



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1993122 B

(45) 授权公告日 2011.04.13

(21) 申请号 200480043715.X

代理人 章社杲

(22) 申请日 2004.12.10

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 31/365 (2006.01)

10-2004-0060480 2004.07.30 KR

A23K 1/16 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2007.01.30

US 6177121 B, 2001.01.23, 实施例 1、第 4-5

(86) PCT申请的申请数据

栏、权利要求 1-9, 全文.

PCT/KR2004/003247 2004.12.10

KR 20040050645 A, 2004.06.16, 摘要.

(87) PCT申请的公布数据

审查员 杜文华

WO2006/011702 EN 2006.02.02

(73) 专利权人 吉尼思生物制药株式会社

地址 韩国全罗北道

(72) 发明人 金廷学 金铉真 洪性出

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

权利要求书 4 页 说明书 14 页

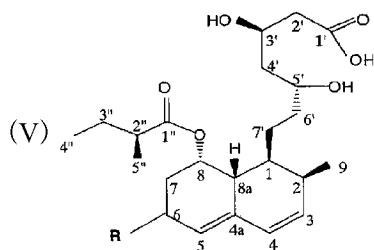
(54) 发明名称

降胆固醇添加剂及用该添加剂生产的低胆固醇蛋

(57) 摘要

本发明提供采用降胆固醇化合物、降胆固醇添加剂以及由其形成的饲料生产低胆固醇禽蛋的组合物和方法。优选地, 本发明提供如化学式 V 中 6 位碳原子上无甲基的微生物他汀, 以便生产低胆固醇蛋。通过提供美伐他汀、普伐他汀以及它们的衍生物作为降胆固醇成分, 本发明可以在不降低产蛋率的情况下生产低胆固醇禽蛋。由于有效量的降胆固醇组合物含有的生物他汀成本是合成他汀的 1/20 至 1/4, 本发明还提供在没有大幅增加成本的条件下生产低胆固醇禽蛋。

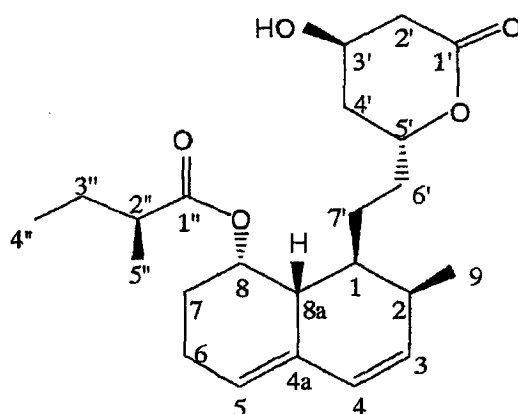
CN 1993122 B



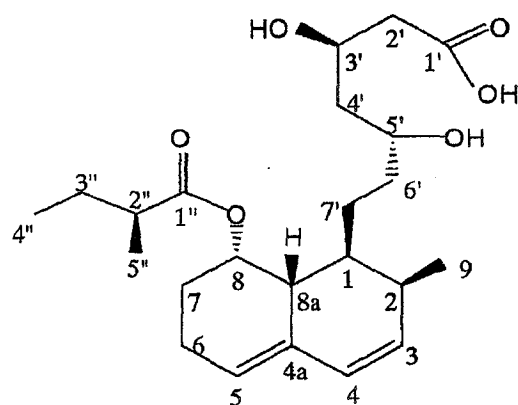
1. 组合物用于在不降低产蛋率的情况下减少禽蛋中胆固醇含量的应用，所述组合物包含选自以下物质组成的组的降胆固醇成分：

- a. 化学式 I 或 II 所示的美伐他汀
- b. 选自自由 3- 羟基美伐他汀、6- 羟基美伐他汀、8a- 羟基美伐他汀、4a, 5- 二氢美伐他汀酸和 5' - 磷酸美伐他汀酸组成的组中的美伐他汀衍生物
- c. 所述美伐他汀及所述美伐他汀衍生物的药用盐
- d. 所述美伐他汀及所述美伐他汀衍生物的酯

(I)



(II)



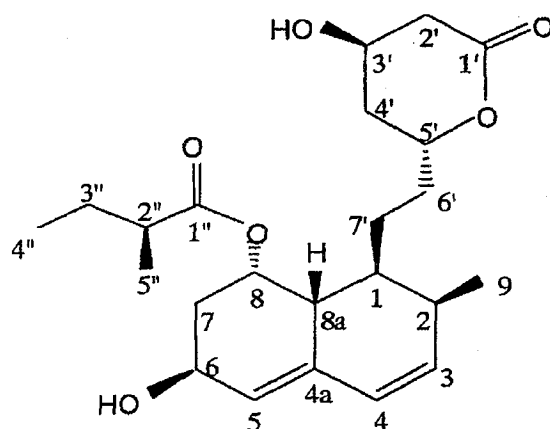
2. 根据权利要求 1 所述的应用，

其中，所述降胆固醇成分是微生物培养物的工业制备过程中的任何副产物、中间产物、和 / 或分离物，包含化学式 I 或 II 所示的美伐他汀及所述美伐他汀衍生物。

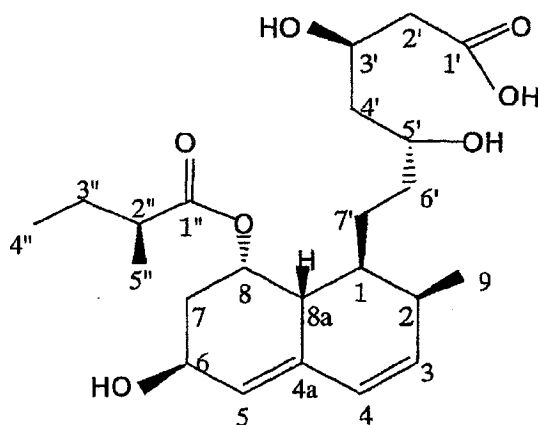
3. 组合物用于在不降低产蛋率的情况下减少禽蛋中胆固醇含量的应用，所述组合物包含选自以下物质组成的组的降胆固醇成分：

- a. 化学式 III 所示的普伐他汀
- b. 化学式 IV 所示的普伐他汀
- c. 所述普伐他汀的药用盐
- d. 所述普伐他汀的酯

(III)



(IV)



4. 根据权利要求 3 所述的应用，

其中，所述降胆固醇成分是来自微生物培养物的工业制备过程中的任何副产物、中间产物、和 / 或分离物，包含化学式 III 或 IV 所示的普伐他汀。

5. 家禽饲料添加剂用于在不降低产蛋率的情况下减少禽蛋中胆固醇含量的应用，其中所述家禽饲料添加剂包含根据权利要求 1 或 2 所述的组合物。

6. 家禽饲料用于在不降低产蛋率的情况下减少禽蛋中胆固醇含量的应用，其中所述家禽饲料包含卵生脊椎动物饲料和根据权利要求 1 或 2 所述的降胆固醇成分。

7. 家禽饲料添加剂用于在不降低产蛋率的情况下减少禽蛋中胆固醇含量的应用，其中所述家禽饲料添加剂包含根据权利要求 3 或 4 所述的组合物。

8. 家禽饲料用于在不降低产蛋率的情况下减少禽蛋中胆固醇含量的应用，其中所述家禽饲料包含卵生脊椎动物饲料和根据权利要求 3 或 4 所述的组合物。

9. 在不降低产蛋率的情况下生产低胆固醇蛋类的方法，该方法包括将含有降胆固醇成分的组合物给予家禽，所述降胆固醇成分选自由以下物质构成的组：

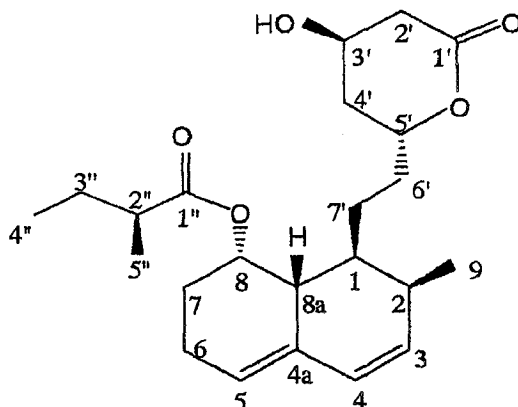
a. 化学式 I 或 II 所示的美伐他汀

b. 选自由 3- 羟基美伐他汀、6- 羟基美伐他汀、8a- 羟基美伐他汀、4a, 5- 二氢美伐

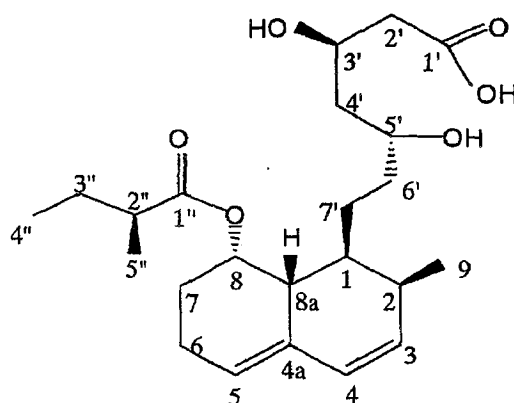
他汀酸和 5'-磷酸美伐他汀酸组成的组中的美伐他汀衍生物

- c. 所述美伐他汀及所述美伐他汀衍生物的药用盐
- d. 所述美伐他汀及所述美伐他汀衍生物的酯

(I)



(II)



10. 根据权利要求 9 所述的方法，

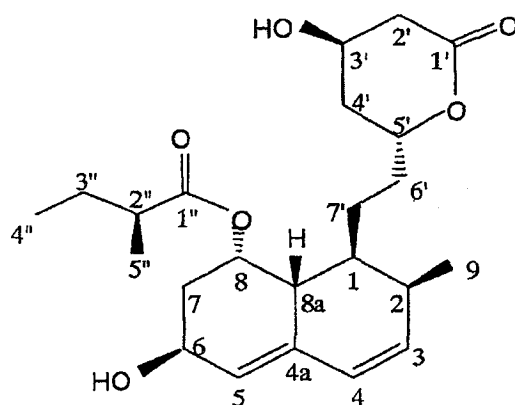
其中，所述降胆固醇成分是微生物培养物的工业制备过程中的任何副产物、中间产物、和 / 或分离物，包含化学式 I 或 II 所示的美伐他汀及所述美伐他汀衍生物。

11. 根据权利要求 9 所述的方法，其中，向家禽饲料中加入重量比 0.003%~0.03% 的所述美伐他汀及所述美伐他汀衍生物，用所述饲料每日喂养家禽至少 1 次，超过 5 天。

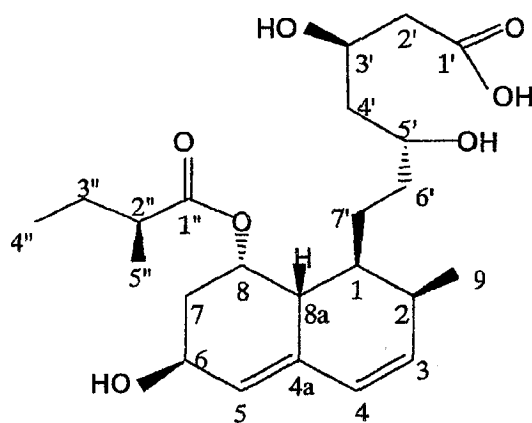
12. 在不降低产蛋率的情况下生产低胆固醇蛋类的方法，所述方法包括将含有降胆固醇成分的组合物给予家禽，所述降胆固醇成分选自由以下物质构成的组：

- a. 化学式 III 所示的普伐他汀
- b. 化学式 IV 所示的普伐他汀
- c. 所述普伐他汀的药用盐
- d. 所述普伐他汀的酯

(III)



(IV)



13. 根据权利要求 12 所述的方法，

其中，所述降胆固醇成分是微生物培养物的工业制备过程中的任何副产物、中间产物、和 / 或分离物，包含化学式 III 或 IV 所示的普伐他汀。

14. 根据权利要求 12 所述的方法，其中，向家禽饲料中加入重量比 0.003%~0.03% 的所述普伐他汀，用所述饲料每日喂养家禽至少 1 次，超过 5 天。

降胆固醇添加剂及 用该添加剂生产的低胆固醇蛋

技术领域

[0001] 本发明涉及采用降胆固醇化合物、降胆固醇添加剂以及由其形成的饲料生产低胆固醇禽蛋的组合物和方法。

背景技术

[0002] 胆固醇是一种所有动物食品中都含有的脂类。它是人类细胞膜组成的必要成分，并作为用于合成重要的生物化合物如类固醇激素和胆汁酸的初始原料。然而，保持正常的血清胆固醇水平非常重要，因为过量的胆固醇有害。

[0003] 具体而言，高血清胆固醇水平被称为高胆固醇血症（人体血液中胆固醇含量超过 200mg/dL），全世界成人慢性疾病近 52% 都与之相关。高胆固醇血症是动脉硬化的主要危险因素，其尤其导致心肌梗塞、心绞痛、高血压、及中风。目前，冠状动脉疾病是在美国和许多其它发达国家人类死亡的主要原因，尽管其在 20 世纪 90 年代是第 4 大死亡原因。通常认为，由于更频繁地食用动物食品如鸡蛋、肉制品、乳制品（牛奶，奶油）而使人类饮食中的胆固醇水平高会导致血清胆固醇升高，从而增大了心血管疾病的危险。

[0004] 然而，富含胆固醇的动物性食品的消费量每年在不断增加，看来显著降低动物食品的摄入量是非常困难的。因此，针对能同时提供基本营养和预防冠心病的低胆固醇食品进行了研究和开发。

[0005] 从营养学上说，鸡蛋因含有高品质的蛋白质、饱和脂肪酸、单和多不饱和脂肪酸、矿物质及维生素，因而被认为一类理想的食品。但是，除了这些重要的饮食成分外，蛋类每个蛋中含有大约 200mg 的胆固醇，被认为是食物中胆固醇的主要来源。由于近年来了解到血液中胆固醇总含量与冠心病（CHD）的发生率之间的相关性，认为饮食胆固醇量的提高会增大患 CHD 的危险（Weggemans et al., 2001）。因此，越来越多的具有健康意识的消费者将蛋类排出在他们的饮食之外，努力将每日胆固醇摄入量限制到美国心脏协会（American Heart Association）推荐的 300mg/天（National Institutes of Health Consensus Development Panel, 1985）。在美国，对日常饮食中胆固醇摄入的公共意识不断提高反映在蛋类人均年消费量上，其在过去 35 年中由 303 个减少到 256 个（US Department of Agriculture, 2002）。低胆固醇含量的蛋类对有健康意识的消费者是具有吸引力的高营养食品以及对蛋类生产商是营利性产品。本发明提供了采用降胆固醇化合物、降胆固醇添加剂以及含有降胆固醇化合物和降胆固醇添加剂的饲料生产低胆固醇禽蛋的组合物和方法。

[0006] 在现有技术美国专利 6,177,121 中，其披露了通过给予纯化的洛伐他汀（lovastatin）、辛伐他汀（Simvastatin）或阿托伐他汀（atorvastatin）生产低胆固醇鸡蛋（Elkin et al., J.Nutr 1999 : 129 : 1010-1019, Elkin et al., J.Agric.Food Chem 2003 : 51 : 3473-3481）。尽管当用 0.03% ~ 0.06% 辛伐他汀或阿托伐他汀喂养蛋鸡 5 周时，低胆固醇效果是令人满意的，但是采用这些方法是不现实的，因为有效量的他汀（statin）价格高昂，以及因而低胆固醇蛋类的生产成本没有市场。此外，口服辛伐他汀或阿托伐他汀降

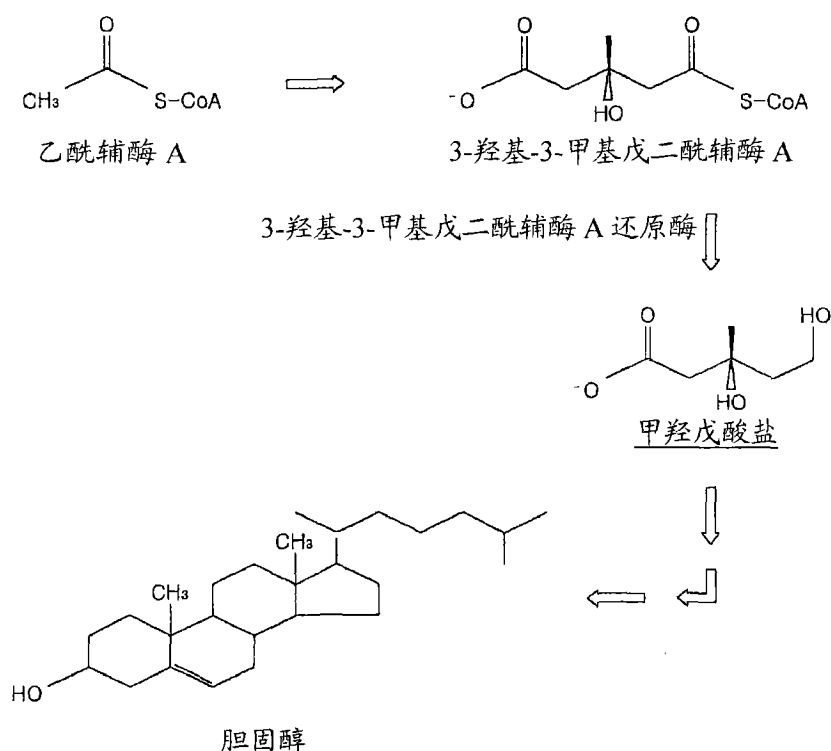
低了产蛋率，提高了低胆固醇蛋类的生产成本。

[0007] 在相同文献中，洛伐他汀显示的降胆固醇作用并不明显，表明在其高剂量仅仅降低约 3%~6%。所以，采用洛伐他汀、辛伐他汀 或阿托伐他汀来作为降胆固醇饲料添加剂的关键成分进行低胆固醇鸡蛋商品化是非常困难的。

[0008] 他汀是通过降低生物合成胆固醇时所需的 3- 羟基 -3- 甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A reductase, HMG-CoA reductase) 来抑制胆固醇合成的降胆固醇剂。胆固醇是在人类、畜类等恒温动物体内由乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 开始经过多个步骤而生成。在胆固醇生物合成中，关键限速步骤是通过 3- 羟基 -3- 甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMG-CoA reductase, 式 1) 将 3- 羟基 -3- 甲基戊二酰辅酶 A 转变为甲羟戊酸 (mevalonic acid)。

[0009] 式 1

[0010]

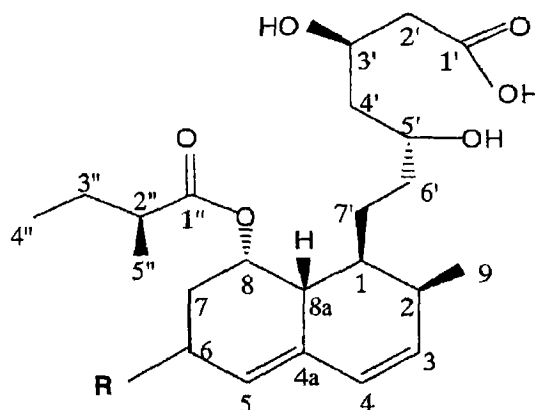


[0011] 他汀由于其结构与甲羟戊酸 (HMG-CoA 还原酶的底物) 相似，抑制 HMG-CoA 还原酶。数种他汀已经作为用于治疗高胆固醇血症的降胆固醇剂而研发出来。这些他汀包括美伐他汀 (mevastatin, 披露于美国专利 No.3,983,140)、洛伐他汀 (披露于美国专利 No.4,231,938)、普伐他汀 (pravastatin, 披露于美国专利 No.4,346,227)、辛伐他汀 (simvastatin, 披露于美国专利 No.4,444,784 和 4,450,171)、氟伐他汀 (fluvastatin, 披露于美国专利 No.4,739,073)、阿托伐他汀 (披露于美国专利 No.5,273,995)、西伐他汀 (cerivastatin, 披露于 No.5,502,199)。

[0012] 在以上他汀中，只有美伐他汀 (康百汀 (compactin))、洛伐他汀和普伐他汀是由微生物培养生产的，而其余的他汀则是合成的。微生物他汀 (microbial statin) 根据 C6 的 R 基团不同，分为美伐他汀 (R : -H)、洛伐他汀 (R : -CH₃) 和普伐他汀 (R : -OH)。他汀可以是内酯结构、酸型 (化学式 V) 或者盐。

[0013]

(V)



[0014] 美伐他汀（在化学式 V 中 C6 上具有氢原子）已经从青霉菌（*Penicillium*）培养基中分离出来（美国专利 3,983,140）。之后，在许多菌种中报道了数种产生美伐他汀的菌株，包括桔青霉（*P.citrinum*）、短密青霉（*P.brevicompactum*）、圆弧青霉（*P.cyclopium*）、*P.adametzoides*、木霉菌（*Trichoderma viridae*）、土曲霉菌（*Aspergillus terreus*）、粘帚霉（*Gliocladium sp.*）（美国专利 No. 3,983,140；4,049,495；4,137,322；5,691,173；韩国专利 No.832801；832329；10-0378640）。不幸的是，美伐他汀作为降胆固醇药物的研发在进行临床试验时表现出强烈的毒性之后而被中断。此后，发现的与美伐他汀结构相关其它化合物被分离出来并对降胆固醇活性进行研究。这些衍生物为 3- 羟基美伐他汀、6- 羟基美伐他汀、8a- 羟基美伐他汀（8a-hydroxy compactin）、4a, 5- 二氢美伐他汀酸（4a, 5-dihydrocompactic acid）、5' - 磷酸美伐他汀酸（5' -phosphocompactic acid）、ML-236A（Chakravarti et al., 2004, *Appl.Microbial.Biotechnol.*64：618-624）。

[0015] 普伐他汀（化学式 V 的 C6 上具有羟基）已经显示出具有降胆固醇效果。但是，与美伐他汀不同，普伐他汀没有毒性，作为用于高胆固醇血症患者的处方药进行了研发。目前，药用普伐他汀通过酶生物转化法而生产出来，其中美伐他汀 C6 上的氢基团通过微生物转换成羟基基团（美国专利 No.4,346,227）。在现有技术中，据报道玫瑰红链霉菌（*Streptomyces carbophilus*）、玫瑰红链霉菌亚种（*S.roseochromogenus* subsp.）、诺卡氏菌（*Nocardia*）、马杜霉拉放线菌（*Actinomadura*）属中多种菌株通过生物转化法将美伐他汀转变为普伐他汀（美国专利 No.5,942,423；5,179,013；4,537,859；4,448,979；4,346,227；加拿大专利 No.1,150,170；1,186,647；韩国专利 No.10-0414334；10-0180706；Serizawa et al., 1983, *J.Antibiotics*36：887-891）。

[0016] 披露

[0017] 技术问题

[0018] 本发明提供用于生产具有低于天然产生水平（naturally-occurring level）胆固醇的低胆固醇蛋类的经济有效的方法。

[0019] 技术解决方案

[0020] 本发明提供用很少量的添加剂有效降低禽蛋中胆固醇含量而不减少产蛋率的降胆固醇组合物。本发明与现有技术不同，在现有技术中，阿托伐他汀或辛伐他汀的加入使产蛋率的降低，这导致生产成本升高。然而，在化学式 V 的 C6 上没有甲基的他汀在

阿托伐他汀、辛伐他汀、以及洛伐他汀的 1/10 至 1/2 量时即以相同的效果降低蛋类胆固醇。

[0021] 本发明提供家禽降胆固醇饲料添加剂、降胆固醇饲料和由其生产的低胆固醇蛋类产品以及方法。

[0022] 参照所附实施例可以更好地理解本发明，实施例仅仅是为了解释说明目的，而不应解释为限制本发明的范围，本发明的范围由所附的权利要求书限定。

[0023] 优选实施方式

[0024] 本文中所用的以下术语具有以下含义：

[0025] “家禽”是指以为了人类消费而养殖的所有种类的驯化家禽，包括鸡、鹌鹑、鸭、鹅、鸵鸟、火鸡。

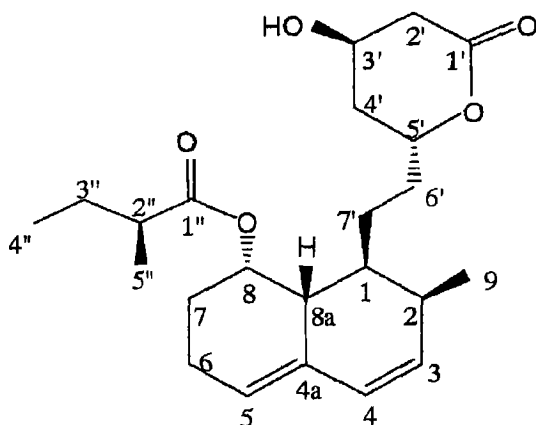
[0026] “蛋”是指以来自驯化家禽的用于人类消费的任何蛋，包括鸡蛋、鹌鹑蛋、鸭蛋、鹅蛋、鸵鸟蛋、火鸡蛋。

[0027] “低胆固醇蛋产品”是指与通过传统饲养方法生产的蛋类比较具有胆固醇含量减少的蛋类产品。

[0028] 本发明提供用于减少家禽蛋中胆固醇含量的组合物。在本发明的一个方面中，该组合物包含降胆固醇成分，所述降胆固醇成分选自以下物质组成的组：化学式 I 所示的美伐他汀及其衍生物，化学式 II 所示的美伐他汀及其衍生物，所述美伐他汀及其衍生物的药物盐，以及所述美伐他汀及其衍生物的酯。美伐他汀特征为化学式 I 或 II 的 C6 仅具有氢基团的他汀。

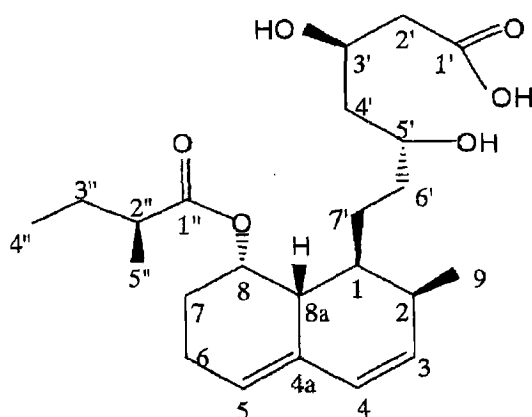
[0029]

(I)



[0030]

(II)

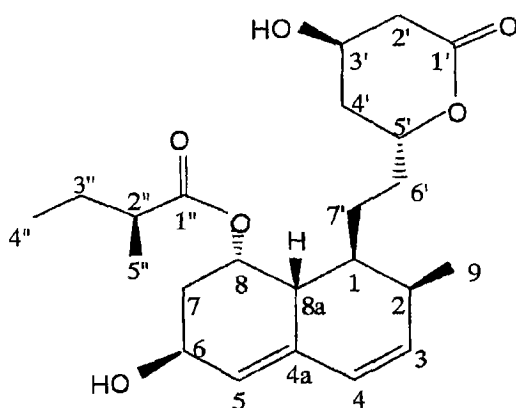


[0031] 美伐他汀又名康百汀或 ML236B, 包括内酯结构 (化学式 I)、游离酸结构 (化学式 II)、由其形成的盐和酯。美伐他汀衍生物是化学式 V 的 C6 具有氢基团的任何他汀, 包括 3- 羟基美伐他汀、6- 羟基美伐他汀、8a- 羟基美伐他汀、4a, 5- 二氢美伐他汀酸、5' - 磷酸美伐他汀酸、ML-236A。美伐他汀衍生物也是由微生物中得到的胆固醇生物合成的微生物抑制剂。产生美伐他汀的菌株包括用于 3- 羟基美伐他汀的玫瑰红链霉菌、用于 6- 羟基美伐他汀的冻土毛霉 (*Mucorhiemalis*)、用于 8a- 羟基美伐他汀的裂褶菌 (*Schizophyllum commune*)、用于 4a, 5- 二氢美伐他汀酸的桔青霉、用于 5' - 磷酸美伐他汀酸的 *Carcinella muscae*、用于 ML-236A 的 *Emericella unguis*。

[0032] 在本发明的另一具体实施方式中, 用于降低蛋白中的胆固醇含量的组合物, 包含选自以下物质组成的组的降胆固醇成分: 化学式 III 所示的普伐他汀及其衍生物, 化学式 IV 所示的普伐他汀及其衍生物, 所述普伐他汀及其衍生物的药用盐, 以及所述普伐他汀及其衍生物的酯。普伐他汀特征为化学式 III 或 IV 的 C6 具有羟基基团的他汀。

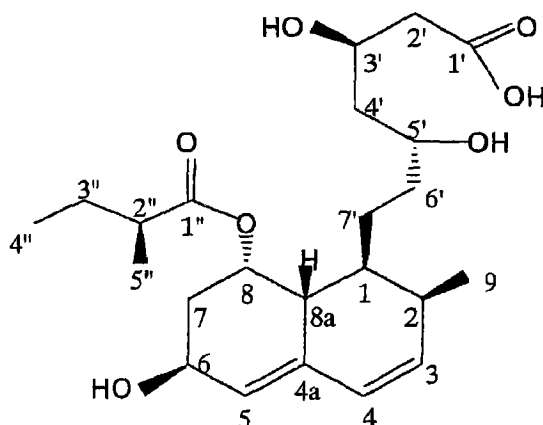
[0033]

(III)



[0034]

(IV)



[0035] 普伐他汀是通过微生物的生物转化而得到，又名普拉司丁 (eptastatin)、美百乐镇 (mezalotin)、普拉固 (pravachol)。本文中的普伐他汀包括内酯结构 (化学式 III)、游离酸结构 (化学式 IV)、由其形成的盐和酯。普伐他汀衍生物是化学式 V 的 C6 具有羟基基团的任何他汀。

[0036] 本发明还提供了含有所述降胆固醇组合物的家禽饲料添加剂及饲料。

[0037] 本发明还提供了生产低胆固醇蛋类的方法，该方法包括将含有降胆固醇成分的组合物给予家禽，所述降胆固醇成分选自由以下物质构成的组：化学式 I 所示的美伐他汀及其衍生物，化学式 II 所示的美伐他汀及其衍生物，所述美伐他汀及其衍生物的药用盐，以及所述美伐他汀及其衍生物的酯。

[0038] 优选地，用本发明的降胆固醇添加剂喂养家禽动物，所述美伐他汀及其衍生物独立地或与传统动物饲料混合以便最终含量为 0.0001%~3% (重量) 而使用。尽管生产低胆固醇蛋类的最低持续时间和喂养量可以根据家禽种类进行调节，但优选的饲养方案为用添加的饲料每日喂养动物至少 1 次，进行超过 5 天的持续时间的时期。

[0039] 本发明还提供了生产低胆固醇蛋类的方法，该方法包括将含有降胆固醇成分的组合物给予家禽，所述降胆固醇成分选自由以下物质构成的组：化学式 III 所示的普伐他汀及其衍生物，化学式 IV 所示的普伐他汀及其衍生物，所述普伐他汀及其衍生物的药用盐，以及所述普伐他汀及其衍生物的酯。

[0040] 优选地，用本发明的降胆固醇添加剂喂养家禽动物，化学式 III、化学式 IV 所示的普伐他汀及其衍生物，盐和酯形式，独立地或与传统动物饲料混合以便最终含量为 0.0001%~3% (重量) 而使用。

[0041] 本发明还提供美伐他汀和普伐他汀的衍生物，其可以是降胆固醇微生物培养过程和后续微生物他汀的纯化过程期间获得的任何中间产物。

[0042] 美伐他汀、普伐他汀以及它们的衍生物，并不是合成的他汀，而是微生物他汀，所述微生物他汀为微生物培养的产品。因此，用于药用目的的美伐他汀和普伐他汀的制造从微生物培养开始，随后是对来自培养介质的他汀 (包含数种他汀衍生的中间产物) 的纯化。

[0043] 例如，普伐他汀的生产从培养具有 C-6 羟基化作用的微生物如链霉菌

(*Streptomyces*) 开始。接着, 将美伐他汀加入到链霉菌培养物中, 以便通过 C-6 羟基化作用开始将美伐他汀生物转化成普伐他汀。在生物转化反应之后, 将培养液通过离心回收, 对培养液进行柱色谱分离以产生纯的普伐他汀。由于低的转化率约为 40%~70% 以及不完全的羟基化作用, 用于柱色谱的培养液通常含有普伐他汀以及未转化的美伐他汀和其它衍生物。在移除培养液后链霉菌细胞沉淀液也含有少量的美伐他汀、普伐他汀及其它衍生物。另外, 由于他汀没有完全回收, 预洗涤溶液、洗涤溶液和柱色谱分离期间的洗涤液也含有少量的美伐他汀、普伐他汀及其它衍生物。

[0044] 来自药物生产过程的这些含他汀中间产物可以直接应用于动物, 尽管其不经进一步纯化用于人体是受限制的。因此, 来自制造药用他汀的副产物可以用作降胆固醇添加剂, 以便以经济的价格生产低胆固醇蛋类。优选地, 这些降胆固醇添加剂可以在冻干之后以固体形式提供。

[0045] 如本文所用的, “工业中间产物或副产物” 旨在包括从含有降胆固醇化合物的工业微生物培养物获得的任何产物, 包括来自任何生产步骤的每种中间产物, 如微生物培养物、含他汀的培养液、微生物细胞沉淀、来自制备柱的洗涤液、来自柱洗脱的洗脱液等。

[0046] 参照所附实施例可以更好地理解本发明, 实施例仅仅是为了解释说明目的, 而不应解释为限制本发明的范围, 本发明的范围由所附的权利要求书限定。

[0047] 实施例 1

[0048] 采用美伐他汀生产低胆固醇鸡蛋

[0049] (1) 给予降胆固醇添加剂

[0050] 将 45 周龄的健康依沙褐壳 (ISA brown) 母鸡随机分配到各个饲养组 (对照组, 8 只; 实验组, 每组 6 只)。每只鸡放置在环境控制的室中的单独笼子里 (25℃, 相对湿度 50%, 16L : 8D)。使母鸡在上述环境中适应无添加剂饲料和住所 2 周。对照家禽用基于谷物和大豆的商购饲料 (表 1) 喂养, 同时实验组的家禽用添加有 0.003% 或 0.03% 的美伐他汀 (Sigma Aldrich Korea) 饲料喂养 6 周。在整个实验期间水和饲料由母鸡自由摄取。每天记录饲料摄入量、产蛋率及鸡蛋重量。产蛋率以母鸡日产蛋量百分比表示; $(100 \times \text{产蛋数目}) / (\text{母鸡数目} \times \text{天数})$ 。

[0051] 表 1

[0052]

成分	%
粗蛋白 (不少于)	14.50
粗脂肪 (不少于)	2.50
粗纤维 (不少于)	7.00
粗砂灰 (不少于)	14.80
钙 (不少于)	3.50
磷 (不少于)	0.35
蛋氨酸及半胱氨酸 (不少于)	0.50
ME (kcal/kg)	2,600

[0053] (2) 产蛋情况

[0054] 0.003% 或 0.03% 的美伐他汀对 45 周龄的依沙褐壳蛋鸡的产蛋情况的影响进行了研究 (表 2)。在以两种剂量口服美伐他汀 6 周后, 鸡蛋重量均保持在 60 克以上。与不

给予美伐他汀的对照组相比，进食 0.003%或 0.03%美伐他汀并没有造成产蛋率的任何变化。喂食美伐他汀保持产蛋性能与现有技术喂食阿托伐他汀 5 周后产蛋率降低到 70%形成对比。

[0055] 表 2

[0056]

加入的美伐他汀（重量%）	鸡蛋重量（g）	产蛋率（%）
0.000	66.0±0.5	86
0.003	64.2±0.3	84
0.03	61.5±0.5	81

[0057] [0057] (3) 鸡蛋胆固醇分析

[0058] 对于鸡蛋胆固醇分析，将每个禽的蛋收集并将蛋黄分离，称重，针对分析制样。用 Folch 等的方法 (1957) 提取出蛋黄里的酯类。简单地，将一克样品与 3mL 的 33% KOH 皂化，用 30mL 95%的甲醇在 65℃水浴中培育 90min。在皂化之后，加入 10mL 乙烷和 3mL 水，随后剧烈摇晃 10min。以 5 α -胆甾烷 (5 α -cholestan, Sigma C-8300) 作为内标。用气相色谱仪 (Shimadzu, Japan) 测定胆固醇含量，采用 VB-1 色谱柱 (30m×0.25mm×0.25 μ m, VICI Inc.)，分流比 100 : 1，氮气作为载气，柱流速 0.54mL/min。进样器、色谱柱、检测器的温度分别为 275℃、290℃、340℃。表 3 示出了美伐他汀对鸡蛋胆固醇的影响。对照组的蛋黄平均重量约为 17.2 克。美伐他汀喂食组的蛋黄重量比对照组略有减少。与对照组每克蛋黄 12.8mg 胆固醇相比，喂食美伐他汀导致蛋黄中胆固醇显著降低。当用蛋黄总胆固醇含量表示时，喂食 0.003%和 0.03%美伐他汀组分别比对照组降低了 16%和 29%。应当注意，低胆固醇蛋类能通过给予低于 0.03%的美伐他汀生产，表明美伐他汀比用于生产低胆固醇蛋类的阿托伐他的效果提高了 2 到 3 倍。

[0059] 表 3

[0060]

加入的美伐他汀 (重量%)	蛋黄重量 (g)	胆固醇浓度 (mg/g)	胆固醇含量 (mg/蛋)	胆固醇含量 变化 (%)
0.000	17.2±0.4	12.8±0.1	220	-
0.003	16.5±0.4	11.2±0.3	185	-16
0.03	14.9±0.7	10.5±0.2	156	-29

[0061] 实施例 2

[0062] 采用普伐他汀生产低胆固醇蛋类

[0063] 用与上述实施例 1 相同的步骤对给予 0.003% 及 0.03% 普伐他汀组进行产蛋率和蛋黄胆固醇分析。产蛋情况通过如表 4 所示测定蛋重量和产蛋率进行研究。普伐他汀组在喂养 6 周后产蛋率达到 80% 以上，和对照组没有明显的差异。这与现有技术形成对比，现有技术阿托伐他汀与对照相比产蛋率下降超过 15%。

[0064] 表 4

[0065]

加入的普伐他汀（重量%）	鸡蛋重量 (g)	产蛋率 (%)
0.000	66.2±0.5	86
0.003	62.5±0.3	84
0.03	58.8±0.7	82

[0066] 表 5 示出了普伐他汀对鸡蛋胆固醇的影响。喂食普伐他汀导致蛋黄重量和胆固醇浓度与对照相比均下降，造成胆固醇总含量下降。喂食 0.03% 普伐他汀所产鸡蛋的胆固醇与对照相比减少了 24%。

[0067] 表 5

[0068]

加入的普伐他汀 (重量%)	蛋黄重量 (g)	胆固醇浓度 (mg/g)	胆固醇含量 (mg/蛋)	胆固醇含量 变化 (%)
0.000	17.2±0.4	12.8±0.1	220	-
0.003	16.5±0.4	12.5±0.5	207	-6
0.03	16.1±0.4	10.4±0.5	167	-24

[0069] 实施例 3

[0070] 采用含有他汀的工业副产物生产低胆固醇鸡蛋

[0071] 将美伐他汀生物转化后的链霉菌细胞沉淀以及培养液分别用作降胆固醇添加剂。首先，将单独的玫瑰红链霉菌菌落接种在装有 100ml R2YE 的 500ml 锥形瓶中，在 27℃、200rpm 条件下培养 3 天。在培养后，将 10mL 种子培养物加入到含有 100mL 生物转化培养基（葡萄糖 2.0%，玉米浆 0.2%， K_2HPO_4 0.15%，酵母提取物 0.1%， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%， $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%， NH_4NO_3 0.1%，脲 0.1%，pH 7.0）的 500mL 锥形瓶中，并在 27℃、200rpm 条件下培养 3 天。将已过滤除菌的美伐他汀盐加入到培养物中，达到培养物的 0.1%（重量），继续培养 4 天。在生物转化反应后，培养物用 TLC 进行分析，以便确认存在美伐他汀和普伐他汀。将该培养物冻干 24 小时，然后用作降胆固醇添加剂。同时，链霉菌细胞沉淀也可通过于 3000×g 进行离心由生物转化反应获得。以颗粒形式回收的链霉菌细胞沉淀在 60℃干燥并用作降胆固醇添加剂。如实施例 1 所示，将链霉菌细胞沉淀以及生物转化反应培养液干燥，并用作降胆固醇添加剂。在之后测定产蛋率和胆固醇量。

[0072] 用如上文实施例 1 所述相同的步骤，进行产蛋率和蛋黄胆固醇分析，只不过用 0.5% 及 1% 的链霉菌细胞沉淀以及生物转化反应培养液替代美伐他汀。产蛋情况通过如表 6 所示测定蛋重量和产蛋率进行研究。两个实验组均显示出与对照组相似的产蛋情况，而产蛋率与对照相比略有增加。

[0073] 表 6

[0074]

添加剂量（重量%）	鸡蛋重量 (g)	产蛋率 (%)
对照组	66.2±0.5	85
培养液干燥物 0.5	63.5±0.8	85
培养液干燥物 1.0	65.1±0.3	88
细胞干燥物 0.5	64.4±0.9	87
细胞干燥物 1.0	64.6±0.7	89

[0075] 表 7 示出了鸡蛋胆固醇分析数据。与对照相比，鸡蛋胆固醇含量以及蛋黄重量和胆固醇浓度与添加剂的量相应地减少。在添加剂组中给予 0.5% 和 1% 培养液干燥物导致蛋胆固醇分别减少了 17% 和 24%。在添加剂组中给予 0.5% 和 1% 的细菌干燥物导致蛋胆固醇分别减少了 13% 和 17%。

[0076] 表 7

[0077]

添加剂量 (重量%)	蛋黄重量 (g)	胆固醇浓度 (mg/g)	胆固醇含量 (mg/蛋)	胆固醇含量 变化 (%)
对照组	16.6±0.3	12.5±0.1	220	-
培养液 干燥物 0.5	15.6±0.5	11.8±0.5	184	-17
培养液 干燥物 1.0	15.3±0.2	10.9±0.7	167	-24
细胞干 燥物 0.5	17.0±0.6	11.3±0.4	192	-13
细胞 干燥物 1.0	16.0±0.4	11.5±0.9	184	-17

[0078] 工业化的可能性

[0079] 本发明提供在不降低产蛋率的情况下生产低胆固醇禽蛋的方法。 通过提供美伐

他汀、普伐他汀以及它们的衍生物本发明使得生产成本增加最小，低至合成他汀的 1/20 至 1/4。通过提供来自产他汀微生物的微生物培养物的工业副产物，本发明还使得生产低胆固醇禽蛋。 本发明使得以经济的价格提供低胆固醇禽蛋，通过减少消费食品胆固醇为防止高胆固醇血症作出贡献。