

一种含乳双歧杆菌与母乳低聚糖的组合物及其应用

技术领域

本发明主要是关于一种可提升生物体对金黄色葡萄球菌感染抵御能力的益生菌
5 益生元组合物及其应用，具体是指一种包含乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*)
HN019 与母乳低聚糖 (Human Milk Oligosaccharides, 简称 HMOs) 的组合物，可有效提升生物体对金黄色葡萄球菌感染的抵御能力，该组合物可添加在各种健康食品以及保健食品中。

10 背景技术

在上个千年，已有医学文献记载，未经母乳喂养的婴儿有较高的疾病率和死亡率。母乳不仅为婴儿提供所需营养，母乳中的活性成分更为婴儿的肠道发育和免疫力完善提供保障。母乳喂养的婴儿与配方奶喂养的婴儿相比，肠道菌群中有益菌的相对丰度更高，特别是双歧杆菌和乳酸菌。

15 母乳通过菌群的传递，加上母乳低聚糖和母乳中的细胞因子等活性成分，为新生儿建立起健康的肠道菌群。婴儿每天通过母乳摄入 $10^7 \sim 10^8$ 个细菌，包括乳酸菌和双歧杆菌。这些菌通过母乳直接传递给婴儿，部分可在婴儿肠道定植，促进生命早期肠道菌群的建立。婴儿肠道菌群的建立，对其肠道的发育，以及对健康和免疫系统有着短期，甚至终生的影响。

20 母乳低聚糖 (Human Milk Oligosaccharides, 简称 HMOs) 属于母乳中除乳糖和脂肪外，含量第三丰富的物质。其总含量在泌乳期的各个阶段有变化，在成熟乳中大约是 12~14g/L，而初乳中大约是 20~24g/L。每一种母乳低聚糖的结构在还原端都有一个乳糖，大部分以聚乳糖胺作为结构主链，并在链端含有岩藻糖、唾液酸或二者均有。母乳低聚糖主要由三大类组成：(1) 岩藻糖基类低聚糖，以 2'-岩藻糖基低聚糖
25 和 3'-岩藻糖基低聚糖为代表性物质；(2) 唾液酸基类低聚糖，以 3'-唾液酸基乳糖和 6'-唾液酸基乳糖为代表性物质；(3) 不含岩藻糖基或唾液酸基的核心糖链结构形成的低聚糖，以乳糖-N-四糖和乳糖-N-新四糖为代表性物质。

HMOs 的存在与含量存在个体差异，并与哺乳母亲的路易斯分泌型组成有关。由于婴幼儿配方粉的原料通常是牛乳，而牛乳中通常不含或含有很少这类低聚糖物质，

HMOs 便成为了婴幼儿配方粉想要更加接近母乳成分所必须跨越的一道鸿沟。

上世纪 90 年代，作为在大部分母乳中均含有的 HMO，2-岩藻糖基乳糖（2'-FL）被发现可有效地减轻大肠杆菌中稳定毒素的毒性；到了 2003 年，该低聚糖被报道可抑制弯曲空肠杆菌的附着和感染。随后，母乳低聚糖的三大主要功能被逐步报道和发现：（1）抑制特定病菌的附着和感染；（2）作为益生元，促进肠道共生系统里面细菌的生长；（3）直接减缓粘膜在有毒刺激下的炎症反应。使用了 2'-FL 的首个临床干预试验证实了在低卡路里配方中加入这个特定成分不仅安全还可以让配方奶喂养的婴儿生长速率与母乳喂养的婴儿具有可比性。2'-FL 也被用作成年人的营养补充剂，缓解肠道应激性综合症或炎症性肠病，或被用作益生元维持肠道菌群平衡。

肠道菌群是人体肠道微生态系统的重要组成部分，对人类健康有重要作用，如可提供必需营养素，生成维生素 K，辅助消化过程与促进血管生成和肠道神经作用。益生元和益生菌均被视为改善机体健康的微生态管理工具，可改变、调节和重组已经存在的肠道菌群。

目前在婴幼儿配方粉、辅食及营养补充剂领域，需要有缓解婴幼儿肠道不适及提升自身抵御致病菌如金黄色葡萄球菌感染能力的解决方案。同时，在 3 岁以上儿童、青少年及成人领域，也需要缓解肠道不适及提升自身抵御致病菌如金黄色葡萄球菌感染能力的解决方案。

秀丽隐杆线虫（*C. elegans*）作为一种模型生物，在临床前研究与评估中有较好的应用前景。它具有较短的生命周期（21 天），可复制和再生性较强，操作简便、透明且易于培养。它的基因组已全部被测序，并且有四分之一的基因与人类基因组是同源的。对线虫的基因进行编辑而产生的基因突变的线虫生物体，可用作基因分析的实验手段。目前线虫在欧洲的立法中并不被认为是一种动物。它被广泛用作活体外的测定，比如转录组学、蛋白组学、代谢组学等。作为模式生物，它也常常被作为原料评估的第一个步骤，在功效原料的设计、体外酶或细胞实验、小鼠模型和临床实验前，往往用线虫作为高通量的手段来筛选测试原料的一些特性。

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*）是一种革兰氏阳性菌，属于葡萄球菌属，是常见的食源性致病微生物。它广泛存在于自然环境中，在适当条件下，能产生肠毒素并能引起食物中毒，引发过多起由金黄色葡萄球菌导致的食源性微生物食物中毒事件。人体在受到金黄色葡萄球菌感染后，可能会出现恶心、呕吐、头晕等

常见的食物中毒症状，并可能出现肠炎、肺炎、皮肤感染、伤口感染溃烂、脑膜炎等症状。

发明内容

5 本发明的一个目的在于提供一种可提升生物体对金黄色葡萄球菌感染抵御能力的组合物。

 本案发明人在研究中发现，乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*)和母乳低聚糖组合，对于提高生物体对金黄色葡萄球菌感染抵御能力具有协同作用。

 从而，一方面，本发明提供了一种组合物，其包括乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium*
10 *lactis*)及母乳低聚糖。

 根据本发明的具体实施方案，本发明的组合物中，所述乳双歧杆菌包括乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*) HN019 菌株。

 乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*) HN019 菌株，为商业化菌株，可由杜邦丹尼斯克公司提供。

15 根据本发明的具体实施方案，本发明的组合物中，所述母乳低聚糖包括 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液酸基乳糖、6'-唾液酸基乳糖中的一种或多种。

 2'-岩藻糖基乳糖(2'-fucosyllactose, 2'-FL)，为岩藻糖与乳糖形成的三糖结构，是岩藻糖基类低聚糖的代表性物质。市售该物质通常为经微生物发酵法制备，与人乳中
20 发现的寡糖具有相同结构。

 3-岩藻糖基乳糖(3-fucosyllactose, 3-FL)，为岩藻糖与乳糖形成的三糖结构，与 2'-岩藻糖基乳糖互为同分异构体。是岩藻糖基类低聚糖的代表性物质。该物质经微生物发酵法制备，与人乳中发现的寡糖具有相同结构。

 乳糖-N-四糖 (lacto-N-tetraose, LNT)，为乳糖与四糖形成的六糖结构，该物质
25 经微生物发酵法制备，是以核心糖链为基础结构，且不含岩藻糖基或唾液酸基的低聚糖的代表性物质，且与人乳中发现的寡糖具有相同结构。

 3'-唾液酸基乳糖(3'- sialyllactose, 3'-SL)，为唾液酸与乳糖形成的三糖结构，与 6'-唾液酸基乳糖互为同分异构体，是唾液酸基类低聚糖的代表性物质。该物质经微生物发酵法制备，与人乳中发现的寡糖具有相同结构。

6'-唾液酸基乳糖(6'-sialyllactose, 6'-SL), 为唾液酸与乳糖形成的三糖结构, 与 3'-唾液酸基乳糖互为同分异构体, 是唾液酸基类低聚糖的代表性物质。该物质经微生物发酵法制备, 与人乳中发现的寡糖具有相同结构。

根据本发明的一些具体实施方案, 本发明的组合物中, 2'-岩藻糖基乳糖在所述
5 母乳低聚糖中的含量为 0%-73%, 优选为 0%-63%, 进一步优选为 0%-58%, 更进一步优选为 2%-55%, 例如可以为 3%-8%、25%-35%或 51%-56%, 更具体可以为 5%、30%或 53%。本发明中, 除特别说明外, 各母乳低聚糖的含量是以母乳低聚糖中的 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液酸基乳糖、6'-唾液酸基乳糖的总重量之和为 100%计。

10 根据本发明的一些具体实施方案, 本发明的组合物中, 3'-岩藻糖基乳糖在所述母乳低聚糖中的含量为 0%-61%, 优选为 11%-51%, 进一步优选为 16%-46%, 更进一步优选为 20%-44%, 例如可以为 18%-23%、25%-35%或 40%-45%, 更具体可以为 21%、30%或 41%。

根据本发明的一些具体实施方案, 本发明的组合物中, 乳糖-N-四糖在所述母乳
15 低聚糖中的含量为 0%-52%, 优选为 6%-42%, 进一步优选为 11-37%, 更进一步优选为 13%-35%, 例如可以为 13%-18%、22%-27%或 30%-35%, 更具体可以为 16%、25%或 32%。

根据本发明的一些具体实施方案, 本发明的组合物中, 3'-唾液酸基乳糖在所述母乳低聚糖中的含量为 0%-42%, 优选为 0%-32%, 进一步优选为 0%-27%, 更进一步
20 步优选为 2%-25%, 例如可以为 2%-7%、10%-15%或 20%-25%, 更具体可以为 5%、12%或 22%。

根据本发明的一些具体实施方案, 本发明的组合物中, 6'-唾液酸基乳糖在所述母乳低聚糖中的含量为 0%-25%, 优选为 0%-15%, 进一步优选为 0%-10%, 更进一步
优选为 0%-8%, 例如可以为 3%-8%, 更具体可以为 3%或 5%。

25 根据本发明的一些具体实施方案, 本发明的组合物中, 所述母乳低聚糖是由 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-FL)、3-岩藻糖基乳糖 (3-FL)、乳糖-N-四糖 (LNT)、3'-唾液酸基乳糖 (3'-SL) 和 6'-唾液酸基乳糖 (6'-SL) 中的至少二种、至少三种或至少四种组成的组合。

根据本发明的一些具体实施方案, 本发明的组合物中, 所述母乳低聚糖包括重量

比例(0%-73%) : (0%-61%) : (0%-52%) : (0%-42%) : (0%-25%)的 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液酸基乳糖、6'-唾液酸基乳糖中的至少三种或四种。

根据本发明的一些具体实施方案,本发明的组合物中,所述母乳低聚糖包括重量
5 比例(0%-63%) : (11%-51%) : (6%-42%) : (0%-32%) : (0%-15%)的 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液酸基乳糖、6'-唾液酸基乳糖中的至少三种或四种。

根据本发明的一些具体实施方案,本发明的组合物中,所述母乳低聚糖包括重量
10 比例(0%-58%) : (16%-46%) : (11%-37%) : (0%-27%) : (0%-10%)的 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液酸基乳糖、6'-唾液酸基乳糖中的至少三种或四种。

根据本发明的一些具体实施方案,本发明的组合物中,所述母乳低聚糖包括重量
比例(0%-55%) : (20%-44%) : (13%-35%) : (2%-25%) : (0%-8%)的 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液酸基乳糖、6'-唾液酸基乳糖。

15 根据本发明的一些具体实施方案,本发明的组合物中,所述母乳低聚糖包括重量
比例(0~53%) : (21~41%) : (16~32%) : (5~22%) : (0~5%), 优选为(5~53%) : (21~41%) :
(16~32%) : (5~22%) : (0~5%), 更优选为(5~53%) : (21~41%) : (16~32%) : (5~22%) :
(3~5%)的 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液酸基乳糖、6'-
唾液酸基乳糖。

20 根据本发明的一些具体实施方案,本发明的组合物中,所述母乳低聚糖包括重量
比例(30%-53%) : (21%-30%) : (16%-25%) : (5%-12%) : (3%-5%)的 2'-岩藻糖基乳糖、
3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液酸基乳糖、6'-唾液酸基乳糖。

根据本发明的一些具体实施方案,本发明的组合物中,所述母乳低聚糖包括重量
25 比例(33%-73%) : (1%-41%) : (0%-36%) : (0%-25%) : (0%-25%), 优选为(43%-63%) :
(11%-31%) : (6%-26%) : (0%-15%) : (0%-15%), 更优选为(48%-58%) : (16%-26%) :
(11%-21%) : (0%-10%) : (0%-10%), 最优选为(51%-56%) : (18%-23%) : (13%-18%) :
(2%-7%) : (3%-8%)的 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液酸
基乳糖、6'-唾液酸基乳糖。

根据本发明的具体实施方案,本发明的组合物中,所述乳双歧杆菌与母乳低聚糖

的比例为 $1 \times 10^3 \text{CFU} \sim 1 \times 10^{12} \text{CFU}$: $0.1 \text{g} \sim 10 \text{g}$, 优选为 $1 \times 10^6 \text{CFU} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU}$: $1 \text{g} \sim 10 \text{g}$ 。在本发明的一些更具体实施方案中, 所述乳双歧杆菌与母乳低聚糖的比例为 $1 \times 10^8 \text{CFU}$: $0.08 \text{g} \sim 0.3 \text{g}$ 。所述乳双歧杆菌与母乳低聚糖的比例是以二者在同一组合物中的用量计。

- 5 另一方面, 本发明还提供了所述组合物在制备具有可有效提升生物体对金黄色葡萄球菌感染的抵御能力、可提高生物体先天免疫和/或抗衰老功效的食品或药品中的应用。

根据本发明的具体实施方案, 本发明的组合物的应用中, 所述生物体包括动物或人。

- 10 根据本发明的具体实施方案, 本发明的组合物的应用中, 所述提升生物体对金黄色葡萄球菌感染抵御能力包括: 提升个体预防金黄色葡萄球菌感染的能力, 降低金黄色葡萄球菌感染个体的能力, 和/或缓解金黄色葡萄球菌感染引起的各种症状例如食物中毒(包括恶心、呕吐、头晕等)、肠炎、肺炎、皮肤感染、伤口溃烂或脑膜炎等。

- 根据本发明的具体实施方案, 本发明的组合物可用于制备各种健康食品、保健品
15 以及药品等。具体地, 所述食品可以为液体饮料、固体饮料、口服液、奶制品、片剂或胶囊等, 例如可以是用于添加在婴幼儿食品(包括婴幼儿配方粉、辅食、营养补充剂), 以及3岁以上儿童、青少年和成人的营养补充剂或食品(例如奶粉)中, 具有广阔的应用前景。所述药品可以是口服制剂, 也可以是外用制剂, 例如涂抹用药膏等。

- 另一方面, 本发明还提供了一种提升生物体对金黄色葡萄球菌感染的抵御能力、
20 提高生物体先天免疫和/或抗衰老的方法, 所述方法包括: 给予生物体有效量的本发明所述的组合物。其中, 所述提升生物体对金黄色葡萄球菌感染抵御能力包括: 提升个体预防金黄色葡萄球菌感染的能力; 降低金黄色葡萄球菌感染个体的能力; 和/或缓解金黄色葡萄球菌感染引起的个体食物中毒、肠炎、肺炎、皮肤感染、伤口溃烂和/或脑膜炎。在本发明的一些具体实施方案中, 所述的组合物是以食品的形式给予生
25 物体, 所述食品为液体饮料、固体饮料、口服液、奶制品、片剂或胶囊, 例如奶粉, 特别是婴幼儿配方粉。优选地, 乳双歧杆菌在食品中的应用量为 $1 \times 10^3 \text{CFU/天} \sim 1 \times 10^{12} \text{CFU/天}$, 更优选为 $1 \times 10^6 \text{CFU/天} \sim 1 \times 10^{11} \text{CFU/天}$ 。优选地, 母乳低聚糖在食品中的应用量为 $0.015 \text{g/天} \sim 15 \text{g/天}$, 进一步优选为 $0.1 \text{g/天} \sim 12 \text{g/天}$, 更优选为 $1.5 \text{g/天} \sim 10 \text{g/天}$ 。

本发明还提供了一种食品，其包括本发明所述的组合物。

根据本发明的具体实施方案，所述乳双歧杆菌在所述食品中的应用量为 1×10^3 CFU/天~ 1×10^{12} CFU/天，优选为 1×10^6 CFU/天~ 1×10^{11} CFU/天。在本发明的一些具体实施例方案中，乳双歧杆菌在所述食品中的应用量为 1×10^8 CFU/天。

- 5 根据本发明的具体实施方案，所述母乳低聚糖在所述食品中的应用量为 0.015g/天~15 g/天，进一步优选为 0.1g/天~12 g/天，更优选为 1.5g/天~10 g/天。

本发明的包括所述组合物的食品或药品，因包括所述组合物而具有可提升生物体对金黄色葡萄球菌感染抵御能力。

10 附图说明

图 1 显示 10mg/mL 的母乳低聚糖组合物 A 与乳双歧杆菌 HN019 的组合物对秀丽隐杆线虫受到金黄色葡萄球菌感染时存活率的影响。图中各组别在感染阶段添加的干预物（益生菌和/或 HMO）情况分别与培养阶段相同。

- 15 图 2 显示 30mg/mL 的母乳低聚糖组合物 A 与乳双歧杆菌 HN019 的组合物对秀丽隐杆线虫受到金黄色葡萄球菌感染时存活率的影响。图中各组别在感染阶段添加的干预物（益生菌和/或 HMO）情况分别与培养阶段相同。

图 3 为母乳低聚糖组合物 A 与乳双歧杆菌 HN019 菌株的组合物对秀丽隐杆线虫受到金黄色葡萄球菌感染时第三天的存活率的影响。图中各组别在感染阶段添加的干预物（益生菌和/或 HMO）情况分别与培养阶段相同。

- 20 图 4 为母乳低聚糖组合物 A 与乳双歧杆菌 HN019 菌株的组合物对秀丽隐杆线虫受到金黄色葡萄球菌感染时第五天的存活率的影响。图中各组别在感染阶段添加的干预物（益生菌和/或 HMO）情况分别与培养阶段相同。

图 5 为庆大霉素圆片扩散抑菌圈实验结果图。

图 6 为乳双歧杆菌 HN019 圆片扩散抑菌圈实验结果图。

- 25 图 7 显示 HN019 (1×10^8 CFU) 与 HMO 组合物 A (10 mg/mL) 在金葡菌感染前和/或感染期间共培养对于提升线虫存活率的不同效果。

图 8 显示 HMO 组合物 A (8mg/mL) 与乳双歧杆菌 HN019 (1×10^8 CFU) 单独及形成组合物后对于金葡菌感染情况下线虫存活率的影响。

图 9 显示 HMO 组合物 G (8mg/mL) 与乳双歧杆菌 HN019 (1×10^8 CFU) 单独及

形成组合物后对于金葡菌感染情况下线虫存活率的影响。

图 10 显示 HMO 组合物 H（8mg/mL）与乳双歧杆菌 HN019（1×10⁸ CFU）单独及形成组合物后对于金葡菌感染情况下线虫存活率的影响。

图中： *代表 p<0.05, **代表 p<0.01, ***代表 p<0.001, ****代表 p<0.0001, NS 代表没有显著性差异（not significant）。

具体实施方式

为了对本发明的技术特征、目的和有益效果有更加清楚的理解，现对本发明的技术方案进行以下详细说明，但不能理解为对本发明的可实施范围的限定。

为了对本发明的技术特征、目的和有益效果有更加清楚的理解，现对本发明的技术方案进行以下详细说明，但不能理解为对本发明的可实施范围的限定。

实施例 1： 母乳低聚糖组合与乳双歧杆菌 HN019 组合物对秀丽隐杆线虫受到金黄色葡萄球菌感染时存活率的影响

1. 实验材料与方法

1.1 受试母乳低聚糖样品见表 1。

表 1

中文名称	英文名称	英文缩写	来源
2'-岩藻糖基乳糖	2'-fucosyllactose	2'-FL	Jennewein
3'-岩藻糖基乳糖	3-fucosyllactose	3-FL	Jennewein
乳糖-N-四糖	Lacto-N-Tetraose	LNT	Jennewein
3'-唾液酸基乳糖	3'-sialyllactose	3'-SL	Jennewein
6'-唾液酸基乳糖	6'-sialyllactose	6'-SL	Jennewein
五种母乳低聚糖组合物 A	Human Milk Oligosaccharide mix	HMO mix	Jennewein

五种 HMO 的组合物 A 中，组成比例为：53% 2FL, 21% 3FL, 16% LNT, 5% 3SL, 5% 6SL。

用蒸馏水配置母乳低聚糖溶液，并在含有不同终浓度（分别是 1、10、30mg/mL）的线虫生长培养基的培养皿中进行培养。

用补充了 1%半胱氨酸的 MRS 培养基来培养受试的益生菌，并在 37℃厌氧环境

中孵育过夜。收获细胞并用生理盐水溶液冲洗，调整细菌浓度将其接种在含有线虫生长培养基的平皿中，终浓度为 1×10^8 CFU。

1.2 线虫感染模型

获取了年龄一致的线虫并将其培养在含线虫琼脂培养基（NGM 培养基，线虫培养基中含有大肠杆菌 OP50 为食物）的培养皿中，添加了不同剂量的 HMO 组合（8 mg/mL，10 mg/mL，30 mg/mL）与益生菌（ 1×10^8 CFU）组合物进行共培养（每个线虫培养皿中加入的液体总体积是 10mL。对于浓度为 10mg/mL 的 HMO 受试组，每个培养皿中 HMO 的最终量是 100mg；对于浓度分别为 8mg/mL 和 30mg/mL 的 HMO 受试组，每个培养皿中 HMO 的最终量分别是 80mg 和 300mg。因此每个培养皿平板中，益生菌与 HMO 的添加量比例为： 1×10^8 CFU：80mg-300mg）。在线虫成年后，它们被转移到接种了金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的培养皿中，添加量为 $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL，来模拟受到金黄色葡萄球菌感染的情况。各组别在感染阶段添加的干预物（益生菌和/或 HMO）情况分别与培养阶段相同。使用了两个对照，分别是没有致病菌的条件（线虫培养皿中含有大肠杆菌 OP50），以及有致病菌金黄色葡萄球菌感染但没有任何干预物的（只含有金黄色葡萄球菌的培养皿）。另设置培养阶段添加干预物而感染阶段没有任何干预物的组别、以及培养阶段未添加干预物而感染阶段添加干预物的组别。

将线虫培养几天后，对它们的存活率进行每日计数。如果线虫对铂丝没有反应，则可被认为是死亡。每种条件均进行了两次独立测定。

对存活曲线进行了统计学的比较分析，用 GraphPad Prism 4 统计学软件包进行了 log rank survival 显著性分析。关于对线虫存活率的影响各组间在每一天体现的差异，先用 Two-way ANOVA 进行分析，再用 Tukey's post hoc test 进行各组间的比较，对于 HMO 组合物单独或益生菌单独组同益生元益生菌混合组的区别，在图上用星号标出。用 One-way ANOVA 与 Dunnett's post hoc test 分析感染第三天或第五天各组存活率的显著性差异。

1.3 圆片扩散抑菌圈实验

为确定受试物质是否本身具有抗菌效果，进行了圆片扩散的抑菌圈实验。用无菌的滤纸制成圆片，并接入受试的 HMO 物质（10mg/mL，30mg/mL）或益生菌（ 1×10^8 CFU），并将圆片在无菌条件下干燥过夜。将金黄色葡萄球菌 ATCC25923（ 1.0×10^6

CFU/mL) 均匀涂抹在 NGM 琼脂平板表面, 随后再将圆片放置于接种的琼脂平板培养皿表面。庆大霉素 (200μg/mL) 作为阳性对照。所有培养皿在 37 摄氏度下培养 18 小时。通过观察在圆片周围是否形成透明的环状圈来确认受试物质是否能直接抑制细菌生长或者具有抗菌活性。

5 2. 实验结果

乳双歧杆菌 HN019 与两种不同剂量的五种 HMO 组合物 A 对秀丽隐杆线虫受到金葡菌感染存活率的影响如图 1 和图 2 所示。在整个实验周期, HMO 组合物在 10mg/mL 时, 益生元益生菌组合物比 HMO 组合物单独或益生菌单独的效果均显著的好 (P<0.0001)。而 HMO 组合物 A 在 30mg/mL 时, 在整个实验周期, HMO 与益生

10 菌组合物并未体现优势。

如图 1 所示, 在 HMO 组合物 A 为 10mg/mL 时, 益生元 HMO 和益生菌 HN019 组合物在第 4、5 天效果显著好于益生菌 HN019 单独的组 (p<0.05), 在第 2、4、5 天显著好于 HMO 组合物单独的组 (第 2 天: p<0.0001; 第 4、5 天: p<0.05)。在观察是否有协同效应时, 将 HMO 与益生菌组合物的存活率数值与单独 HMO 组合或单

15 独益生菌作比较, 发现 HMO 与益生菌组合物存活率在第 4 和第 5 天均显著高于单独 HMO 组合与单独益生菌存活率数值的加和, 体现了 HMO 与益生菌组合物的协同效应 (表 2)。

表 2

实验天数	金葡菌+ HMO 组合物 A(10 mg/mL)	金葡菌 +HN019	金葡菌 +HN019+HMO 组合物 A(10 mg/mL)	协同效应
1	100	100	100	否
2	67	76	73	否
3	48	58	61	否
4	25	25	56	是
5	20	11	51	是

图 3 和图 4 显示了在感染第三天和第五天, HMO 组合物 A 与益生菌形成的组合物对秀丽隐杆线虫存活率影响的比较。在感染第五天, 益生元与 HN019 形成的组合物相比于其他受试组, 效果较好。

20 物对秀丽隐杆线虫存活率影响的比较。在感染第五天, 益生元与 HN019 形成的组合物相比于其他受试组, 效果较好。

此外, 本发明的实验显示, 培养阶段添加了 HMO 和 HN019 的组合干预物而感染阶段没有添加任何干预物的组别的秀丽隐杆线虫存活率, 显著高于培养阶段及感染

阶段均未添加干预物的组别。

为了研究在此前测试中所出现的，HMO 与益生菌组合物对于应对金黄色葡萄球菌感染起到的保护作用，是否来源于直接的杀菌或者抑菌功能，进行了受试物质和菌群一起培养并观察是否有抑菌圈形成的测试。如图 5、图 6 所示，乳双歧杆菌 HN019 菌株未在接种点周围形成透明的环状抑菌圈(图 6)。而阳性对照庆大霉素(gentamicin)则显示出了抑菌效果，以透明环状抑菌圈的产生作为标志(图 5)。此外，各 HMO 单体在两个不同浓度下(10mg/mL, 30mg/mL)的抑菌圈实验也有类似结果，各母乳低聚糖单体并不能直接抑制金葡菌生长。可见，本研究中体现的各母乳低聚糖和益生菌 HN019 组合物对于线虫受到金黄色葡萄球菌感染的保护作用并非源于物质可以直接杀菌。

实施例 2：不同组成的母乳低聚糖组合与乳双歧杆菌 HN019 组合物的提升先天免疫和抗衰老功效实验

本实施例中，受试母乳低聚糖组合物的各组分及含量比例见表 3。

表 3

HMO 组合物	2'-FL 百分含量	3-FL 百分含量	LNT 百分含量	3'-SL 百分含量	6'-SL 百分含量
HMO 组合物 A	53	21	16	5	5
HMO 组合物 G	5	41	32	22	0
HMO 组合物 H	30	30	25	12	3

受试组合物功效验证实验 1（考察受试物在“提升生物体对金黄色葡萄球菌感染的抵御能力、提高生物体先天免疫和/或抗衰老”方面的预防效果）：获取了年龄一致的线虫并将其培养在含线虫琼脂培养基的培养皿中，添加了一定比例的 HMO 组合物 A（10 mg/mL）与 HN019 益生菌（ 1×10^8 CFU）组合物进行共培养，直到线虫成年。此后，将线虫转移到感染的平板中，接受致病菌金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的感染，不添加 HMO 与益生菌组合物。

受试组合物功效验证实验 2（考察受试物在“提升生物体对金黄色葡萄球菌感染的抵御能力、提高生物体先天免疫和/或抗衰老”方面的治疗效果）：获取了年龄一致的线虫并将其培养在含线虫琼脂培养基的培养皿中。当线虫成年后，将线虫转移到平板中，平板中添加了一定比例的 HMO 组合物 A（10 mg/mL）与 HN019 益生菌（ 1×10^8

CFU) 组合物, 并接受致病菌金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的感染。

此外, 另有一组, 将线虫在感染前与感染后的阶段均添加了 HMO 与益生菌组合物, 并与上述功效验证实验 1、2 两种情形作为对照组比较。

将线虫培养几天后, 对它们的存活率进行每日计数。如果线虫对铂丝没有反应, 5 则可被认为是死亡。此外还包含了两组对照, 一组没有添加致病菌(普通培养平板加上大肠杆菌 OP50 作为食物), 另一组为感染对照组(平板上只添加了金葡菌)。每种条件均进行了两次独立测定。对存活曲线进行了统计学的比较分析, 用 GraphPad Prism 9 统计学软件包进行了 log rank survival 显著性分析。

实验过程中其余操作参照实施例 1。

10 实验结果:

1. 受试物质与线虫在感染前和/或感染期间共培养对于实验结果的影响

如前所述, 为了判断受试物质是否有预防效果, 仅将线虫与 HMO 组合物 A 与 HN019 在金葡菌感染前进行共培养。为了判断受试物质是否有治疗效果, 仅将线虫与 HMO 组合物 A 与 HN019 在金葡菌感染的同时进行共培养。同样, 还包括了一种 15 情况, 即将受试物质与线虫在感染前和感染期间都共培养。

结果参见图 7 所示。存活曲线显示, 在培养后第一天到第五天, 不管是将受试物质在感染前还是感染期间加入共培养, 对于提升线虫在金葡菌感染情况下的存活率都有较好的提升和保护作用。而线虫在金葡菌感染期间才加入受试物质, 和从始至终都有受试物质的情况, 二者对金葡菌存活率的提升和保护作用都相似, 且与仅在感染前 20 加入受试物质相比, 在感染阶段加入受试物质的情况, 以及全过程都有受试物质的情况, 对于线虫存活率的保护作用更高。

2. HMO 组合物 A (8mg/mL) 与乳双歧杆菌 HN019 单独及形成组合物后对于金葡菌感染情况下线虫存活率的影响

结果参见图 8。可以看出, 在培养后第一天到第五天, 8mg/mL 的 HMO 组合物 25 A 与单独的益生菌 HN019 (10^8 cfu) 均可显著提升线虫在金葡菌感染条件下的存活率, 且当二者形成组合物之后, 提升效果更显著 ($P<0.0001$)。体现了益生菌 HN019 与 HMO 组合物 A (8mg/mL) 的较好的协同效应。

3. HMO 组合物 G (8mg/mL) 与乳双歧杆菌 HN019 单独及形成组合物后对于金葡菌感染情况下线虫存活率的影响

结果参见图 9。可以看出，在培养后第一天到第五天，8mg/mL 的 HMO 组合物 G 与单独的益生菌 HN019 (10^8 cfu) 均可显著提升线虫在金葡菌感染条件下的存活率，当二者形成组合物之后，提升效果有更显著的趋势。体现了益生菌 HN019 与 HMO 组合物 G (8mg/mL) 的较好的组合效果。

5 **4. HMO 组合物 H (8mg/mL) 与乳双歧杆菌 HN019 单独及形成组合物后对于金葡菌感染情况下线虫存活率的影响**

结果参见图 10。可以看出，在培养后第一天到第五天，8mg/mL 的 HMO 组合物 H 与单独的益生菌 HN019 (10^8 cfu) 均可显著提升线虫在金葡菌感染条件下的存活率，当二者形成组合物之后，提升效果有更显著的趋势。体现了益生菌 HN019 与 HMO 组合物 H (8mg/mL) 的较好的组合效果。

10

实施例 3：添加的母乳低聚糖组合与乳双歧杆菌 HN019 组合物的婴儿配方粉

本实施例提供一种 0~6 月龄的婴儿配方奶粉，该配方奶粉中总蛋白质含量为 11.1g/100g 粉，脂肪含量为 28.3g/100g 粉，碳水化合物含量为 52.9g/100g 粉，母乳低聚糖组合物含量 2.5 g/100g 粉，乳双歧杆菌为 4×10^8 CFU/100g。HMOs 组合物的组成及比例如下，2'-岩藻糖基乳糖 (2'-FL)：3'-岩藻糖基乳糖 (3'-FL)：乳糖-N-四糖 (LNT)：3'-唾液酸基乳糖 (3'-SL)：6'-唾液酸基乳糖 (6'-SL)=53：21：16：5：5。

15

权利要求书

1. 一种组合物，其包括乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*)及母乳低聚糖。
2. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中，所述乳双歧杆菌包括乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*) HN019 菌株。
- 5 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物，其中，所述母乳低聚糖包括 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液酸基乳糖、6'-唾液酸基乳糖中的一种或多种；
优选地，所述母乳低聚糖包括重量比例(0%-73%) : (0%-61%) : (0%-52%) : (0%-42%) : (0%-25%)的 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液
10 酸基乳糖、6'-唾液酸基乳糖中的至少三种或四种；更优选地，所述母乳低聚糖包括重量比例(0~53%) : (21~41%) : (16~32%) : (5~22%) : (0~5%)的 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液酸基乳糖、6'-唾液酸基乳糖。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物，其中，所述乳双歧杆菌与母乳低聚糖的比例为 $1 \times 10^3 \text{CFU} \sim 1 \times 10^{12} \text{CFU}$: 0.1g~10g，优选为 $1 \times 10^6 \text{CFU} \sim 1 \times 10^{10} \text{CFU}$: 1g~10g。
- 15 5. 权利要求 1~4 中任一项所述的组合物在制备具有可有效提升生物体对金黄色葡萄球菌感染的抵御能力、可提高生物体先天免疫和/或抗衰老功效的食品或药品中的应用。
6. 根据权利要求 5 所述的应用，其中，所述提升生物体对金黄色葡萄球菌感染抵御能力包括：提升个体预防金黄色葡萄球菌感染的能力，降低金黄色葡萄球菌感染
20 个体的能力，和/或缓解金黄色葡萄球菌感染引起的个体食物中毒、肠炎、肺炎、皮肤感染、伤口溃烂和/或脑膜炎。
7. 根据权利要求 5 所述的应用，其中，所述食品为液体饮料、固体饮料、口服液、奶制品、片剂或胶囊，例如奶粉，特别是婴幼儿配方粉。
8. 根据权利要求 5 或 7 所述的应用，其中，所述乳双歧杆菌在组合物中的应用
25 量为 $1 \times 10^3 \text{CFU/天} \sim 1 \times 10^{12} \text{CFU/天}$ ，优选为 $1 \times 10^6 \text{CFU/天} \sim 1 \times 10^{11} \text{CFU/天}$ 。
9. 根据权利要求 5 或 7 所述的应用，其中，所述母乳低聚糖在组合物中的应用量为 0.015g/天~15g/天，进一步优选为 0.1g/天~12g/天，更优选为 1.5g/天~10g/天。
10. 一种食品，其中包含有权利要求 1~4 中任一项所述的组合物；
优选地，所述乳双歧杆菌在食品中的应用量为 $1 \times 10^3 \text{CFU/天} \sim 1 \times 10^{12} \text{CFU/天}$ ，更

优选为 1×10^6 CFU/天~ 1×10^{11} CFU/天；

优选地，所述母乳低聚糖在食品中的应用量为 0.015g/天~15g/天，进一步优选为 0.1g/天~12g/天，更优选为 1.5g/天~10g/天。

11. 母乳低聚糖在用于提升乳双歧杆菌 HN019 在提升生物体对金黄色葡萄球菌感染的抵御能力、可提高生物体先天免疫和/或抗衰老方面的用途。

12. 一种提升生物体对金黄色葡萄球菌感染的抵御能力、提高生物体先天免疫和/或抗衰老的方法，所述方法包括：

给予生物体有效量的权利要求 1~4 中任一项所述的组合物。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中，所述提升生物体对金黄色葡萄球菌感染抵御能力包括：

提升个体预防金黄色葡萄球菌感染的能力；

降低金黄色葡萄球菌感染个体的能力；和/或

缓解金黄色葡萄球菌感染引起的个体食物中毒、肠炎、肺炎、皮肤感染、伤口溃烂和/或脑膜炎。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法，其中，权利要求 1~4 中任一项所述的组合物以食品的形式给予生物体，所述食品为液体饮料、固体饮料、口服液、奶制品、片剂或胶囊，例如奶粉，特别是婴幼儿配方粉；

优选地，乳双歧杆菌在食品中的应用量为 1×10^3 CFU/天~ 1×10^{12} CFU/天，更优选为 1×10^6 CFU/天~ 1×10^{11} CFU/天；

优选地，母乳低聚糖在食品中的应用量为 0.015g/天~15g/天，进一步优选为 0.1g/天~12g/天，更优选为 1.5g/天~10g/天。