.

[0410] Neufeld KM,Kang N,Bienenstock J,Foster JA 2011.Reduced anxiety-like behavior and centralneurochemical change in germ-free mice.Neurogastroenterology and Motility 23(3):255-64,e119.

[0411] NJ Nieuwenhuizen,R Maddumage,GK Tsang,LG Fraser,JM Cooney,HN De Silva,S Green,KA Richardson,RG Atkinson.2012.Mapping,complementation,and

targets of the cysteine protease actinidin in kiwifruit. *Plant Physiology* 158 (1):376–388.

[0412] Parkar SG, Rosendale D, Paturi G, Herath TD, Stoklosinski H, Phipps JE, et al. In vitro utilization of gold and green kiwifruit oligosaccharides by human gut microbial populations. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2012;67:200–7.

[0413] Parnell JA, Reimer RA. Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. *The British Journal of Nutrition*. 2012;107:601–13.

[0414] Paturi G, Butts CA, Bentley-Hewitt KL, Ansell J 2014. Influence of green and gold kiwifruit on indices of large bowel function in healthy rats. *J Food Sci* 79 (8):H1611–20.

[0415] Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*. 2002;217:133–9.

[0416] Qin JJ, Li RQ, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464:59–U70.

[0417] R Development Core Team 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria..

[0418] RStudio. RStudio: Integrated development environment for R (Version 0.97.551) Computer software. Boston, MA. <http://www.rstudio.org/>. 2012.

[0419] Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2011;141:1792–801.

[0420] Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*. 2014;38:996–1047.

[0421] Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, Duncan A, Holtrop G, Louis P 2009. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *British Journal of Nutrition* 101 (4):541–550.

[0422] Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell*. 2006;127:423–33.

[0423] Reid G 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol* 65 (9):3763–6.

[0424] Rhee SH, Pothoulakis C, and Mayer EA. 2009. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 6:306–314.

- [0425] Richardson AJ, Calder AG, Stewart CS, Smith A. 1989. Simultaneous determination of volatile and non-volatile acidic fermentation products of anaerobes by capillary gas-chromatography. *Lett. Appl. Microbiol.* 9:5-8.
- [0426] Rigottier-Gois L. 2013. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *The ISME Journal* 7:1256-1261.
- [0427] Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 97(6):1166-1177.
- [0428] Rosendale DI, Maddox IS, Miles MC, Rodier M, Skinner M, Sutherland J. 2008. High-throughput microbial bioassays to screen potential New Zealand functional food ingredients intended to manage the growth of probiotic and pathogenic gut bacteria. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(12):2257-2267.
- [0429] Rumah KR, Linden J, Fischetti VA, Vartanian T. 2013. Isolation of *Clostridium perfringens* type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. *PloS One* 8(10):e76359.
- [0430] Rush EC, Patel M, Plank LD, Ferguson LR. 2002. Kiwifruit promotes laxation in the elderly. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 11(2):164-168.
- [0431] Sanchez B, Champomier-Verges MC, Collado Mdel C, Anglade P, Baraige F, Sanz Y, et al. Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype *longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73:6450-9.
- [0432] Sartor RB. Efficacy of probiotics for the management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology & Hepatology*. 2011;7:606-8.
- [0433] Saulnier DM, Spinler JK, Gibson GR, Versalovic J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009;20:135-41.
- [0434] Savino F, Pelle E, Palumeri E, Oggero R, Miniero R. 2007. *Lactobacillus reuteri* (American Type Culture Collection Strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study. *Pediatrics* 119(1):e124-30.
- [0435] Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P. 2014. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*.
- [0436] Schloss PD, Schubert AM, Zackular JP, Iverson KD, Young VB, Petrosino JF. Stabilization of the murine gut microbiome following weaning. *Gut Microbes*. 2012;3:383-93.

- [0437] Seeram N. Associate Professor of Bioactive Botanical Research Laboratory, University of Rhode Island. Digestive Health Forum, NutraIngredients-USA, 25 September 2014.
- [0438] Singleton, Vernon L, Orthofer, Rudolf, Lamuela-Raventós, Rosa M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent 299:152.
- [0439] Skinner MA. 2012. Wellness foods based on the health benefits of fruit: gold kiwifruit for immune support and reducing symptoms of colds and influenza. Journal of Food and Drug Analysis 20(1):261-264.
- [0440] Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008;105:16731-6.
- [0441] Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. Inflammatory Bowel Diseases. 2009;15:1183-9.
- [0442] Stonehouse W, Gammon CS, Beck KL, Conlon CA, Von Hurst PR, Kruger R. 2012. Kiwifruit: our daily prescription for health. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 91(6):442-447.
- [0443] D Sun-Waterhouse, I Wen, R Wibisono, LD Melton, S Wadhwa. 2009. Evaluation of the extraction efficiency for polyphenol extracts from by-products of green kiwifruit juicing. International Journal of Food Science & Technology. 44(12):2644-2652.
- [0444] Taras D, Simmering R, Collins MD, Lawson PA, Blaut M. Reclassification of Eubacterium formicigenerans Holdeman and Moore 1974 as Dorea formicigenerans gen. nov., comb. nov., and description of Dorea longicatena sp. nov., isolated from human faeces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2002;52:423-8.
- [0445] Timm D, Willis H, Thomas W, Sanders L, Boileau T, Slavin J. The use of a wireless motility device (SmartPill(R)) for the measurement of gastrointestinal transit time after a dietary fibre intervention. The British Journal of Nutrition. 2011;105:1337-42.
- [0446] Tuohy KM, Kolida S, Lustenberger AM, Gibson GR. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides—a human volunteer study. The British Journal of Nutrition. 2001;86:341-8.
- [0447] Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. Cell Host & Microbe 3(4):213-223.

- [0448] Udani J,Bloom D.2013.Effects of kivia powder on Gut health in patients with occasional constipation:a randomized,double-blind,placebo-controlled study.Nutrition Journal 12(1):78.
- [0449] Vaahtovuori J,Munukka E,Korkeamäki M,Luukkainen R,Toivanen P 2008.Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis.Journal of Rheumatology 35(8):1500-5.
- [0450] Vogt JA,Pencharz PB,Wolever TMS.L-Rhamnose increases serum propionate in humans.American Journal of Clinical Nutrition.2004;80:89-94.
- [0451] Walker AW,Duncan SH,McWilliam Leitch EC,Child MW,Flint HJ.pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon.Appl.Environ.Microbiol.2005;71:3692-700.
- [0452] Walker AW,Duncan SH,Harmsen HJ,Holtrop G,Welling GW,Flint HJ 2008.The species composition of the human intestinal microbiota differs between particle-associated and liquid phase communities.Environ Microbiol 10(12): 3275-83.
- [0453] Walker AW,Ince J,Duncan SH,Webster LM,Holtrop G,Ze X,et al.Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota.ISME Journal.2011;5:220-30.
- [0454] Wang L,Christophersen CT,Sorich MJ,Gerber JP,Angle MT,Conlon MA 2011.Low relative abundances of the mucolytic bacterium Akkermansia muciniphila and Bifidobacterium spp.in feces of children with autism.Applied and Environmental Microbiology 77(18):6718-21.
- [0455] Wang T,Cai G,Qiu Y,Fei N,Zhang M,Pang X,Jia W,Cai S,Zhao L 2012.Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers.ISME Journal 6(2):320-9.
- [0456] Wang Q,Garrity GM,Tiedje JM,Cole JR.Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy.Appl.Environ.Microbiol.2007;73:5261-7.
- [0457] Williams BL,Hornig M,Parekh T,Lipkin WI 2012.Application of novel PCR-based methods for detection,quantitation,and phylogenetic characterization of Sutterella species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances.mBio 3(1).
- [0458] Willing BP,Dicksved J,Halfvarson J,Andersson AF,Lucio M,Zheng Z,et al.A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes.Gastroenterology.2010;139:1844-54e1.
- [0459] Wong JMW,de Souza R,Kendall CWC,Emam A,Jenkins DJA.Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids.Journal of Clinical Gastroenterology.2006;40:235-43.

[0460] Wu GD,Chen J,Hoffmann C,Bittinger K,Chen YY,Keilbaugh SA,et al.Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes.Science.2011;334:105-8.

[0461] Wu X,Ma C,Han L,Nawaz M,Gao F,Zhang X,Yu P,Zhao C,Li L,Zhou A,Wang J, Moore JE,Millar BC,Xu J 2010.Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes.Current Microbiology 61(1):69-78.

[0462] Ze X,Duncan SH,Louis P,Flint HJ.Ruminococcus bromii is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon.ISME Journal.2012;6:1535-43.

[0463] Zoppi G,Cinquetti M,Luciano A,Benini A,Miner A,and Bertazzoni ME.1998.The intestinal ecosystem in chronic functional constipation.Acta Paediatrica 87:836-841.

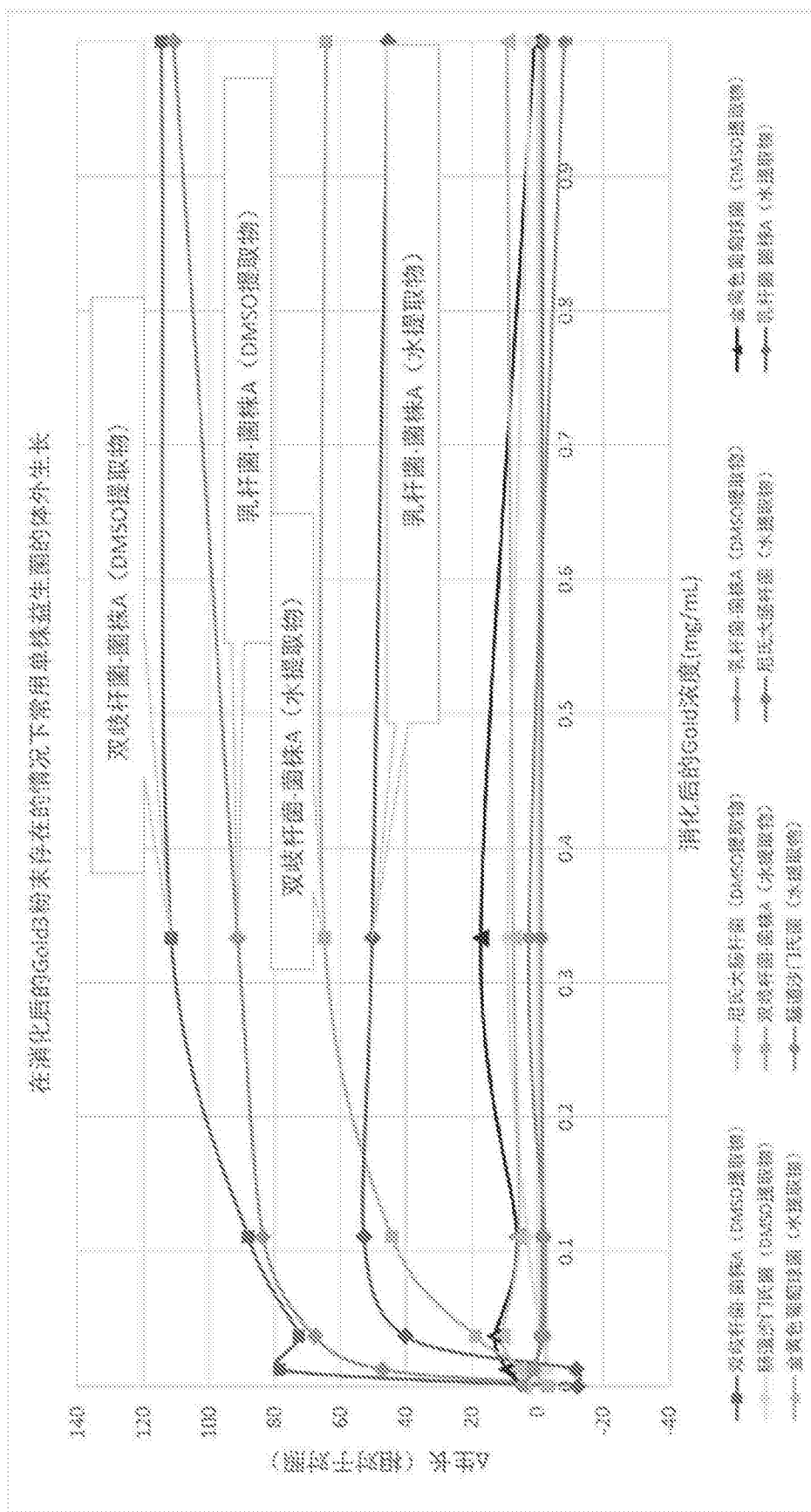


图2

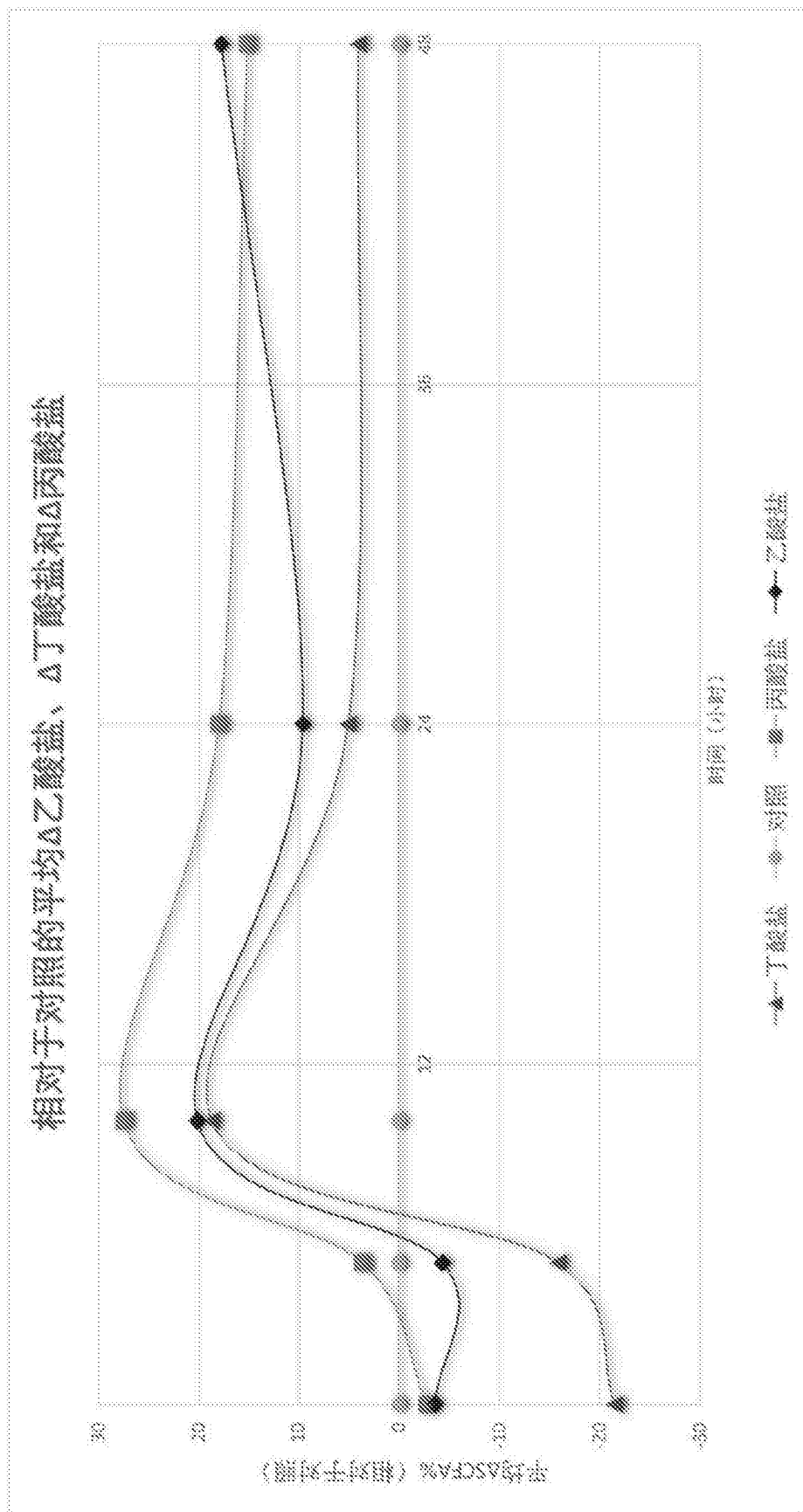


图3

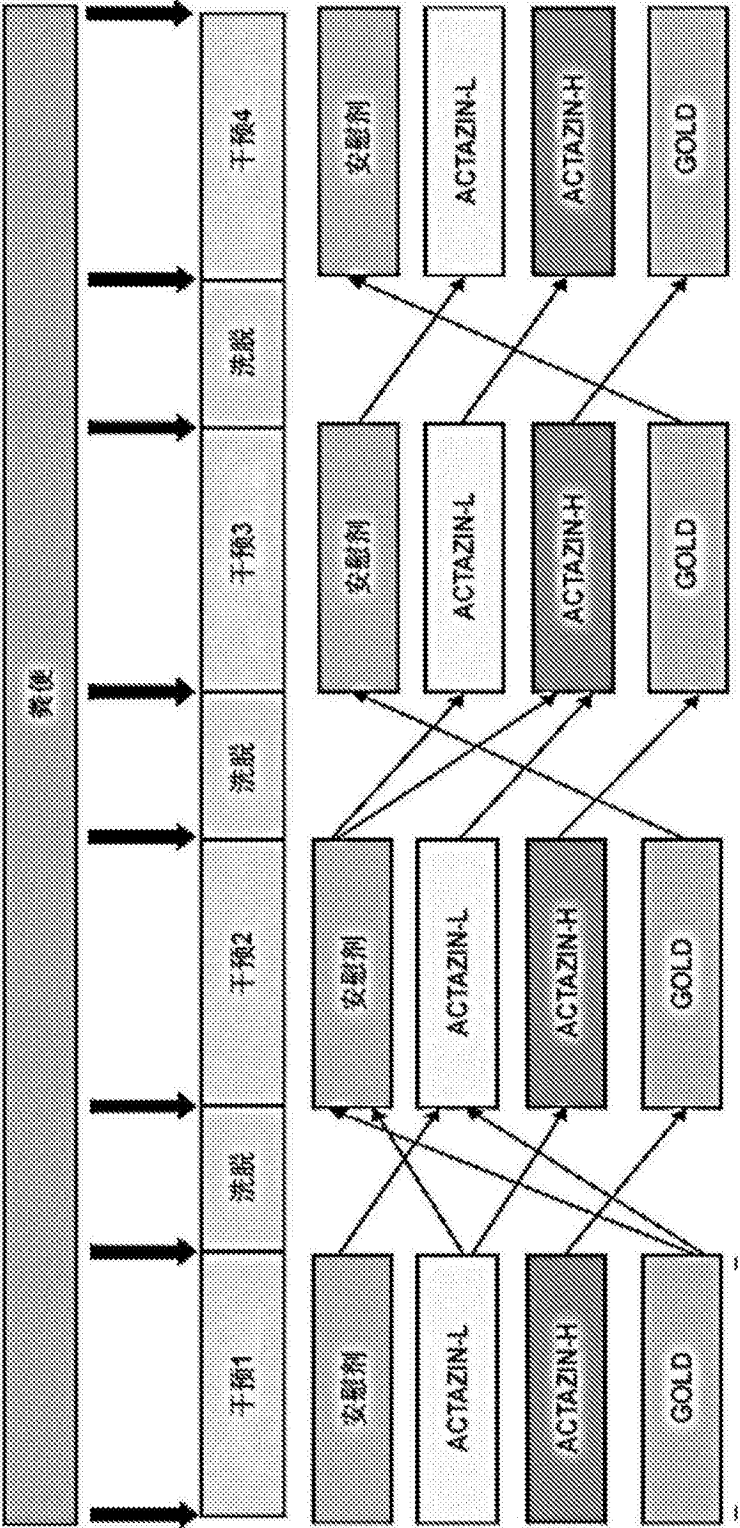


图4

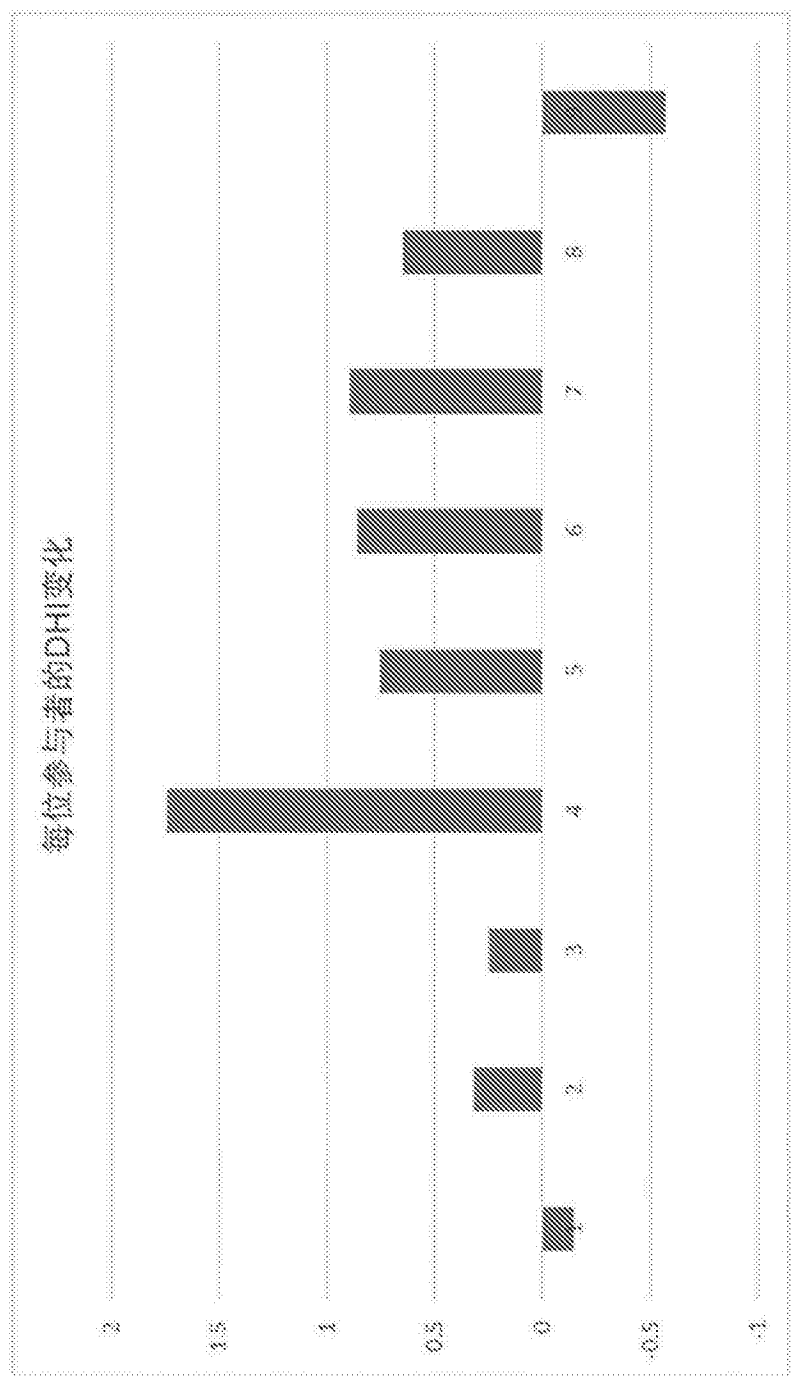


图5A

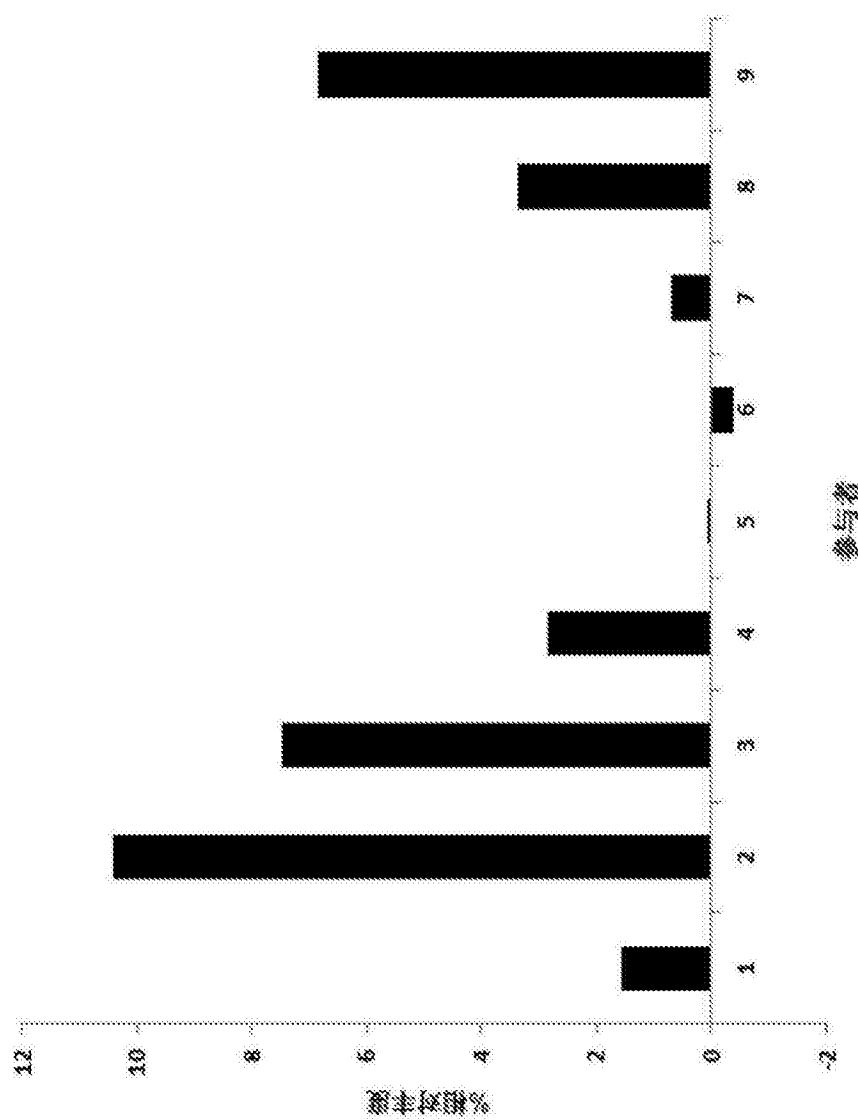


图5B

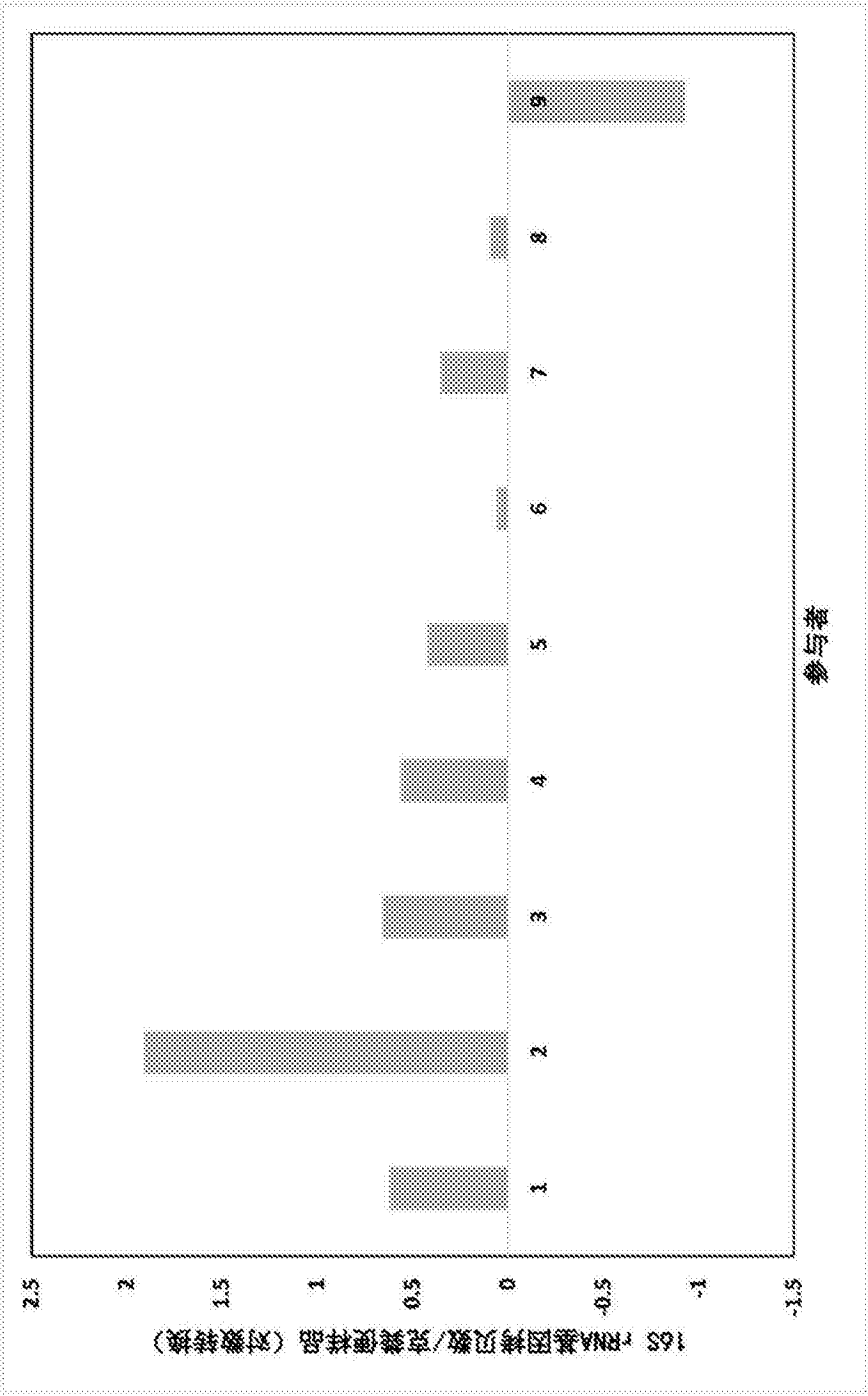


图5C

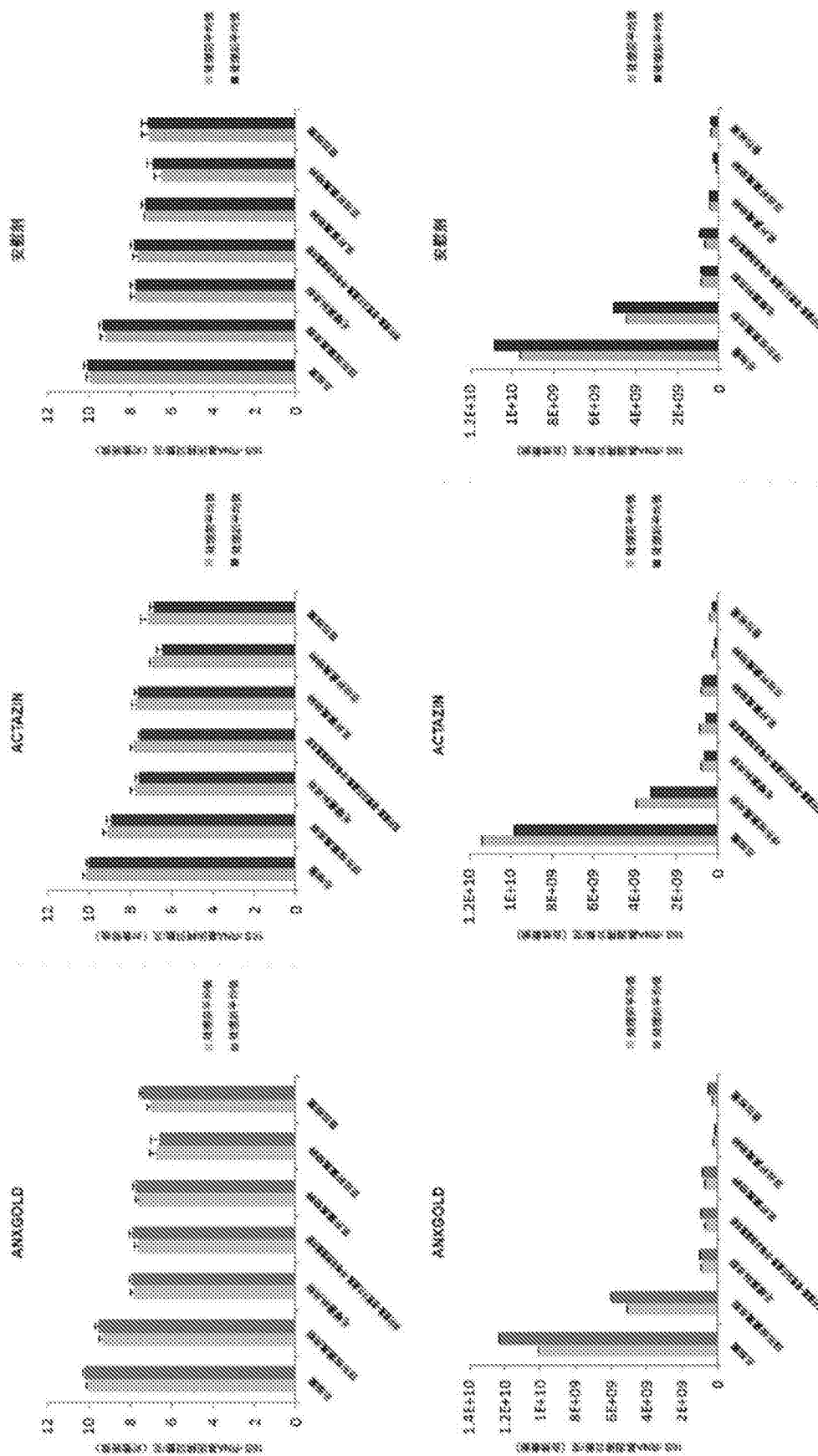


图7