



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102970882 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201180026011. 1

(22) 申请日 2011. 05. 25

(30) 优先权数据

10164261. 9 2010. 05. 28 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 11. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/058537 2011. 05. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/147862 EN 2011. 12. 01

(73) 专利权人 荷兰联合利华有限公司

地址 荷兰鹿特丹

(72) 发明人 M. J. 贝里 H. F. J. 布利格 J. 卡西

K. J. 亨特 R. A. 克姆珀曼

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 韦欣华 万雪松

(51) Int. Cl.

A23L 1/29(2006. 01)

A23L 1/30(2006. 01)

A23L 1/308(2006. 01)

审查员 陈萍

权利要求书1页 说明书18页

序列表7页 附图9页

(54) 发明名称

用于饮食健康管理的组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于饮食健康管理的多种组合物,及其在预防或治疗心血管病、炎症和腹泻中的任一疾病状态中的用途。从标志了大约 10,000 年前的从狩猎采集到农业生活方式的转变的新石器革命以来,相对于我们饮食的相对较新的、快速的变化,人类进化已经是一个非常缓慢的过程。此外,我们的基因组已经没有时间以相同速度进化,并且因此假定我们的身体在祖先的饮食下将更有效地工作。在本发明的第一方面,提供了用于人类的饮食健康管理系统的多种组合物,其中所述多种组合物包含下列每日饮食:(g) 1750 至 2750 千卡(7350 至 11550 千焦);(h) 具有多于 1250,优选多于 1450,更优选多于 1650 mg 没食子酸等价物的多酚;(i) 具有多于 40,优选多于 50,更优选多于 60g 的纤维;(j) 具有多于 130,优选多于 150,更优选多于 170g 的蛋白质;(k) 具有 0 至 2,优选 0 至 1.5,最优选 0 至 1g 的淀粉;和 (l) 具有 0 至 5,优选 0 至 2.5,最优选 0 至 1 g 的乳糖。

1. 用于人类的饮食健康管理系统的多种组合物,其中所述多种组合物包含下列每日饮食:

- (a) 1750 至 2750 千卡;
- (b) 具有多于 1250 mg 没食子酸等价物的多酚;
- (c) 具有多于 40 g 的纤维;
- (d) 具有多于 130 g 的蛋白质;
- (e) 具有 0 至 2 g 的淀粉;和
- (f) 具有 0 至 5 g 的乳糖。

2. 根据权利要求 1 的多种组合物,其包含至少 110 mg 的至少一种类黄酮的每日饮食。

3. 根据权利要求 1 或 2 的多种组合物,其包含至少 110 种多酚的每日饮食。

4. 根据权利要求 1 或 2 的多种组合物,其包含至少 0.1mg 的至少一种花色素的每日饮食。

5. 根据权利要求 1 或 2 的多种组合物,其包含 $\omega 6 : \omega 3$ 脂肪酸的比小于 3:1 的每日饮食。

6. 根据权利要求 1 或 2 的多种组合物,其包含钾:钠的比大于 4:1 的每日饮食,条件是钠的重量为 0.5-2.5 g。

7. 根据权利要求 1 或 2 的多种组合物,其包含小于 5000mg 没食子酸等价物的多酚的每日饮食。

8. 根据权利要求 1 或 2 的多种组合物,其包含小于 200 g 纤维的每日饮食。

9. 根据权利要求 1 或 2 的多种组合物,其包含小于 250g 蛋白质的每日饮食。

10. 根据权利要求 2 的多种组合物,其包含小于 500mg 的至少一种类黄酮的每日饮食。

11. 根据权利要求 4 的多种组合物,其包含小于 300mg 的花色素的每日饮食。

12. 根据权利要求 5 的多种组合物,其包含 $\omega 6 : \omega 3$ 脂肪酸的比大于 1:10 的每日饮食。

13. 根据权利要求 6 的多种组合物,其包含钾:钠的比小于 11:1 的每日饮食。

14. 根据权利要求 1 或 2 的多种组合物,用作药物。

15. 根据权利要求 1 或 2 的多种组合物,用于预防或治疗心血管病、2 型糖尿病、炎症、腹泻和骨健康中的任一疾病状态。

16. 根据权利要求 1-13 中任一项的多种组合物在制备用于预防或治疗心血管病、2 型糖尿病、炎症、腹泻和骨健康中的任一疾病状态的药物中的用途。

用于饮食健康管理的组合物

[0001] 本发明涉及用于饮食健康管理的多种组合物,及其在预防或治疗心血管病、炎症和腹泻中的任一疾病状态中的用途。

[0002] 从标志了大约 10,000 年前的从狩猎采集到农业生活方式的转变的新石器革命以来,相对于我们饮食的相对较新的、快速的变化,人类进化已经是一个非常缓慢的过程。此外,我们的基因组已经没有时间以相同速度进化,并且因此假定我们的身体在祖先的饮食下将更有效地工作。

[0003] 在一千两百万年前人首先从猿脱离,并且从那时起直到农业首先出现的新石器时代,假定多种人种已经以野生果实和植物(包括叶片)为食并且寻找蛋白质,然后开发了狩猎作为工具(2 百万年前)。在一百八十万年至两百万年前出现的直立人(*Homo erectus*)被认为是第一个具有许多关键类人特征的人种。这些包括大的脑,其被认为已经能够发展为转变成肉食(开始寻找随后狩猎)的结果,而且包括较小的内脏和更小的牙齿和颌。Wrangham (Catching fire: How cooking made us human. Profile (2009)) 指出这些变化不仅表示转变成肉食,而且它们还能够表示使用火煮食物比以前认为的更早,虽然控制火的最早的证据仅在后 250,000 年才出现。如果该理论是正确的,则其不仅解释了一些我们的身体适应性,而且解释了人类为什么没有出现以完全生食饮食为主(参见 Koebnick C., Garcia, A.L., Dagnelie, P.C. 和 Strassner, C., J. Nutrit., 135, 2372-2378 (2005)),如果如以前认为的我们仅在大约 250,000 至 50,000 年烹饪我们的食物,其将是期望的。因此,烹饪的使用也能够非常恰当地包括在任何旧石器时代风格的饮食中。新石器革命则导致转变成农业生活方式和从高蛋白(动物蛋白)到高碳水化合物(谷类)的饮食变化。

[0004] 根据 Laden, G. 和 Wrangham, R. (J. Hum. Evol., 49, 482-498 (2005)),因为能够从骨样本收集总体健康状态和生活方式的一些证据,所以关于旧石器时代人类的总体健康状态的证据比开始期望的更详细,尽管缺少软组织意味着没有关于许多疾病流行的残存证据。特别地,Cohen, M.N. (Health and the rise of civilization. Yale University Press (1989)) 公开了关于克罗马农人(Cro-Magnon man),即欧洲人口的祖先的骨记录,该记录显示出他是高的并且患有比其进化成的新石器时代的人更少的疾病。还在美国发现了随农业增加而降低的人类健康的类似证据,其中研究显示与采猎者相反,在耕作人口的骨骼中与细菌感染有关的骨损害的数量增加。这种感染水平的增加还与死亡率的增加有关,最明显地是 45 岁以上存活的个人数量从总人口的 13% 降至 7% (参见 Larsen CS, "Skeletons in our closet: Revealing our past through Bioarchaeology" Princeton (2002) ISBN0-691-09284-2)。

[0005] 更重要地,已经发生并在过去数千年传播的一些适应作用已经在我们现有的许多时期中用于恶化环境。作为发展农业并转变成基于高淀粉谷类的饮食的物种,作为建造高脂肪储存的结果,在歉收后最适合在荒芜的冬季生存的个体将不惜牺牲自己极瘦的表兄弟而生存。由 Neel, J.V. (Am. J. Hum. Genet., 14, 353-362 (1962)) 提出的选择具体基因的这种“节约基因假设”增加了来自可利用碳水化合物的脂肪的沉积效率,并且表明将

选择能够最有效建造这些脂肪储存的个体用于产生倾向于肥胖的人的亚群体。Frayling, T.M. et al. (Science, 316, 889-894 (2007)) 最近发现了若干基因型,包括与肥胖和 2 型糖尿病有关的 FTO 基因的等位基因,其证实了该理论。由于我们饮食的自由可得的淀粉含量,继承这些基因型的个体现在是遗传上倾向于连续建造脂肪储存的群体。这在我们周围的努力将其体重保持在“健康”水平的人的逸事证据中完全能够看出,而其他人看起来在他们的饮食中控制较少而不表现出体重增加。

[0006] 尽管如此,由世界卫生组织 (WHO) 出版的饮食指南以及美国农业部 (USDA) 都推荐高碳水化合物 (消耗卡路里的 55-75 %) 和低蛋白质 (消耗卡路里的 10-15 %) 的饮食,其是建议的旧石器时代饮食 (高蛋白质 (30 %) 和低碳水化合物) 的直接矛盾。

[0007] 因此,对于过去的 10,000 年左右,人类已经以其不适应的生活方式生活并且如果他的饮食被设计为补足他的基因创造的身体将导致不在他能实现的生理最适度。因此,我们应该回到更旧石器时代风格的饮食以便减轻现代苦恼的普遍影响范围,例如目前威胁人类的心血管病和 2 型糖尿病。

[0008] 这种返回旧石器时代风格饮食的概念首先由 Eaton et al. (New Eng. J. Med., 312, 283-289 (1985)) 提出,并且由 Frassetto et al (Eur. J. Clin. Nutrit., 63, 947-955 (2009)) 进行的最初的临床试验表明动脉血压改进,并且总胆固醇、低密度脂蛋白 (LDL)、血液脂质和甘油三酯降低。在 Jönsson et al (Cardiovasc. Diabetol., 8, 35-48 (2009)) 的研究中看到了改进的血糖控制和若干心血管风险因素的改进,因为该研究在糖尿病患者中进行,所以在外推至正常个体上存在保留。这种后面研究的限制是给予参与者全面的饮食指导。具体地,饮食应该基于瘦肉、鱼、水果、叶状和十字花科蔬菜、块根类蔬菜、蛋和坚果,同时排除乳制品、谷粒、豆、精炼油脂、糖、糖果、软饮料、啤酒和额外添加的盐。推荐有限量的下列项:蛋 (不超过 2 个 / 日)、坚果 (优选胡桃)、干果、马铃薯 (不超过 1 个中等大小的马铃薯 / 日)、菜籽油或橄榄油 (不超过 1 汤匙 / 日)、葡萄酒 (不超过 1 杯 / 日)。

[0009] 为了至少部分地抗争现代苦恼,例如心血管病和 2 型糖尿病,建议基于旧石器时代人类的饮食原则的饮食。

[0010] 发明概述

[0011] 在本发明的第一方面,提供了用于人类的饮食健康管理系统的多种组合物,其中所述多种组合物包含下列每日饮食:

[0012] (a) 1750 至 2750 千卡 (7350 至 11550 千焦);

[0013] (b) 具有多于 1250,优选多于 1450,更优选多于 1650 mg 没食子酸等价物的多酚;

[0014] (c) 具有多于 40,优选多于 50,更优选多于 60 g 的纤维;

[0015] (d) 具有多于 130,优选多于 150,更优选多于 170 g 的蛋白质;

[0016] (e) 具有 0 至 2,优选 0 至 1.5,最优选 0 至 1 g 的淀粉;和

[0017] (f) 具有 0 至 5,优选 0 至 2.5,最优选 0 至 1 g 的乳糖。

[0018] 每一组合物为预制食物或饮料组分 (例如,预制开胃餐或餐后甜点),一起添加时其形成每日饮食,包含许多食物或饮料成分的组合物。与基于 WHO 指南的饮食 (WHO 技术报告系列第 916 号“Diet nutrition and the prevention of chronic diseases ” (2003) ”相比,所述每日饮食的特征为正常水平的能量,但是高水平的多酚、纤维和蛋白质和低水平

的淀粉和乳糖。

[0019] 使用 Folin-Ciocalteu 试剂检测没食子酸等价物的多酚。

[0020] 多种组合物可以包含含小于 5000, 优选小于 4000, 更优选小于 3000 mg 没食子酸等价物的多酚的每日饮食。此外, 它们还可以包含含小于 200, 优选小于 150, 更优选小于 100 g 纤维的每日饮食。

[0021] 另外, 多种组合物可包含含小于 250, 优选小于 225, 更优选小于 200 g 蛋白质的每日饮食。

[0022] 多种组合物可包含至少 110, 优选至少 130, 最优选至少 150 mg 的至少一种类黄酮的每日饮食。同时类黄酮一般来说与改进的健康有关, 优选地, 多种组合物包含小于 500, 优选小于 400, 更优选小于 300 mg 的至少一种类黄酮的每日饮食。

[0023] 多种组合物可包含至少 0.1, 优选至少 0.5, 更优选至少 1.0 mg 的至少一种花色素的每日饮食。同时花色素一般来说也与改进的健康有关, 优选地, 多种组合物包含小于 300, 优选小于 200, 更优选小于 100 mg 的至少一种花色素的每日饮食。

[0024] 特别地, 多种组合物可以包含另外包含芹菜素、矢车菊素-3-葡萄糖苷、翠雀素 (delphinidin)、表儿茶素、橙皮素、茨非醇、木犀草素、天竺葵色素-3-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3, 4-二葡萄糖苷、槲皮素-3-葡萄糖苷和槲皮素-4-葡萄糖苷的混合物的每日饮食。大量这种类黄酮通常被认为导致更好的健康, 因为该类黄酮表现出多重抗氧化剂机制, 其可能比单一抗氧化剂机制更有效。

[0025] 多种组合物可包含至少 110, 优选至少 120, 最优选至少 130 的多酚。

[0026] 任选地, 多种组合物可包含含 $\omega 6 : \omega 3$ 脂肪酸的比小于 3:1, 优选小于 2:1 的每日饮食。由于这样的比例与更好的心脏健康有关, 优选地, 多种组合物包含 $\omega 6 : \omega 3$ 脂肪酸的比大于 1:10, 优选大于 1:5, 更优选 1:2 的每日饮食。

[0027] 多种组合物还可包含另外含钾:钠的比大于 4:1, 优选大于 5:1, 最优选大于 6:1 的每日饮食, 条件是钠的重量为 0.5-2.5 g。这样的比例与心脏健康和最佳血液渗透压平衡 (blood pressure osmotic balance) 有关。然而, 优选地, 多种组合物包含含钾:钠的比小于 11:1, 优选小于 10:1, 最优选小于 9:1 的每日饮食。

[0028] 在本发明的第二方面中, 提供了根据本发明第一方面的多种组合物, 其用作药物。

[0029] 在本发明的第三方面中, 提供了根据本发明第一方面的多种组合物, 其用于预防或治疗心血管病、2 型糖尿病、炎症、腹泻和骨健康中的任一疾病状态。术语“骨健康”是指改进的骨质量和骨密度。

[0030] 在本发明的第四方面中, 提供了根据本发明第一方面的多种组合物在制备用于预防或治疗心血管病、2 型糖尿病、炎症、腹泻和骨健康中的任一疾病状态的药物中的用途。

[0031] 在本发明的第五方面中, 提供了用于预防或治疗心血管病、2 型糖尿病、炎症、腹泻和骨健康中的任一疾病状态的方法, 所述方法包括给予需要其的人多种本发明第一方面的组合物的步骤。

[0032] 发明简述

[0033] 参照下列附图例示本发明, 其中:

[0034] 图 1 显示使用来自两名志愿者的排泄物, 每 mL 类杆菌属 (*Bacteroides*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、球形梭菌群 (*C. coccoides*-group)、

柔嫩梭菌群 (*C. leptum*-group)、普拉氏梭杆菌 (*F. prausnitzii*) 和所有细菌在多种饮食的分批发酵后的拷贝数的 qPCR 结果 (“空的”是指无食物饮食, “不健康的”是指不健康的饮食, “健康的”是指基于 WHO 指南的饮食, “旧石器时代的”是指基于旧石器时代的饮食, 并且“菊粉”是指基于菊粉的饮食); 以及

[0035] 图 2 显示不健康的饮食 (“不健康的”左侧条)、基于 WHO 指南的饮食 (“健康的”中间条) 和基于旧石器时代的饮食 (“旧石器时代的”右侧条) 的 HITchip 分析产生的气单胞菌属 (*Aeromonas sp.*) 和脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 的随时间 (“t”单位为小时) 的 log 强度值变化。

具体实施方式

[0036] 饮食

[0037] 在将所有饮食标准化为约 2400 kcal 每日的情况下, 设计下列饮食:

[0038] 表 1a : 不健康的饮食

[0039]

不健康的	
早餐	土司和黄油
早餐	一杯牛奶
午餐	奶酪三明治
午餐	一条巧克力
晚餐	香肠、薯条和烘豆
零食	米饭布丁

[0040] 表 2a : 基于 WHO 指南的饮食 (WHO 技术报告系列第 916 号 “Diet nutrition and the prevention of chronic diseases” (2003))

[0041]

WHO	
早餐	麦片谷物和牛奶
早餐	土司和 Flora Pro-Active 轻人造黄油
午餐	米饭和豆沙拉
午餐	香蕉
晚餐	橙汁
晚餐	黑线鳕和含胡萝卜的烤薯条
零食	Twix 巧克力棒

[0042] 表 3a : 基于旧石器时代的饮食

[0043]

旧石器时代的	
早餐	鲑鱼煎蛋
早餐	半个柚子
午餐	有虾的混合绿色蔬菜汤
午餐	草莓和樱桃
晚餐	鸡肉和蔬菜什锦
晚餐	含蓝莓和蜂蜜的烤苹果
零食	芹菜和胡萝卜棒
零食	榛子、杏干和无花果

[0044] 表 4a : 基于 Frassetto 文章 (参见上文) 的饮食

[0045]

Frassetto	
早餐	猪肉和含蜂蜜的凤梨
早餐	胡萝卜汁
午餐	金枪鱼沙拉
午餐	番茄汤
晚餐	与西兰花和大蒜一起炒的鸡肉
晚餐	番茄汤
晚餐	烤欧洲萝卜和蘑菇
零食	胡萝卜汁
零食	香瓜
零食	杏仁
零食	火鸡鳄梨酱和番茄生菜卷

[0046] 这些饮食转化为下列量的成分：

[0047] 表 1b :不健康的饮食的成分

[0048]

成分	重量 (g)
烘豆	84
咸黄油	10
切达奶酪	132
牛奶	240
牛奶巧克力	44
烤薯条	100
猪肉香肠	200
易食米饭布丁	113
糖	30
白面包	108

[0049] 表 2b :WHO 推荐饮食的成分

[0050]

成分	重量 (g)
香蕉	136
胡萝卜	100
麦片 (谷物)	50
Flora Pro-Active 轻人造黄油	5
烤黑线鳕	120
牛奶	300
杂粮面包	41
橄榄油	14
橙汁	200
烤薯条	18
红芸豆	150
甜红辣椒	40
番茄	40
Twix 棒 (2 根)	58
白色长粒大米	300

[0051] 表 3b :基于旧石器时代的饮食的成分

[0052]

食物	重量 (g)
茄子	150
西兰花	50
棕色亚麻籽	10

胡萝卜	80
芹菜	80
芹菜籽	3
鸡胸, 仅有肉, 无皮	250
含苹果汁的干蓝莓	30
干无花果	50
未硫化的杏干	50
蛋	100
养殖的大西洋鲑鱼	200
新鲜罗勒	10
大蒜	1.5
生姜	12.5
柚子 (粉色的 Florida)	123
榛子	20
蜂蜜	10
猕猴桃	76
洋葱	137
豌豆 (冷冻的)	38
含皮的生吃苹果	222
皱叶甘蓝	50
无核葡萄干	30
小虾 / 大虾	150
菠菜	31
草莓	100
甜樱桃	100
甜黄椒	60
芝麻酱 (芝麻籽黄油)	28
番茄	338
豆瓣菜	19
白蘑菇	72.5

[0053] 表 4b : 基于 Frassetto 文章 (参见上文) 的饮食的成分
[0054]

食物	重量 (g)
鳄梨	34
西兰花	186
Campbell 的番茄汤	300
胡萝卜汁 (罐)	600
鸡胸 (仅有肉)	250
金枪鱼	250
大蒜	3
蜂蜜	21
莴苣 (卷心)	120
瓜 (香瓜)	120
蘑菇	100
干果 (杏仁)	70
橄榄油	30
欧洲萝卜	120
凤梨	200
猪里脊肉, 仅瘦肉	140
萝卜	4
Hellman 的蛋黄酱	20
葱	12

百里香（干燥的）	1
菠菜	36
番茄（红色成熟的）	160
火鸡（白肉无皮）	50

[0055] 饮食的化学分析

[0056] 将每整天的菜单食物冷冻在液氮中，冻干并在均质机中磨碎。检定抗坏血酸、总酚（结合与未结合）、单独的黄酮、糖和淀粉。

[0057] (a) 抗坏血酸检定

[0058] 该检定基于 Foyer et al. (Plant Physiol., 109, 1047-1057(1995)) 和 Hewitt, E. J. et al (Biochem. J., 78, 384-391 (1961)) 的方法。简言之，向 3.5- 倍 (v/w) 的 MPA/EDTA (5 % (w/v) 间磷酸 + 1 mM 乙二胺四乙酸四钠) 中加入冻干磨碎的材料并放在冰上 30 分钟。以 $11,000 \times g$ 在微型离心机中将悬浮液离心 1 分钟以除去碎片和沉淀物。向 2.25 mL 磷酸钠缓冲液 (1 M pH 6.0) 中加入 0.25 mL 上清液并检测 A_{265} (在 265 nm 的吸光度)。加入 25 μ L 的抗坏血酸盐氧化酶 (400 U. mL^{-1} 的磷酸盐缓冲液) 并混合。再次检测 A_{265} 并计算吸光度的减少。使用 MPA/EDTA 中的 0-1 mM 抗坏血酸盐标准校准该方法。

[0059] (b) 总多酚检定

[0060] 该检定基于 Veliloglu, Y.S. et al. (J. Agric. Food Chem., 46, 4113-4117 (1998)) 和 Vinson, J.A. et al. (J. Agric. Food Chem., 46, 3630-3634 (1998)) 改进的 Folin-Ciocalteu 方法。简言之，向 5 mL 的 70% (v/v) 的甲醇水溶液中加入 500 mg 的冻干磨碎材料并在 22 摄氏度下在密封离心管中振动 2 小时。在 15 摄氏度下，以 $1,000 \times g$ 离心悬浮液 10 分钟并通过 0.45 μ m 过滤器过滤上清液。在 -20 摄氏度下储存滤液直到检定。向沉淀物中加入 5 mL 的甲醇盐酸 (50% 甲醇 + 50% 1.2 M HCl)，然后将其再次悬浮并在 90 摄氏度下在密封离心管中加热 2 小时。冷却后，在 15 摄氏度下，以 $1,000 \times g$ 离心悬浮液 15 分钟，并且通过 0.45 μ m 过滤器过滤上清液。

[0061] 向 1.5 mL Folin-Ciocalteu 试剂 (0.2 M 水溶液) 中加入 200 μ L 等分滤液，并使其在 22 摄氏度下静置恰好 5 分钟。1.5 mL 碳酸氢钠溶液 (6% (w/v) 并使其在 22 摄氏度下静置 90 分钟。在 15 摄氏度下以 $1,000 \times g$ 离心溶液 10 分钟以除去雾状物并在 765 nm 下检测吸光度。与适当的甲醇水溶液或甲醇盐酸中的没食子酸标准 (0-0.2 mg. mL^{-1}) 比较 A_{765} 。总多酚浓度表示为没食子酸等价物。

[0062] 该检定还提供了结合的 (conjugated) (即，结合的 (bound)) 和游离多酚的数值。

[0063] (c) 单独的黄酮检定

[0064] 在与克兰菲尔德大学 (Cranfield University) 的合同下进行该项工作。简言之，通过 Meyer, M.D. et al., (J. Agric. Food Chem., 56, 7439-7445 (2008)) 的方法从冻干磨碎的材料除去脂质，并且如 Downes, K. et al., (Postharvest Biol. Technol., 54, 80-86 (2009)) 关于类黄酮的详细描述，和如 Giné Bordonaba, J et al., (J. Agric. Food Chem., 56, 7422-7430 (2008)) 关于花色素的详细描述，提取类黄酮并通过 HPLC 检定。参照已知标准通过二极管阵列检测组分。

[0065] (d) 糖检定

[0066] 该检定基于由 Megazyme International 提供的乳糖 / 蔗糖 / D- 葡萄糖检定程序

(Lactose/Sucrose/D-Glucose Assay Procedure) (K-LACSU)。简言之,向 5 mL 乙醇水溶液中加入 500 mg 的冻干磨碎材料并在 85-90 摄氏度孵育 5 分钟。将悬浮液定量转移至 50 mL 容量瓶并用醋酸钠缓冲液 (50 mM 醋酸钠 (pH 4.5) + 5 mM 氯化钙) 调节体积至 50 mL 并彻底混合。在微型离心机中以 $11,000 \times g$ 离心等分样品 1 分钟并向 3 mL 蒸馏水中加入 1 mL 上清液。彻底混合该溶液并向三个试验管的底部加入 0.2 mL 该溶液。向每个管中加入下列之一: 0.2 mL 的醋酸钠缓冲液 (D- 葡萄糖测定)、0.2 mL 的 β -果糖苷酶 ($10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ β -果糖苷酶 / 5 % 甘油, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛血清白蛋白和 0.02 % 苯甲酸钠 / 醋酸钠缓冲液) (蔗糖 + D-葡萄糖测定) 或 0.2 mL β -半乳糖苷酶 ($380 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ β -半乳糖苷酶的醋酸钠缓冲液) (乳糖 + D-葡萄糖测定)。在 50 摄氏度下孵育管 (包括空白试剂和 D-葡萄糖对照) 20 分钟并向所有管中加入 3.0 mL 的 GOPOD 溶液 ($> 0.3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖氧化酶, $> 0.016 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 过氧化酶和 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨基安替比林的 25 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) + 5.5 mM *p*-羟基苯甲酸和 0.01 % 叠氮化钠) 并在 50 摄氏度孵育另外 20 分钟。在 510 nm 检测吸光度并计算糖含量。

[0067] (e) 淀粉检定

[0068] 该检定基于由 Megazyme International 提供的总淀粉检定程序 (Total Starch Assay Procedure) (K-TSTA)。简言之,向 5 mL 的 80 % (v/v) 的乙醇水溶液中加入 100 mg 冻干磨碎材料,并在 80-85 摄氏度孵育 5 分钟。混合悬浮液并加入另外的 5 mL 乙醇水溶液。以 $1,800 \times g$ 离心管 10 分钟并丢弃上清液。将颗粒再次悬浮在乙醇水溶液中并搅拌。如前所述离心悬浮液并丢弃上清液。将颗粒再次悬浮在 2 mL 的 2 M 氢氧化钾中并在冰 / 水浴中搅拌大约 20 分钟。在搅拌下加入 8 mL 的醋酸钠缓冲液 (1.2 M 醋酸钠 (pH 3.8)) 并立即加入 0.1 mL 的 α -淀粉酶溶液 ($3,000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 热稳定的 α -淀粉酶的 Ceralpha 试剂 (对硝基苯麦芽庚糖苷)) 和 0.1 mL 的氨基葡萄糖苷酶溶液 ($3,300 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 淀粉葡萄糖苷酶的 *p*-硝基苯基 β -麦芽糖苷)。充分混合悬浮液并在间歇涡流的情况下在 50 摄氏度下孵育 30 分钟。将悬浮液定量转移至 100 mL 容量瓶并调节体积至 100 mL。充分混合烧瓶并在微型离心机中以 $11,000 \times g$ 离心等分溶液 1 分钟。将 0.1 mL 等分溶液转移至试验管并加入 3.0 mL 的 GOPOD 溶液。在 50 摄氏度下孵育管 (以及葡萄糖标准溶液和空白试剂) 20 分钟。在 510 nm 下检测吸光度并计算淀粉含量。

[0069] (f) 类胡萝卜素检定

[0070] 由 Intertek ASG (Manchester, England) 进行检定。简言之,用超声破碎在 20 mL 丙酮中提取 0.5 g 的冻干磨碎材料 30 分钟。在配有二极管阵列检测的 Agilent 1200 Series HPLC 上分离单独的类胡萝卜素并与可商购的已知标准比较峰。

[0071] (g) 纤维检定

[0072] 使用由 Megazyme International 提供的 Megazyme 总膳食纤维检定程序 (Megazyme Total Dietary Fibre Assay Procedure) (K-TDFR, AOAC Method 991.43) 进行该检定。简言之,将两份 1 g 冻干磨碎材料 (通过在异己烷中进行 3 次提取脱脂并干燥) 精确称量至烧杯中并分散在 40 mL 缓冲液 (50 mM 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES) + 50 mM 三 (羟甲基) 氨基甲烷 (tris), pH 8.2, 24 摄氏度) 中。加入 0.05 mL 的热稳定的 α -淀粉酶溶液 ($\sim 10,000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), 同时低速搅拌。用正方形铝箔覆盖每个烧杯并在 95 摄氏度下在持续搅动的情况下置于摇动水浴中 35 分钟。移去烧杯并将其冷却至 60 摄氏度。在 10

mL 水中冲洗烧杯侧壁和刮勺,并向每个烧杯中加入 0.1 mL 的蛋白酶溶液 ($\sim 350 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 并在 60 摄氏度下在搅拌下孵育 30 分钟。在搅拌下向每个烧杯中加入 5 mL 的 561 mM 盐酸并调节 pH 至 4.1 - 4.8。加入 0.2 mL 的淀粉葡萄糖苷酶溶液 ($3,300 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$),并在搅拌下在 60 摄氏度下孵育烧杯 30 分钟。通过预先称重的含 1 g 二氧化硅(硅藻土)的坩埚过滤酶混合物并用预热至 70 摄氏度的 10 mL 蒸馏水洗涤残留物两次。保留滤液和水洗液(water washing)以用于测定可溶纤维。用 10 mL 乙醇,接着 10 mL 丙酮洗涤不可溶纤维残留物两次,然后在 103 摄氏度烘箱中干燥过夜并称重(不可溶纤维)。在 60 摄氏度下向含可溶纤维的滤液中加入 4 体积的 96% 乙醇并在室温下使其形成沉淀 60 分钟。通过预先称重的含 1 g 硅藻土的坩埚过滤混合物并用 15 mL 的 78 % 乙醇洗涤残留物两次,用 15 mL 的 96 % 乙醇洗涤残留物两次,并用 15 mL 丙酮洗涤残留物两次。然后在 103 摄氏度的烘箱中过夜干燥坩埚并称重(可溶纤维)。在 525 摄氏度下焚化一组坩埚 5 小时以测定含灰量并使用用于不可溶蛋白质的 Lowry 试验(Lowry, O.H. et al., J. Biol. Chem. 193, 265-275 ((1951)) 检定剩余组的蛋白质。从表观纤维重量减去灰和蛋白质的含量以得到真正的纤维值。平行进行空白检定以消除试剂影响。总纤维是可溶和不可溶重量的和。

[0073] 化学分析的结果

[0074] 表 5 总结了化学分析的结果。

[0075] 不健康的饮食(UH)包含适当量的多酚/抗氧化剂化合物($615 \text{ mg GAE} \cdot \text{饮食}^{-1}$),其维生素 C 水平惊人地高于 60 mg 的英国推荐的每日限额。然而,检定的单独的类黄酮是不可检测的,这表明总酚检定仅检测了该样品中的非类黄酮抗氧化剂。在该饮食中淀粉、蔗糖和乳糖水平相对较高,表明其“加工食物”/含奶制品组合物。葡萄糖水平相对较低,表明缺乏蔬菜物质,尤其是水果。

[0076] 基于 WHO 指南的饮食(HE)包含较高水平的多酚/抗氧化剂化合物($998 \text{ mg GAE} \cdot \text{饮食}^{-1}$)和较高水平的维生素 C($176 \text{ mg} \cdot \text{饮食}^{-1}$)。其还包含 14 个检定类黄酮中的 6 个。此外,由于包括大量在 WHO 指南中规定的碳水化合物和奶制品成分,所以在该饮食中淀粉、蔗糖和乳糖水平相对较高。与不健康的饮食相反,葡萄糖水平适度高,表明包括蔬菜物质。

[0077] 对于基于 Frassetto 文献的饮食(FR),多酚/抗氧化剂化合物和维生素 C 的水平都与 HE 饮食相当(分别为 $990 \text{ mg GAE} \cdot \text{饮食}^{-1}$ 和 $153 \text{ mg} \cdot \text{饮食}^{-1}$)。其还包含 14 个检定类黄酮中的 6 个,但不是与 HE 饮食相同的六个,即表儿茶素和槲皮素-3,4-二葡萄糖苷代替了茨非醇和槲皮素。还通过在显著水平测定 β -胡萝卜素、番茄红素和叶黄素检定了类胡萝卜素。如这样的饮食所期望的,淀粉和乳糖水平低,表明缺乏加工碳水化合物和奶制品。由于包括大量蔬菜物质,所以葡萄糖水平高。有些令人惊讶地是,蔗糖水平相当高,这可能是由于加工的番茄汤。乳糖的显著水平还可能由加入汤引起。

[0078] 基于旧石器时代的饮食(PA)包含的多酚/抗氧化剂化合物和维生素 C 的水平均高于 HE 或 FR 饮食(分别为 $1719 \text{ mg GAE} \cdot \text{饮食}^{-1}$ 和 $353 \text{ mg} \cdot \text{饮食}^{-1}$),并且包含 14 个检定类黄酮中的 6 个,其特征与 HE 和 FR 饮食均不同。这表示与其他相比在基于旧石器时代的饮食中存在较高水平的植物物质。还通过在显著水平测定 β -胡萝卜素、番茄红素和叶黄素检定了类胡萝卜素,但具有比 FR 饮食较低的番茄红素水平,这是由于 FR 饮食依赖于番茄汤。在基于旧石器时代的饮食中的糖和淀粉的水平遵循基于 Frassetto 文献的饮食的趋势,但是淀粉、蔗糖和乳糖的水平较低(乳糖不显著异于零),这表明更严格的遵守旧石器

时代的饮食。较高水平的葡萄糖几乎可以肯定地归因于该饮食中较大比例的水果。总纤维的水平类似于基于 Frassetto 文献的饮食的总纤维水平,并且优于不健康饮食或者基于 WHO 指南的饮食的那些。高纤维饮食通常被认为导致营养物质在内脏中的较高保留时间,并反过来导致营养物质通过内脏壁的较高水平的吸收率。此外,可溶纤维被分解为短链脂肪酸,其反过来提供适于细菌的良好环境。

[0079] 表 5:每日饮食的化学分析结果(“UH”是指不健康的饮食,“HE”是指基于 WHO 指南的饮食,“FR”是指基于 Frassetto 文献的饮食,并且“PA”是指基于旧石器时代的饮食;“GAE”是指没食子酸等价物;“na”是指未检定;“nd”是指未检测到;* 值是两个测定值的平均值 ± 标准偏差 (SD),其他值是三个测定值的平均值 ± SD)。

[0080]

	UH	HE	FR	PA
抗氧化剂				
结合多酚 (mg GAE. 饮食 ⁻¹)	330 ± 13	728 ± 15	492 ± 18	764 ± 58
游离多酚 (mg GAE. 饮食 ⁻¹)	285 ± 0	270 ± 5	498 ± 6	955 ± 23
总多酚 (mg GAE. 饮食 ⁻¹)	615 ± 13	998 ± 28	990 ± 38	1719 ± 137
维生素 C (mg. 饮食 ⁻¹)	74 ± 3	176 ± 5	153 ± 12	353 ± 22
碳水化合物				
淀粉 (g. 饮食 ⁻¹)	8.22 ± 0.26	20.19 ± 0.17	2.50 ± 0.22	0.45 ± 0.03
葡萄糖 (g. 饮食 ⁻¹)	1.19 ± 0.10	11.9 ± 0.5	39.5 ± 0.2	59.5 ± 1.2
蔗糖 (g. 饮食 ⁻¹)	60.6 ± 1.7	54.9 ± 1.2	63.5 ± 0.7	19.3 ± 2.7
乳糖 (g. 饮食 ⁻¹)	29.4 ± 0.4	26.7 ± 1.0	11.2 ± 0.3	0.30 ± 0.52
类胡萝卜素				
番茄红素 (mg. 饮食 ⁻¹)	0.9 ± 0.0*	1.3 ± 0.2*	19.8 ± 0.0*	5.8 ± 0.0*
叶黄素 (mg. 饮食 ⁻¹)	0.0 ± 0.0*	0.5 ± 0.0*	4.5 ± 0.3*	6.7 ± 0.3**
β-胡萝卜素 (mg. 饮食 ⁻¹)	0.2 ± 0.2*	11.2 ± 0.0*	16.5 ± 0.3*	13.3 ± 0.0*
类黄酮				
芹菜素 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	3.60 ± 0.43	9.49 ± 2.32	
矢车菊素-3-葡萄糖苷 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	nd	nd	60.6 ± 4.19
矢车菊素-3-芸香糖苷 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	nd	nd	2.67 ± 0.448
翠雀素 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	nd	nd	nd
表儿茶素 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	nd	58.8 ± 17.8	64.6 ± 13.7
橙皮素 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	nd	nd	nd
苡非醇 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	0.29 ± 0.01	nd	nd
木犀草素 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	nd	nd	nd
杨梅黄酮 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	0.43 ± 0.03	2.20 ± 0.11	3.25 ± 0.20
天竺葵色素-3-葡萄糖苷 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	nd	nd	21.4 ± 1.14
槲皮素 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	0.35 ± 0.01	nd	2.86 ± 0.10
槲皮素-3,4-二葡萄糖苷 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	nd	7.71 ± 0.58	65.0 ± 1.23
槲皮素-3-葡萄糖苷 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	3.21 ± 0.11	4.26 ± 0.17	18.8 ± 0.73
槲皮素-4-葡萄糖苷 (mg. 饮食 ⁻¹)	nd	2.21 ± 0.15	8.04 ± 0.81	29.6 ± 0.92
纤维				
不可溶纤维 (g. 饮食 ⁻¹)	11.5 ± 0.3*	35.0 ± 0.7*	57.2 ± 9.3*	54.8 ± 5.70*
寡果聚糖 (Oligofructan) (g. 饮食 ⁻¹)	1.74 ± 0.39	2.90 ± 0.31	5.05 ± 0.04	6.68 ± 0.18
可溶纤维 (g. 饮食 ⁻¹)	3.2 ± 0.2*	6.4 ± 0.2*	5.4 ± 0.3*	6.9 ± 2.2*
总纤维 (g. 饮食 ⁻¹)	14.7 ± 0.4*	41.4 ± 0.7*	62.6 ± 9.3*	61.7 ± 6.1*

[0081] 表 6 总结了涉及从 Nutrientdata.com 获得的饮食的其他成分数据

[0082] 表 6:涉及从 Nutrientdata.com 获得的饮食的成分数据(“UH”是指不健康的饮食,“HE”是指基于 WHO 指南的饮食,“FR”是指基于 Frassetto 文献的饮食,并且“PA”是指基于旧石器时代的饮食)。

[0083]

营养物质	UH	HE	FR	PA
千卡	2,433	2,435		2,414
蛋白质 (能量百分数)	18	14	30	30
碳水化合物 (能量百分数)	30	62		41
糖 (g)	92	86		169
蔗糖 (g)	4.5	10		17
葡萄糖 (g)	1.4	9.6		67
果糖 (g)	1.3	9.6		62
乳糖 (g)	13	0.2		0.2
总脂肪 (能量百分数)	52	24		29
饱和脂肪 (能量百分数)	25	9		5.4
多不饱和脂肪 (能量百分数)	5	2.4		8.8
反式脂肪 (能量百分数)	0	0		0
单不饱和脂肪 (能量百分数)	18	10		10.8
ω-6 脂肪酸 (g)	11	5.1	17	8.7
ω-3 脂肪酸 (g)	1.3	1.1	1.6	14
ω-6 / ω-3 比例	8.7	4.6	10.6	0.6
钾 (g)	2.1	4.5		7.2
钠 (g)	4.0	1.5		0.92
钾 / 钠比	0.53	3.05		7.8。

[0084] 从表 6 可以看出基于旧石器时代的饮食的蛋白质:碳水化合物:脂肪的比例为 30:41:29,多不饱和比饱和脂肪的比例为 1.6 (接近 Eaton et al. 建议的 1.4)。对于不健康的饮食,蛋白质水平转化为 109 g/ 日饮食,对于基于 WHO 指南的饮食,蛋白质水平转化为 79 g/ 日饮食,并且对于基于旧石器时代的饮食,蛋白质水平转化为 182 g/ 日饮食。钠水平较低。旧石器时代的饮食的一个特征是 $\omega-6$: $\omega-3$ 脂肪酸比例低,这与该比例应该为约 10 : 1 的目前的饮食建议不一致,并且还和 Simopoulos, A.P. (Biomed. Pharmacother., 56, 365-379, (2002)) 和 Simopoulos, A.P. (World Rev. Nutrit. Dietet., 92, 1-174 (2003))(该比例应该更多的在 3:1 至 1:1 的区域内)不一致。Cordain L. et al. (Am. J. Clin. Nutrit., 71, 682-692 (2000)) 建议在采猎者的饮食中,该比例为 1.5 : 1。

[0085] 每日饮食的消化

[0086] 将前述每日饮食分为用于在人造内脏中处理的下列组以检测其对内脏微生物群 (microbiota) 的影响。

[0087] 表 7 :由用于在人造内脏中处理的组分离的饮食成分 (“UH”是指不健康的饮食,“HE”是指基于 WHO 指南的饮食,“FR”是指基于 Frassetto 文献的饮食,并且“PA”是指基于旧石器时代的饮食;用 (+) 或不用 (-) 胆汁进行预先消化;“*”是指将 PA7 和 PA13 混入 PA3,其数值为在 PA3 下得到的组合)。

[0088]

名称	内容物	食物组	胆汁	起始量 g	贡献 %	预先发酵 %	预先发酵 g
UH1	烘豆、易食米饭布丁、白面包	含淀粉的成分	-	305	100	68.9	1.516
UH2	加盐黄油、切达奶酪、牛奶	脂肪和蛋白质	+	382	6	5.2	0.114
UH9	牛奶巧克力	牛奶巧克力	+	44	6	0.6	0.013
UH10	烤薯条	烤薯条	+	100	100	22.6	0.497
UH11	猪肉香肠	猪肉香肠	+	200	6	2.7	0.060
HE1	麦片(谷物)、杂粮面包、红芸豆、白色长粒大米	含淀粉的成分	-	541	100	40.5	0.892
HE2	烤黑线鳕、牛奶、橄榄油	脂肪和蛋白质	+	434	6	2.0	0.043
HE3	香蕉、橙汁、桃	水果	-	486	100	36.4	0.801
HE4	胡萝卜、剥皮黄瓜、甜红辣椒、番茄	蔬菜	-	260	100	19.5	0.429
HE10	烤薯条	烤薯条	+	18	100	1.3	0.030
HE12	Twix 棒(2根)	Twix 棒(2根)	+	58	6	0.3	0.006
FR1	橄榄油、鲑鱼、大虾	脂肪和蛋白质	+	399	6	1.6	0.036
FR2	瓜、柠檬汁、蓝莓、鳄梨	水果	-	424	100	29.0	0.638
FR3	菠菜、番茄、黄瓜、生胡萝卜、蒸西兰花、莴苣、番茄、红洋葱	蔬菜	-	992	100	67.9	1.494
FR4	猪排	蛋白质	+	280	6	1.1	0.025
FR5	杏仁片	种子	+	72	6	0.3	0.007
PA3*	柚子、猕猴桃、带皮苹果、草莓、甜樱桃	水果	-	791	100	40.2	0.885
PA4	茄子、西兰花、胡萝卜、芹菜、新鲜罗勒、大蒜、生姜、洋葱、豌豆(冷冻的)、皱叶甘蓝、菠菜、甜黄椒、番茄、豆瓣菜、白蘑菇	蔬菜	-	1130	100	57.4	1.264
PA5	鸡胸(仅肉,无皮)、蛋、养殖的大西洋鲑鱼、小虾/大虾	蛋白质	+	700	6	2.1	0.047
PA6	棕色亚麻籽、芹菜籽、榛子、芝麻酱	种子	+	61	6	0.2	0.004
PA7*	含苹果汁的干蓝莓、干无花果、未硫化的杏仁干、无核葡萄干	果脯					
PA13*	蜂蜜	蜂蜜					

[0089] (a) 预先消化

[0090] 如表 7 所示,将每日饮食分为类似的蛋白质、脂肪或碳水化合物组合物的组分,并且根据 Miller et al. (Am. J. Clin. Nutr., 34, 2248-2256 (1981)) 进行预先消化。向

每种组分中加入足量的水以在手动搅拌器混合后获得悬浮液,用 6 M HCl 将该悬浮液调节至 pH 2.0,此时加入猪胃蛋白酶至终浓度为 5 mg/mL。然后在 37 摄氏度下孵育悬浮液 2 小时,接着用 6 M NaOH 调节 pH 至 pH > 5.0。然后,加入胰酶至终浓度为 0.8 mg/mL。然后向脂肪类组分中加入胆汁至终浓度为 5 mg/mL。进一步增加 pH 至 7.0,并在 37 摄氏度下通过 pH 控制器 (Electrolab) 用 1 M NaOH 和 1 M HCL 保持中性 2 小时。在 8-12 摄氏度下在透析管 (Spectra/Por) 中在截留分子量为 1kDa (Serva Electrophoresis GmbH) 的情况下防水透析所得悬浮液 26 小时来彻底除去降解产物,同时持续除去透过物(水不断被更新)以模拟较小分子通过小肠壁的吸收。冻干渗余物(retentate)。

[0091] (b) 分批发酵

[0092] 从文献估计应该有助于接着被发酵的每一渗余物的估计量,并在表 7 中在标题为“贡献”的栏中给出。据此混合每一渗余物的相应量以重建预先消化后的每日饮食。根据相等重量的重建的每日饮食以及使用在每种饮食的相对贡献上标准化的量进行发酵。在预先消化之前,假设饮食为相等的含热量。根据预先消化后其计算的总重量,同时考虑每一成分组的相对贡献来计算发酵中使用的每种饮食的相对量。

[0093] 在一式三份的两个不同的健康人志愿者的排泄物中进行具有 pH 控制的分批发酵,所述志愿者在研究前的至少 6 个月内未被开过抗生素处方并且没有任何胃肠疾病史。在收集后立即将排泄物储存在 37 摄氏度下的厌氧条件下。在厌氧磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (8 g NaCl, 0.2 g KCL, 1.15 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄, pH=7.3) 中稀释排泄物 10 倍并在胃托中均质化 2 分钟,产生排泄物浆。

[0094] 在装有 180 mL 基础培养基(每升, 2 g 蛋白胨水(peptone water) (Oxoid), 2 g 酵母提取物 (Bacto), 2 g NaHCO₃, 0.5 g 3 号胆汁盐 (Oxoid), 0.5 g L- 半胱氨酸, 10 mL 每一下列溶液: NaCl (10 g/L; Fisher Scientific)、K₂HPO₄ (4 g/L; Merck)、KH₂PO₄ (4 g/L; Sigma)、MgSO₄·7H₂O (1 g/L; Merck)、CaCl₂·6H₂O (1 g/L; Fisher Scientific), 10 mL 血晶素溶液 (0.5 g/L; Sigma), 4 mL 刃天青溶液 (0.25 g/L (Brocades Stheeman & Pharmacia)), 2 mL 聚山梨醇酯 80、10 μL 维生素 K1) 的 300 mL 水夹套恒化器 (water-jacketed chemostat) (Soham Scientific) 中进行发酵。开始在 121 摄氏度下将该基础培养基高压杀菌 (autoclave) 15 分钟,然后在 37 摄氏度下保持,并通过 pH 控制器 (Electrolab) 将 pH 保持在 pH 6.8-7.0。用无 O₂ 的 N₂ 连续喷射基础培养基。将来自预先消化步骤的每种饮食的混合渗余物再次悬浮在 20 mL 基础培养基中,并加入到恒化器中,并用 20 mL 的排泄物浆孵育。当使饮食与重量相等或根据相对贡献标准化时,每种饮食的混合渗余物的终浓度为 1% w/v,具有最低贡献组的饮食在 220 mL 的总体积中为 0.5% w/v。在 0、4、8、19、27、44 小时从恒化器中取出多个 1 mL 样品。在台式离心机中以最大速度离心样品 2 分钟以收集来自上清液的细胞。将颗粒和上清液都在 -20 摄氏度冷冻以用于以后使用。

[0095] 用与每种饮食的混合渗余物的量匹配的菊粉的量进行仅有空白和菊粉的发酵(无需预先消化)。菊粉用作阳性对照以确定发酵发生。

[0096] DNA 分离

[0097] 使用来自 Qiagen 的粪便分离试剂盒,根据制造商的说明并进行下列修改来进行从冷冻细胞颗粒 (cell pellet) 的 DNA 分离以用于微生物量化。向再次悬浮在细胞裂解缓冲液(试剂盒中提供的 ASL 缓冲液)中的细胞中加入 600-650 mg 0.1 mm 氧化锆 / 二氧

化硅玻璃珠 (BioSpec Products)。然后,在高速台式摆动装置 (reciprocating device) 中以设定为 6 的速度震动含有珠子的悬浮液 45 秒以破坏细胞膜 (Fastprep® FP120 (MP Biomedicals))。该操作导致细胞的机械裂解。在 95 摄氏度下孵育所得悬浮液 5 分钟并将所得 DNA 储存在 -20 摄氏度直到下次使用。

[0098] 由 qPCR 进行的微生物量化

[0099] 在表 8 中列出了用于七个靶点中的每一个的引物 (Applied Biosystems 或 Invitrogen)、参照 DNA、靶向有机体、基因组重量和聚合酶链反应 (PCR) 条件。在 Applied Biosystems 7500 实时 PCR 仪上使用 7500 实时 PCR 系统序列检测软件, 1.3.1 版 (Applied Biosystems) 进行定量 PCR 反应和后续分离分析。在含 12.5 μ L POWER SYBR Green I PCR Master Mix, 正向和反向引物以及 2.5 μ L 10 倍稀释的提取 DNA 的 25 μ L 体积中进行鉴定。

[0100] 表 8: PCR 条件和用于细菌列举的参照菌株

[0101]

PCR靶点 (扩增子大小, 参照DNA, 参照DNA大小)	退火**	引物 (nM)	序列 (5'→3')	引物 SEQ ID
总细菌 (466, 普氏梭杆菌 (<i>F. prausnitzii</i>) ATCC 27766 16S DNA PCR 产物 *, 1540 bp)	55	F_cub (100) R_cub (100)	TCCTACGGGAGGCAGCA GT GGACTACCAGGGTATCT AATCCTGTT	1 2
双歧杆菌属 (<i>Bifidobacterium</i>) (550, 长双歧杆菌 (<i>B. longum</i>) ATCC 15707, 3 Mb)	55/60	g-Bifid-F (100) g-Bifid-R (100)	CTCCTGGAAACGGGTGG GGTGTCTTCCCATATCT ACA	3 4
脆弱拟杆菌群 (<i>Bacteroides fragilis</i> group) (495, <i>B.</i> <i>eggertii</i> ATCC 27754, 1.6 Mb)	55	g-Bifra-F (100) g-Bifra-R (100)	ATAGCCCTTCGAAAGRA AGAT CCAGTATCAACTGCAAT TTTA	5 6
球形梭菌群 (<i>Clostridium coccoides</i> group) (440, <i>R. productus</i> ATCC 27340, 4 Mb)	55	g-Ccoc-F (100) g-Ccoc-R (100)	AAATGACGGTACCTGAC TAA CTTTGAGTTTCAATCTTG CGAA	7 8
柔嫩梭菌群 (<i>Clostridium leptum</i> group) (239, 普氏梭杆菌 (<i>F.</i> <i>prausnitzii</i>) ATCC 27766 16S DNA PCR 产物 *, 1540 bp)	55	sp-Clept-F (100) sp-Clept-R (100)	GCACAAGCAGTGGAGT CTTCTCCGTTTGTGCAA	9 10
普氏梭杆菌 (<i>F. prausnitzii</i>) (199, 普氏梭杆菌 (<i>F. prausnitzii</i>) ATCC 27766 16S DNA PCR 产物 *, 1540 bp)	62/64	Fpri (100) Rpri (100)	AGATGOCCTCCGTCGG A CCGAAGACCTTCTTCCT CC	11 12
乳杆菌属 (<i>Lactobacillus</i>) (340, 罗氏乳杆菌 (<i>L. reuteri</i>) ATCC 55730, 2 Mb)	58/63	LacI (800) Lab-0677 (800)	AGCAGTAGGGAATCTTC CA CACCCTACACATGGAG TGATTCGCATGGTTTC	13 14
脆弱拟杆菌 (<i>B. fragilis</i>) (243, 脆弱拟杆菌 (<i>Bacteroides fragilis</i>) CMCC 2151, 1.6 Mb)	60	BaFRA-F (1000) BaFRA-R (1000)	ATT CGACCCATAGAGCTTTC ATC	15 16
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) O157:H7 (63, 大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) O157:H7 CMCC 3571, 2.3 Mb)	60	EaO157F (200) EaO157R (200)	TCGAGCGGACCATGATC A GGCGGCGTCTGAGATAA CA	17 18 19 20

[0102] * 普氏梭杆菌 (*F. prausnitzii*) 难以培养, 因此用引物 TPU1 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) (引物 Seq. Id. 15) 和 RTU8 (AAGGAGGTGATCCANCCRCA) (引物 Seq. Id. 16) 扩增普氏梭杆菌 (*F. prausnitzii*) 16S rDNA 以充当参照物

[0103] ** 每次扩增由在 95°C 静置 10', 然后在 95°C 进行 40 个 15" 循环, 可变退火, 每次 20", 并且在 60 - 72°C 延伸, 每次 1 min 组成。

[0104] 对于定量分析, 将每个样品的阈值循环 (Ct) 与从相应参照菌株的染色体 DNA 的连续 DNA 稀释得到的标准曲线相比。通过用 DNA 浓度除以基因组重量来计算相当于 1 μ L 参照 DNA 的细胞数量。反过来, 通过用以 bp 表示的相应基因组大小乘以碱基对重量 (607.4

g/mol) 并除以阿伏伽德罗数 (6.02×10^{23}) 来计算基因组重量。用 1 个参照材料的拷贝数进行计算, 这表明一个靶向基因组或 16S 重组 DNA (rDNA) 分子代表一个细菌细胞。考虑到 DNA 分离方法中的稀释步骤, 结果表示为拷贝数 /mL。

[0105] 图 1a 和 1b 显示在不健康的饮食中普拉氏梭杆菌 (*F. prausnitzii*) 显著降低, 而基于 WHO 指南的饮食和基于旧石器时代的饮食支持了普拉氏梭杆菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*)。普拉氏梭杆菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*) 是被认为具有抗炎性质的细菌, 并且在患有炎症肠病的患者中不存在或较少占优势。

[0106] 图 2a 至 2c 和图 3a 至 3c, 后一组图用于在每种饮食的相对贡献上标准化的饮食, 其显示尽管在志愿者之间存在有所期望的微生物数量方面的一些变化, 但基于旧石器时代的饮食通常显示出较高的微生物总水平。

[0107] 使用 HITChip 分析进行细菌水平的半定量分析

[0108] 通过 GI-Health B.V. 根据 Rajilic-Stojanovic, M. (Diversity of the human gastrointestinal microbiota novel perspectives from high throughput analyses (2007)) 进行人肠道碎片 (Human intestinal tract chip) (HITChip) 分析。简言之, 使用引物 *T7prom-Bact-27-for* (5'-TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') (引物 Seq. Id. 17) 和 *Uni-1492-rev* (5'-CGG CTA CCT TGT TAC GAC-3') (引物 Seq. Id. 18) (GI-Health B.V.) 扩增 16S rDNA。纯化并量化 PCR 产物, 然后使用 Riboprobe 系统 (Promega), 进行通过 *T7prom-Bact-27-for* 引物引入的 T7-启动子的体外转录。用脱氧核糖核酸酶 (DNase) 处理用氨基-烯丙基-修饰的核苷酸标记的所得 RNA, 纯化并使用 Post-Labeling Reactive Dye (Amersham Biosciences) 用 CyDye 使其与 Cy3 或 Cy5 (都是花青素染料家族的反应性水溶性荧光染料) 连接。通过 Agilent Technologies (Agilent Technologies) 合成自定义微阵列芯片 (custom microarray)。用分别被 Cy3 和 Cy5 标记的两个样品杂交每个芯片并检测。使用 Ambion 裂解试剂 (fragmentation reagent) (Ambion) 在 70 摄氏度裂解标记的 RNA 混合物 20 分钟来产生靶向混合物。过夜杂交芯片, 洗涤并干燥。使用 Agilent 提取软件从微阵列芯片图像提取数据并标准化。

[0109] 结果例示在图 2 中, 其显示出健康的饮食 (“健康的”), 基于 WHO 指南的饮食 (“健康的”), 和基于旧石器时代的饮食 (“旧石器时代的”) 的 HITchip 分析产生的气单胞菌属 (*Aeromonas sp.*) 和脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 的随时间 (小时) 的 log 强度值的变化。HITchip 和 qPCR 结果显示了与其他饮食相比在基于旧石器时代的饮食的发酵中拟杆菌属 (*Bacteroides*) 增加 (考虑到基于旧石器时代的饮食的总发酵较少 (参见表 9), 所以即使发酵较少材料, 也在基于旧石器时代的饮食中看到了相当量的拟杆菌属 (*Bacteroides*), 这表明如果发酵水平相等, 则基于旧石器时代的饮食中拟杆菌属 (*Bacteroides*) 的数量将更高)。类似地, HITchip 分析还显示出对于旧石器时代的饮食, 发酵中气单胞菌属 (*Aeromonas sp.*) 增加。这些结果表明基于旧石器时代的饮食导致增加的对引起腹泻的细菌感染的坚固性, 所述细菌更具体地为气单胞菌属 (*Aeromonas sp.*) 和产生毒素的脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*)。此外, 细菌群落都增加可以与增加的对感染性疾病 (特别是气单胞菌属 (*Aeromonas*) 和拟杆菌 (*Bacteroides sp.*) 的产生毒素的成员的感染) 的抵抗力有关。其中的基本原理是相同种类的非产生毒素的细菌的增加刺激了免疫系统以识别这些类型的细菌, 其次, 增加水平的占据相同位置的非致病细菌是其他

致病细菌入侵的更好屏障。

[0110] NMR分析

[0111] 将来自发酵的上清液解冻并在 8 摄氏度以 $21912 \times g$ 离心 5 分钟。通过向 450 μL 上清液中加入含 10 mM 氘代的三甲基甲硅烷基丙酸钠 (d-TSP) 的 50 μL 氧化氘 (D_2O) 制备 NMR 样品。 D_2O 和 d-TSP 分别充当场频锁 (field frequency lock) 和化学位移参照。在 Bruker Avance 600 NMR 分光光度计上在 600.13 MHz 的质子 NMR 频率和 300 K 的温度下获得一维 (1D) 高分辨 1H NMR 谱。使用 5 mm TXI 探针和用于样品递送的样品变换器。使用具有 32k 数据点和超过 8993 Hz 的 64 次扫描的 Noesyprsat 脉冲序列。在弛豫延迟 (3 s) 和混合时间 (150 ms) 期间实现水抑制。使用 Topspin 1.3 软件 (Bruker Analytik, Rheinstetten, Germany) 手动修正光谱的相和基线失真。在傅立叶转换之前将谱线增宽系数 (line-broadening factor) 为 0.3 Hz 的指数窗函数应用于自由感应衰减 (FID)。光谱参照 TSP。使用包括在不同 pH 值下代谢物的参照光谱的数据库 (biorefcode-2-0-0 implemented in Amix 3.7.3. (Bruker Biospin GmbH)) 鉴定代谢物。使用软件 ChenomX NMR Suite 5.1. (ChenomX Inc.) 量化代谢物。

[0112] 表 9 : 无食物饮食 (“bl”)、不健康的饮食 (“uh”)、基于 WHO 指南的饮食 (“he”)、基于旧石器时代的饮食 (“pa”) 和基于菊粉的饮食 (“in”) 中短链脂肪酸 (SCFA) 的相对比例 (%) 对发酵时间 (小时), 特别是丙酸、丁酸、乙酸和乳酸 (“P/A” 丙酸酯 : 乙酸酯比 ; 以 mg 表示总 SCFA)。

[0113]

底物	时间 (h)	SCFA 比例 (%) 和总量 (mg)											
		分批发酵志愿者 I						分批发酵志愿者 II					
		丙酸	丁酸	乙酸	乳酸	SCFA	P/A	丙酸	丁酸	乙酸	乳酸	SCFA	P/A
Bl	0	15%	28%	28%	30%	8.88	0.52	13%	27%	24%	36%	11.29	0.53
Bl	4	19%	25%	43%	13%	18.03	0.45	20%	26%	40%	14%	17.93	0.49
Bl	8	20%	26%	47%	7%	23.12	0.42	24%	25%	41%	10%	23.92	0.56
Bl	19	21%	27%	48%	4%	26.72	0.44	25%	26%	41%	8%	27.62	0.61
Bl	27	21%	28%	47%	3%	26.76	0.45	26%	27%	40%	7%	28.19	0.65
Bl	44	22%	28%	46%	3%	26.98	0.47	27%	28%	41%	4%	30.59	0.66
Uh	0	12%	20%	29%	32%	12.02	0.48	11%	20%	29%	37%	14.82	0.45
Uh	4	12%	14%	50%	23%	43.35	0.20	14%	22%	51%	13%	49.90	0.32
Uh	8	16%	16%	63%	3%	59.07	0.26	21%	25%	50%	3%	65.07	0.36
Uh	19	16%	16%	63%	1%	72.94	0.26	22%	26%	50%	2%	78.07	0.32
Uh	27	20%	17%	63%	1%	72.35	0.26	22%	26%	50%	2%	77.20	0.33
Uh	44	20%	17%	62%	1%	75.79	0.27	23%	27%	49%	2%	81.53	0.34
He	0	14%	26%	30%	28%	10.04	0.52	12%	26%	26%	34%	11.70	0.50
He	4	11%	14%	55%	21%	41.04	0.19	16%	21%	50%	13%	42.64	0.25
He	8	17%	16%	65%	2%	60.73	0.27	20%	25%	53%	2%	56.10	0.25
He	19	16%	16%	64%	1%	73.42	0.28	17%	26%	54%	3%	73.62	0.25
He	27	16%	20%	63%	1%	76.97	0.29	18%	26%	54%	3%	73.93	0.25
He	44	16%	21%	61%	1%	76.96	0.30	18%	27%	53%	2%	77.38	0.26
Pa	0	15%	26%	31%	28%	10.04	0.47	14%	26%	27%	31%	9.39	0.52
Pa	4	14%	17%	55%	18%	33.71	0.25	16%	26%	51%	4%	31.21	0.36
Pa	8	18%	18%	61%	2%	47.77	0.30	20%	23%	52%	2%	46.43	0.43
Pa	19	18%	16%	60%	2%	53.36	0.31	21%	24%	52%	2%	51.95	0.40
Pa	27	19%	20%	60%	1%	57.17	0.31	21%	24%	52%	2%	53.47	0.41
Pa	44	19%	22%	58%	2%	57.80	0.32	22%	25%	51%	2%	56.18	0.43
In	0	14%	27%	27%	32%	8.80	0.47	13%	27%	26%	35%	10.38	0.47
In	4	10%	17%	53%	20%	34.52	0.24	12%	21%	50%	16%	47.73	0.27
In	8	15%	16%	64%	2%	59.79	0.31	14%	27%	55%	2%	60.88	0.42
In	19	16%	17%	64%	1%	61.75	0.31	14%	26%	57%	3%	79.38	0.45
In	27	16%	16%	63%	1%	60.36	0.31	14%	27%	57%	3%	81.36	0.45
In	44	18%	19%	62%	1%	64.97	0.32	14%	27%	56%	3%	86.15	0.47

[0114] 在表 9 中总结一些结果, 其显示出无食物饮食 (“bl”)、不健康的饮食 (“uh”)、基于 WHO 指南的饮食 (“he”)、基于旧石器时代的饮食 (“pa”) 和基于菊粉的饮食 (“in”)

中短链脂肪酸 (SCFA) 的相对比例对发酵时间,特别是丙酸、丁酸、乙酸和乳酸。明显地,基于旧石器时代的饮食显示出最高的丙酸酯 : 乙酸酯比 (P/A)。这表明基于旧石器时代的饮食可以导致改进的心血管健康。

[0115] 在表 10 中总结了第二轮发酵的结果,其中能够看出一般来说,基于旧石器时代的饮食的丙酸酯 : 乙酸酯比 (P/A) 比基于 WHO 指南的饮食或基于 Frassetto 文献的饮食高,并且因此支持了表 9 中的数据。

[0116]

表 10: 无食物饮食("bl")、不健康的饮食("uh")、基于 WHO 指南的饮食("he")、基于旧石器时代的饮食("pa")、基于 Frassetto 文献的饮食("fr")和基于菊粉的饮食("in")中短链脂肪酸(SCFA)(mM)对发酵时间(小时), 特别是丙酸、丁酸、乙酸和乳酸("P/A" 丙酸酯: 乙酸酯比; 以 mg 表示总 SCFA)。基于相等重量的饮食的发酵由"1"表示(即, "uh1"、"he1"、"fr1"和"pa1"), 而在其相对贡献上标准化的饮食的发酵由"2"表示(即, "uh2"、"he2"、"fr2"和"pa2")。"NA"表示数值不可得。

底物	时间 (h)	SCFA 比例																	
		分批发酵志愿者1					分批发酵志愿者2					分批发酵志愿者3							
		丙酸	丁酸	乙酸	乳酸	总 SCFA	P/A	丙酸	丁酸	乙酸	乳酸	总 SCFA	P/A	丙酸	丁酸	乙酸	乳酸	总 SCFA	P/A
Bl	0	1.0	3.9	3.7	6.3	14.9	0.26	0.7	3.4	2.5	5.8	12.5	0.28	量	3.1	2.1	5.1	10.4	NA
Bl	46	8.5	8.5	19.7	2.9	39.5	0.43	10.1	10.7	19.9	3.1	43.8	0.51	6.1	8.2	13.8	2.5	30.5	0.44
Pa1	0	1.0	4.6	4.4	4.9	14.9	0.22	0.7	3.4	3.3	4.2	11.5	0.21	0.6	2.9	3.0	3.3	9.8	0.19
Pa1	46	20.9	12.8	50.9	1.0	85.5	0.41	24.6	25.7	36.1	1.6	88.1	0.68	18.1	11.2	46.5	1.0	76.9	0.39
Fr1	0	1.0	5.6	4.6	5.8	17.0	0.23	0.8	4.4	3.3	5.1	13.6	0.24	0.6	3.5	3.4	3.6	11.2	0.19
Fr1	46	19.6	11.2	46.2	1.6	78.7	0.42	28.3	27.2	44.4	1.7	101.6	0.64	13.7	10.8	36.9	2.6	64.0	0.37
Uh	0	1.0	5.1	3.8	6.6	16.4	0.27	0.8	3.9	2.8	6.1	13.5	0.27	0.6	3.6	2.6	5.2	12.0	0.24
Uh	46	19.2	10.5	35.5	2.8	68.0	0.54	20.3	21.8	27.7	2.6	72.4	0.73	25.3	13.8	58.0	1.6	98.7	0.44
He	0	1.0	3.3	5.4	2.9	12.6	0.19	0.6	3.4	3.2	3.5	10.6	0.20	0.5	2.5	2.6	2.2	7.8	0.19
He	46	28.2	27.0	101.7	1.2	158.1	0.28	19.0	12.7	95.6	1.4	128.7	0.20	24.7	13.7	85.7	0.9	125.1	0.29
Pa2	0	1.1	5.4	5.5	4.8	16.8	0.19	0.7	4.5	4.4	4.0	13.6	0.15	0.8	4.7	4.8	3.5	13.8	0.17
Pa2	46	34.8	13.2	119.6	0.7	168.3	0.29	30.7	24.5	82.6	1.2	139.0	0.37	36.6	9.7	88.6	0.5	135.5	0.41
Fr2	0	1.0	5.2	4.6	5.0	15.9	0.21	0.7	4.7	4.0	4.5	14.0	0.18	0.7	4.6	3.9	4.1	13.4	0.18
Fr2	46	26.2	10.6	59.4	0.9	97.1	0.44	38.1	29.0	67.2	2.0	136.3	0.57	24.8	8.2	61.5	1.2	95.5	0.40
In	0	0.9	3.9	3.5	6.1	14.4	0.26	量	2.9	2.1	5.3	10.4	NA	量	2.6	2.0	4.4	9.0	NA
In	46	26.0	16.7	80.9	1.8	125.4	0.32	15.4	24.7	42.9	2.1	85.1	0.36	20.8	15.9	47.7	1.4	85.8	0.44

序列表

<110> Unilever PLC
Hindustan Unilever Limited
Unilever NV
BLIGH, Heather F J
CASEY, John
HUNTER, Karl J
BERRY, Mark J
KEMPERMAN, Rob 龔 A

<120> 用于饮食健康管理的组合物

<130> T3236 CPL

<150> EP10164261

<151> 2010-05-28

<160> 20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<400> 1

tcctacggga ggcagcagt

19

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<400> 2

ggactaccag ggtatctaata cctggtt

26

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<400> 3

ctcctggaaa cgggtgg

17

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<400> 4

ggtgtttcttc ccatatctac a

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<400> 5	
atagcctttc gaaagraaga t	21
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供	
<400> 6	
ccagtatcaa ctgcaatttt a	21
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供	
<400> 7	
aaatgacggt acctgactaa	20
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供	
<400> 8	
ctttgagttt cattcttgcg aa	22

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<400> 9

gcacaagcag tggagt

16

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<400> 10

cttcctccgt tttgtcaa

18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<400> 11

agatggcctc gcgtccga

18

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<400> 12

ccgaagacct tcttcctcc

19

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<400> 13

agcagtaggg aatcttcca

19

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<400> 14

caccgctaca catggag

17

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> m is a, or c

<400> 15

agagtttgat cmtggctcag

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 16

aaggaggtga tccanccrca

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供

<400> 17	
tgattccgca tggtttcatt	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供	
<400> 18	
cgaccecatag agccttcac	20
<210> 19	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供	
<400> 19	
tgcgcggac catgatca	18
<210> 20	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 由 Applied Biosystems 或 Invitrogen 提供	
<400> 20	
ggcggcgtct gagataaca	19

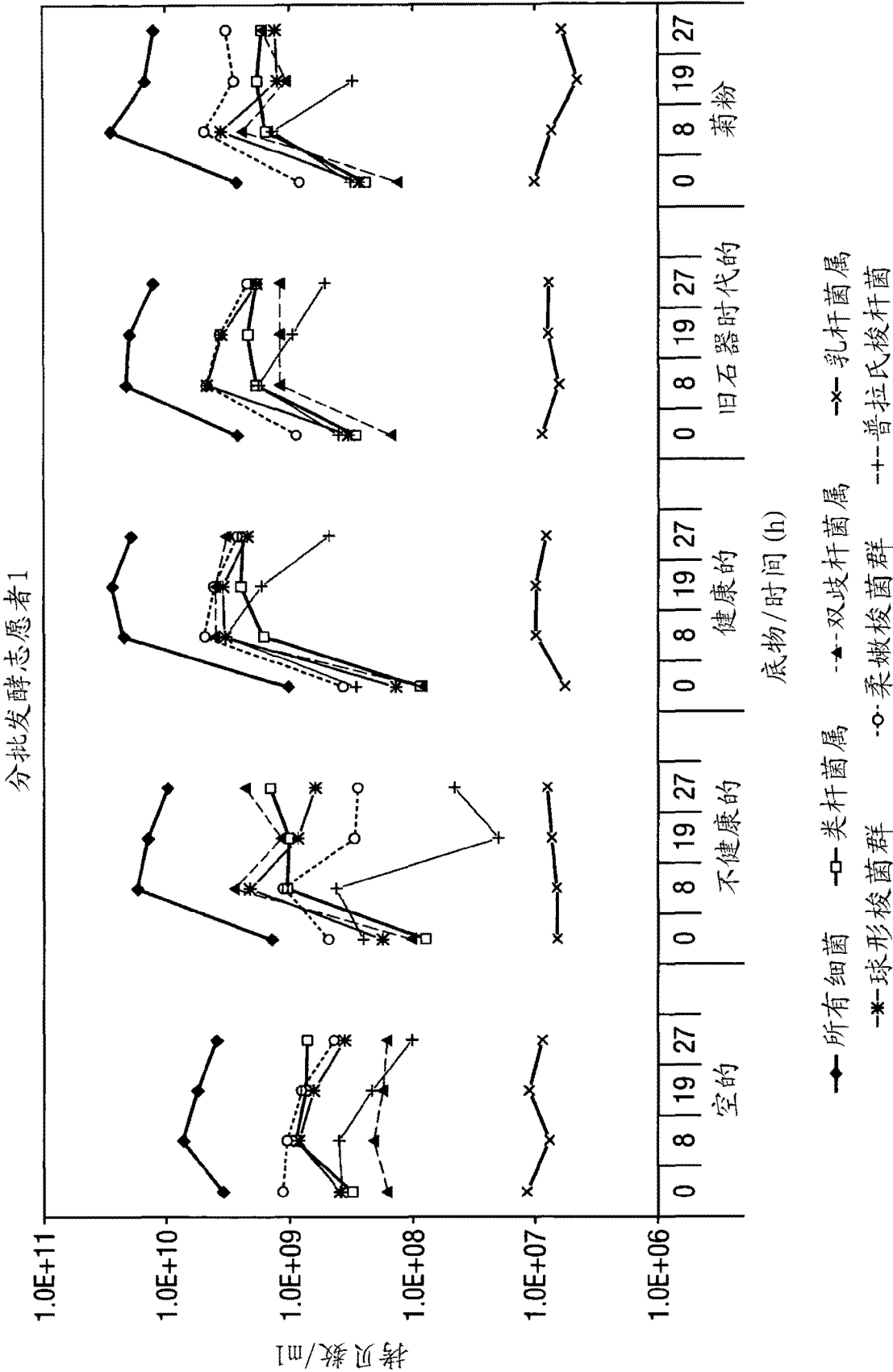


图 1a

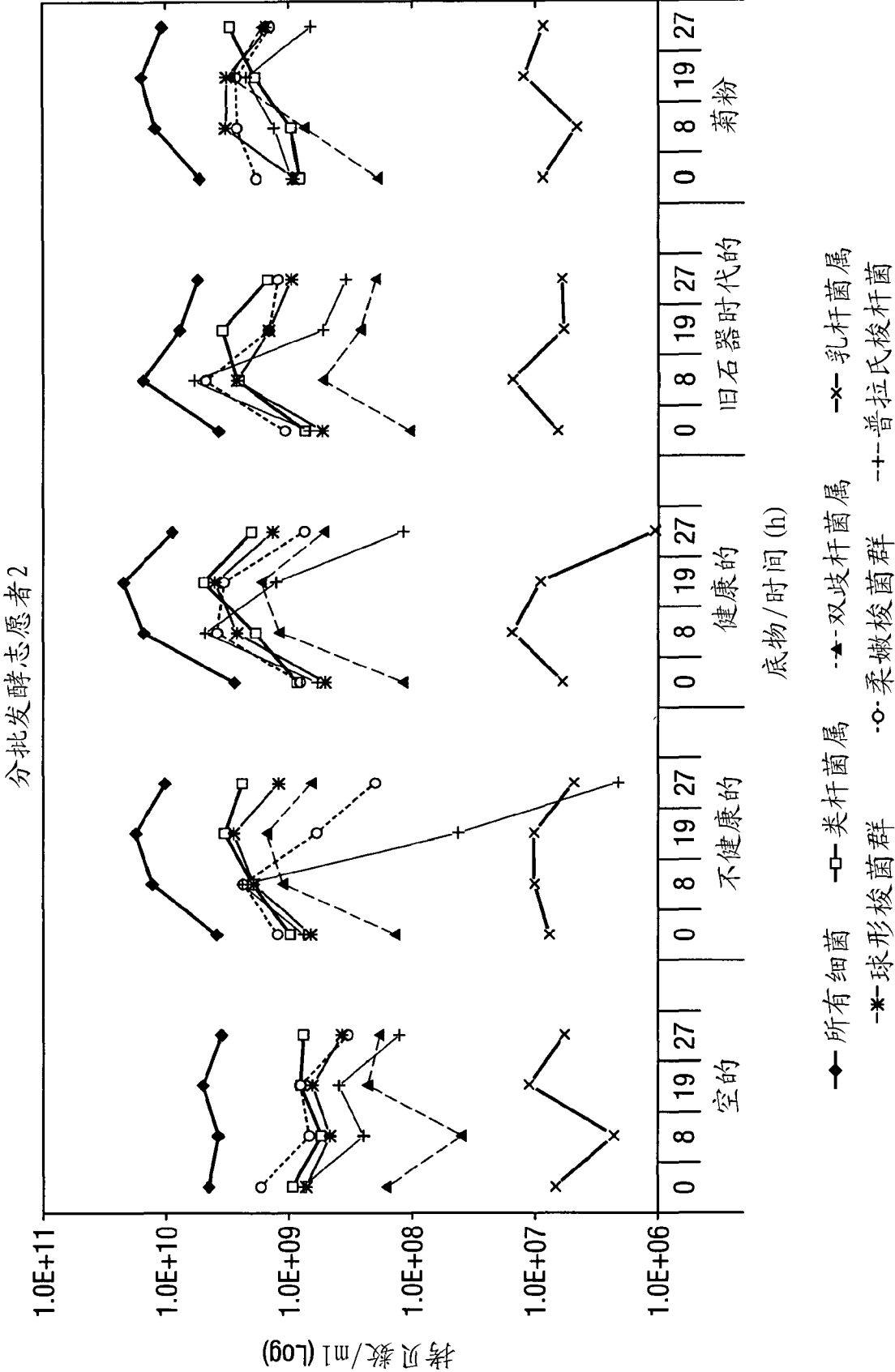


图 1b

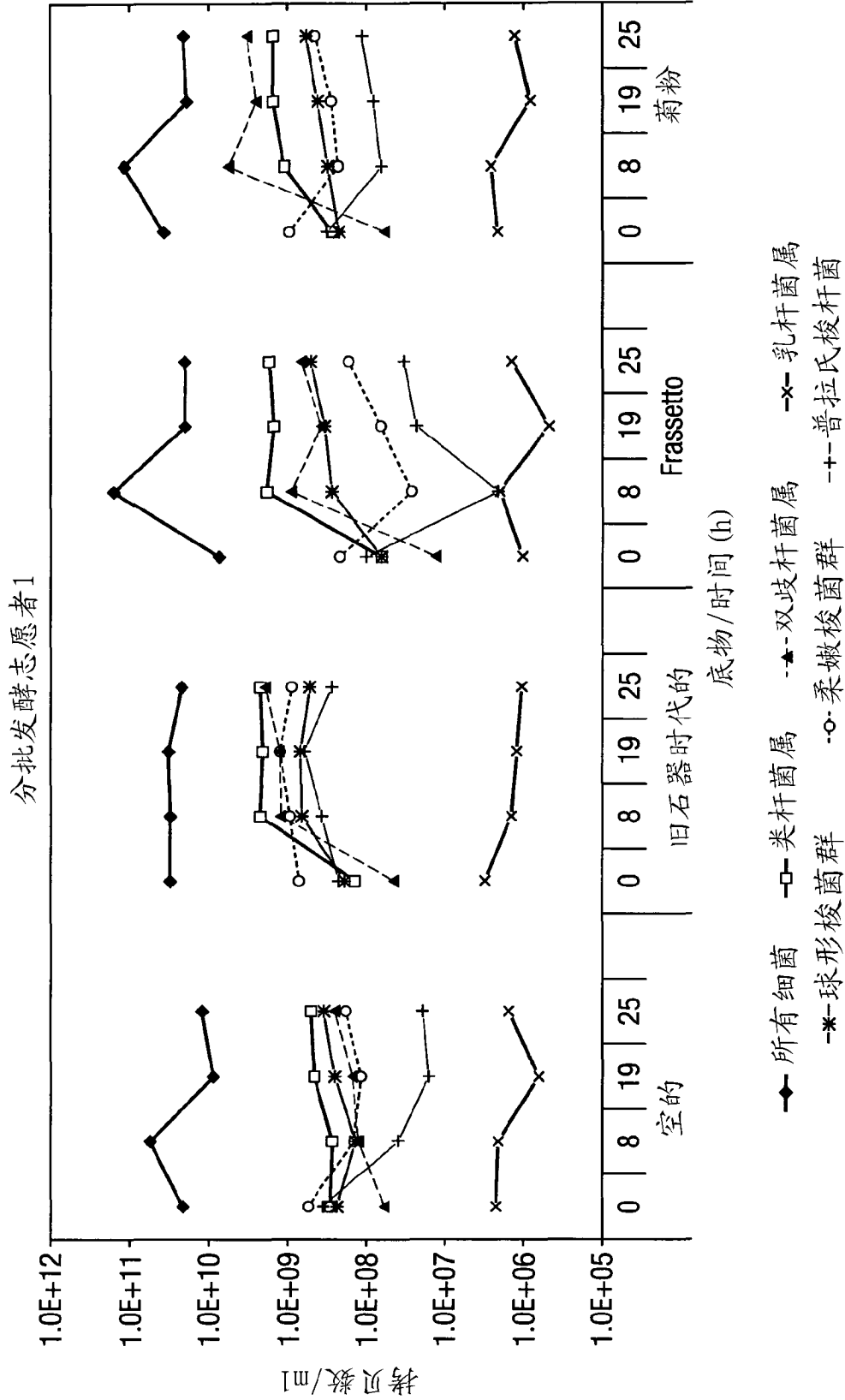


图 2a

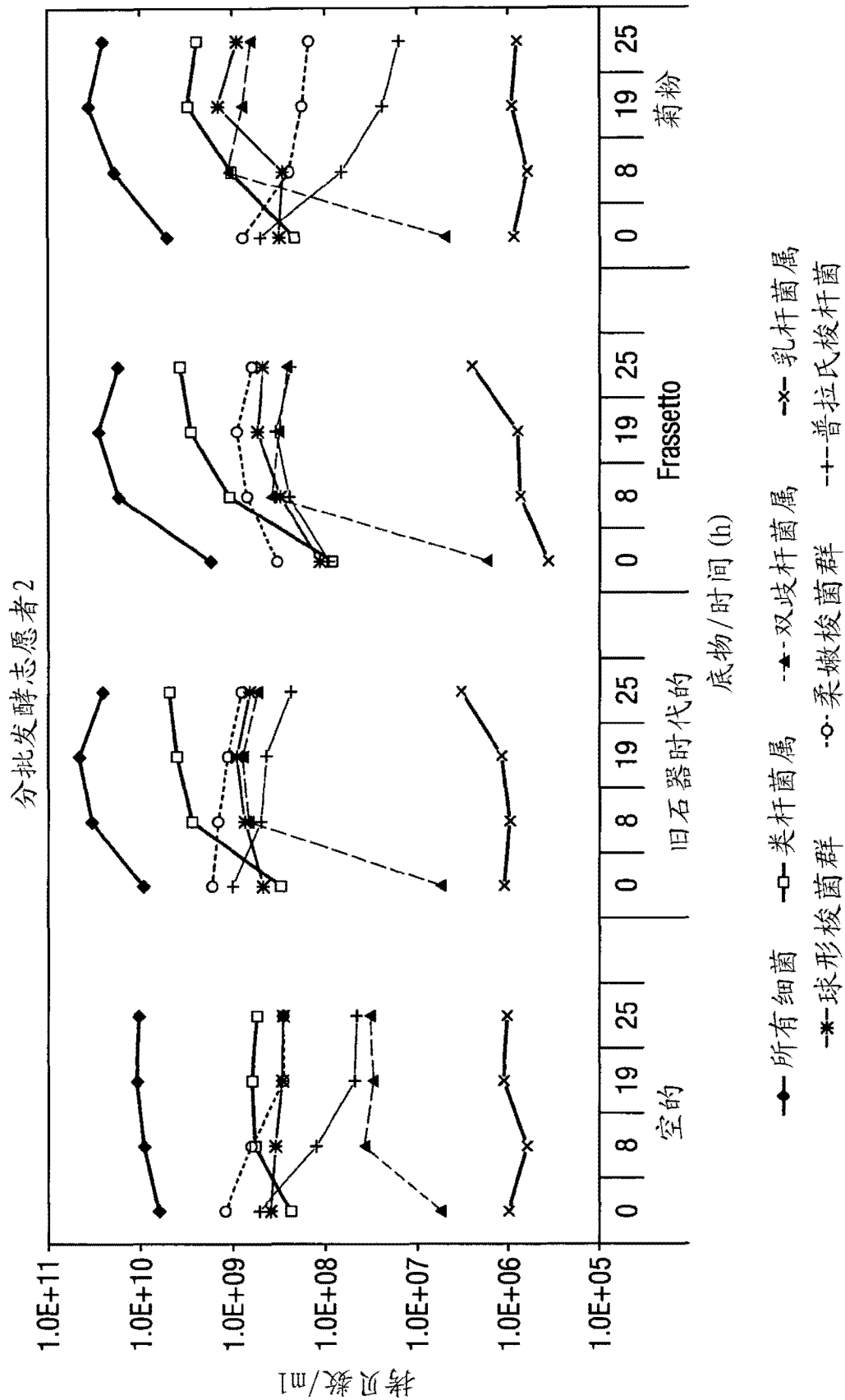


图 2b

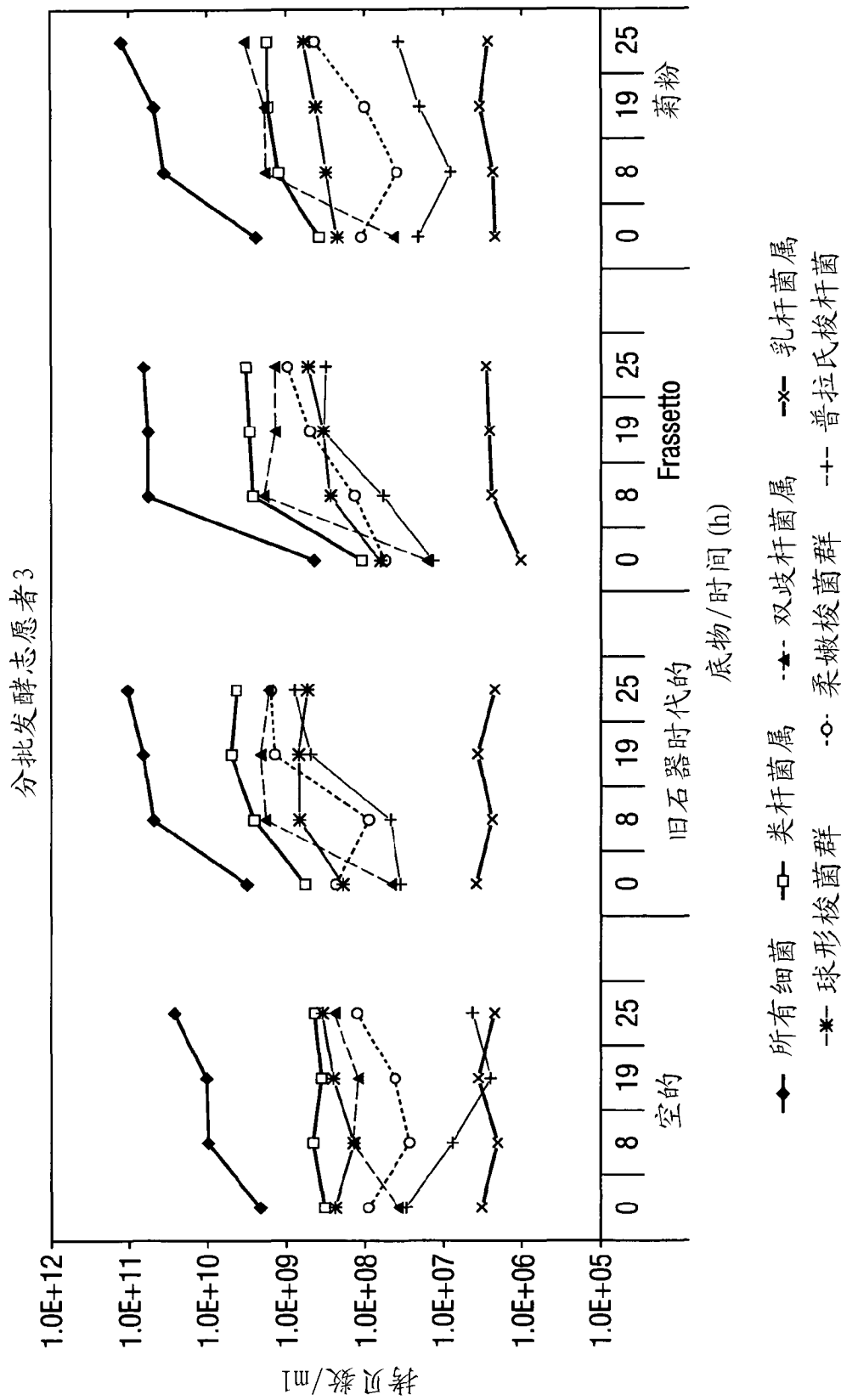


图 2c

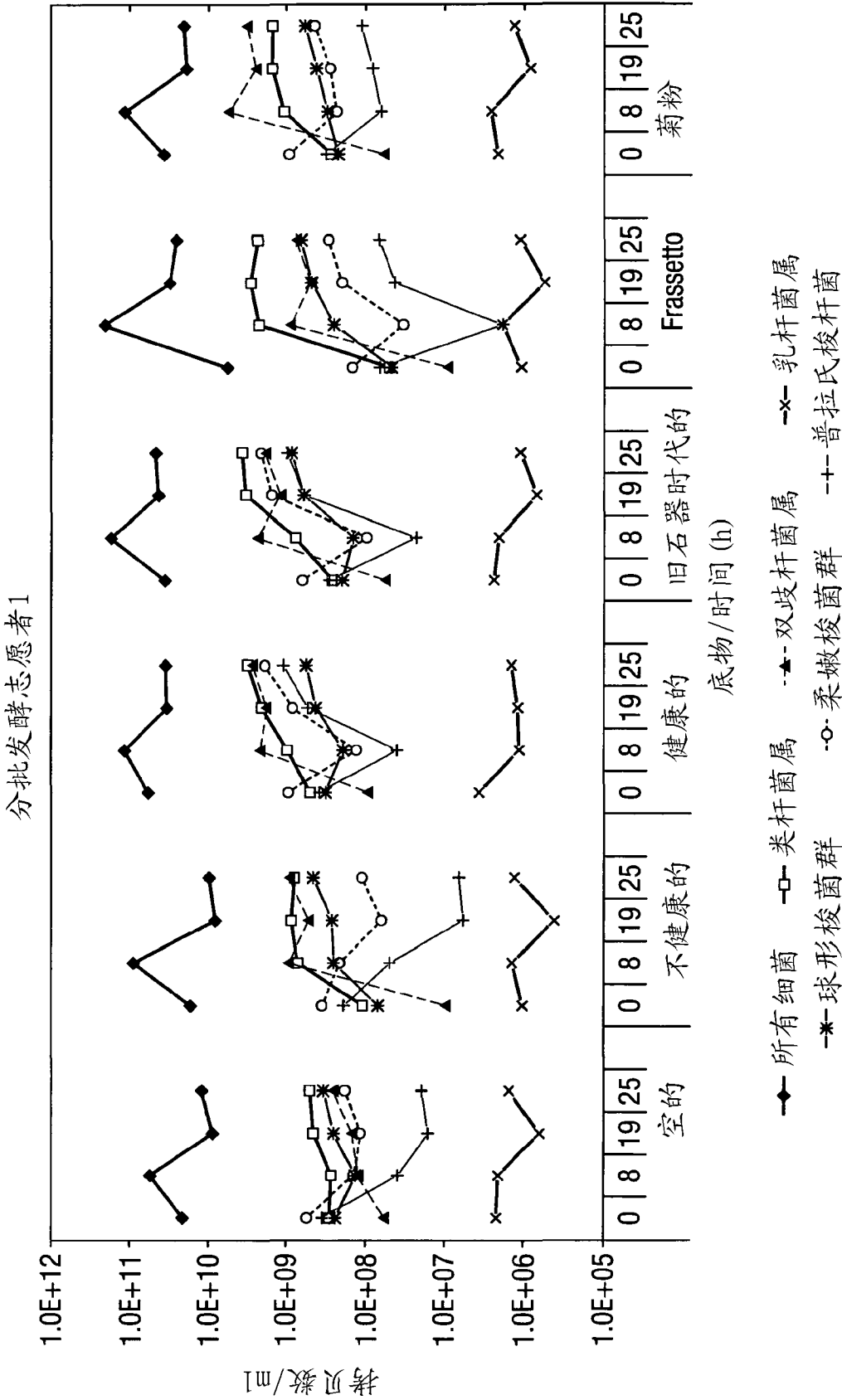


图 3a

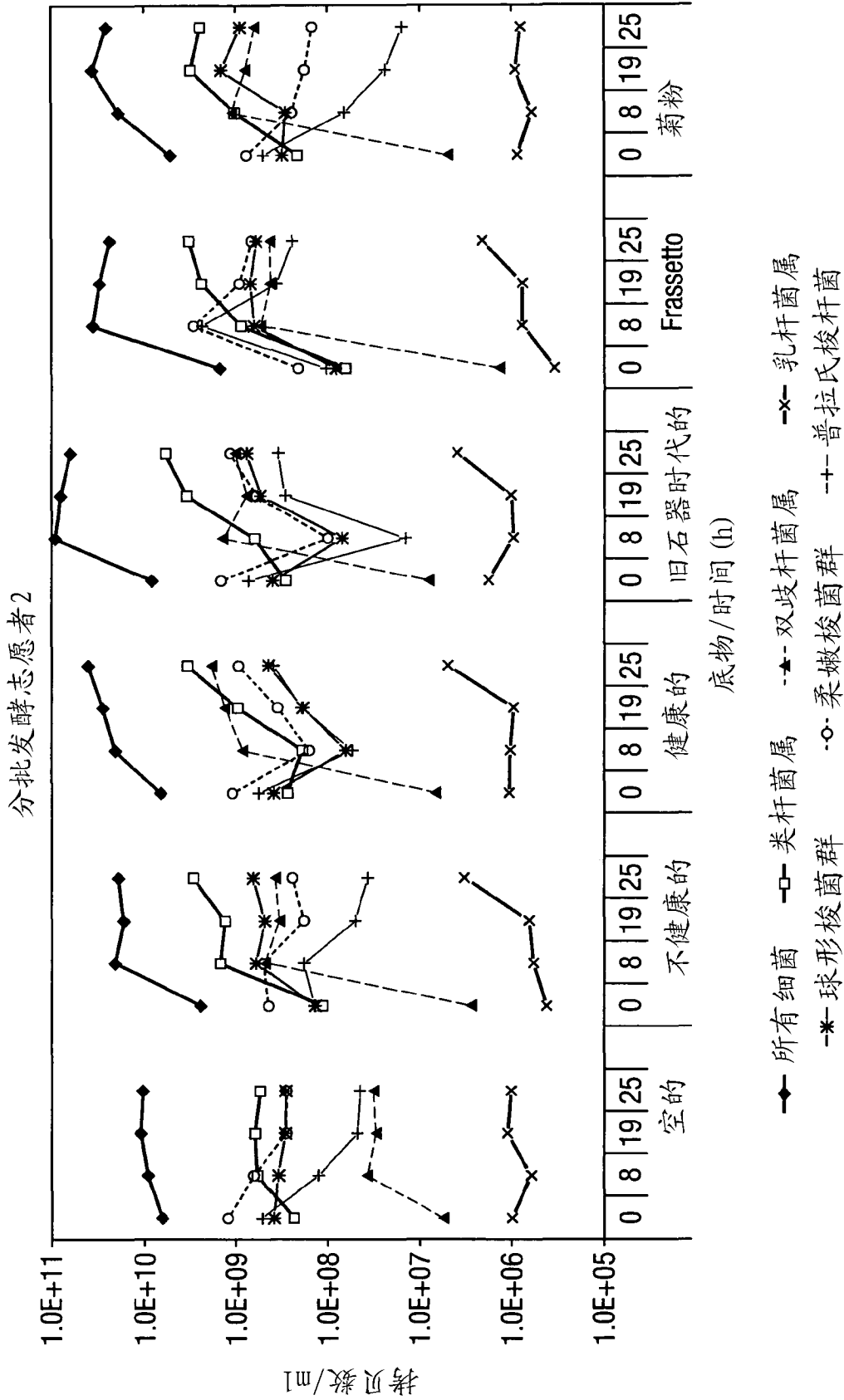


图 3b

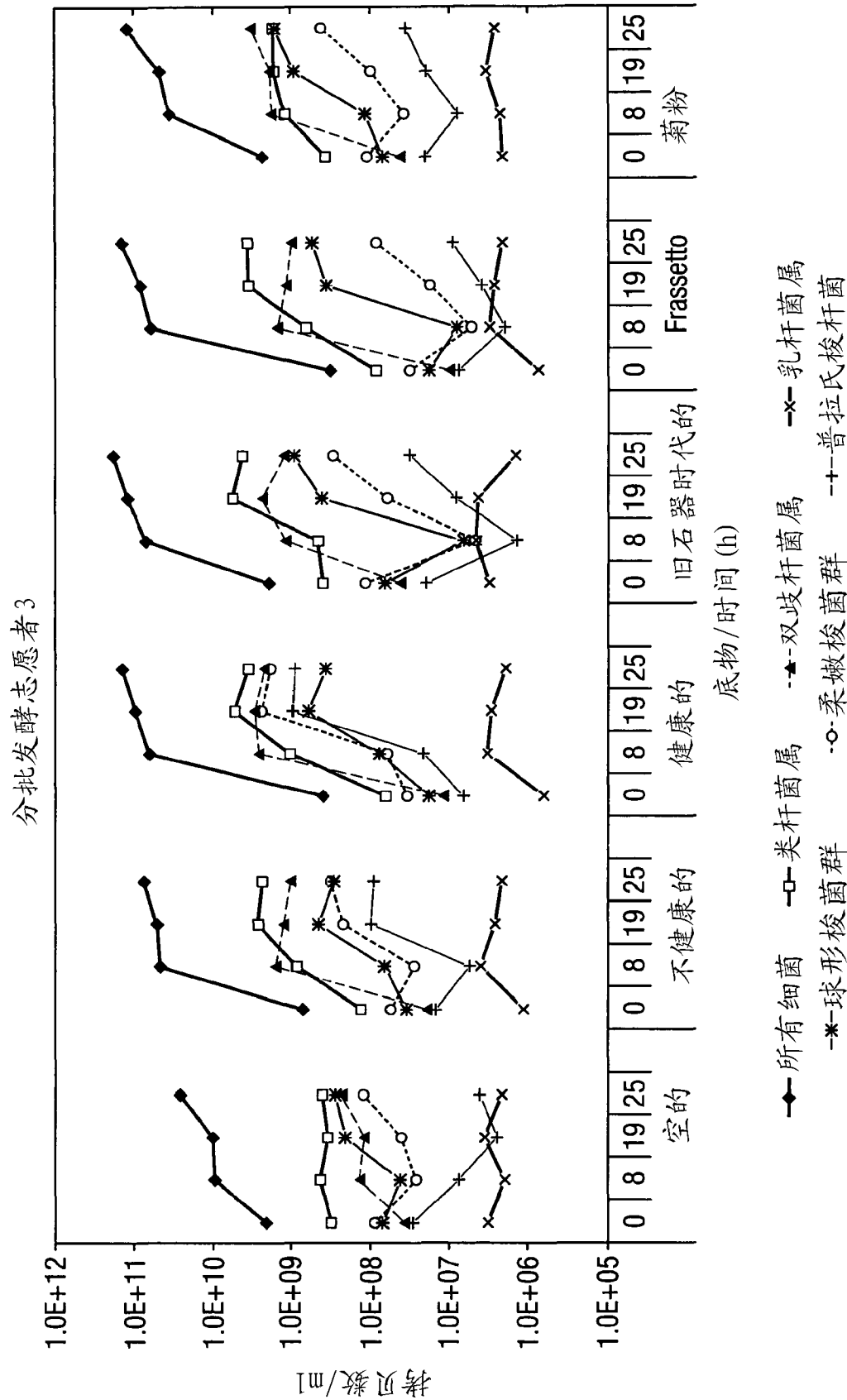


图 3c

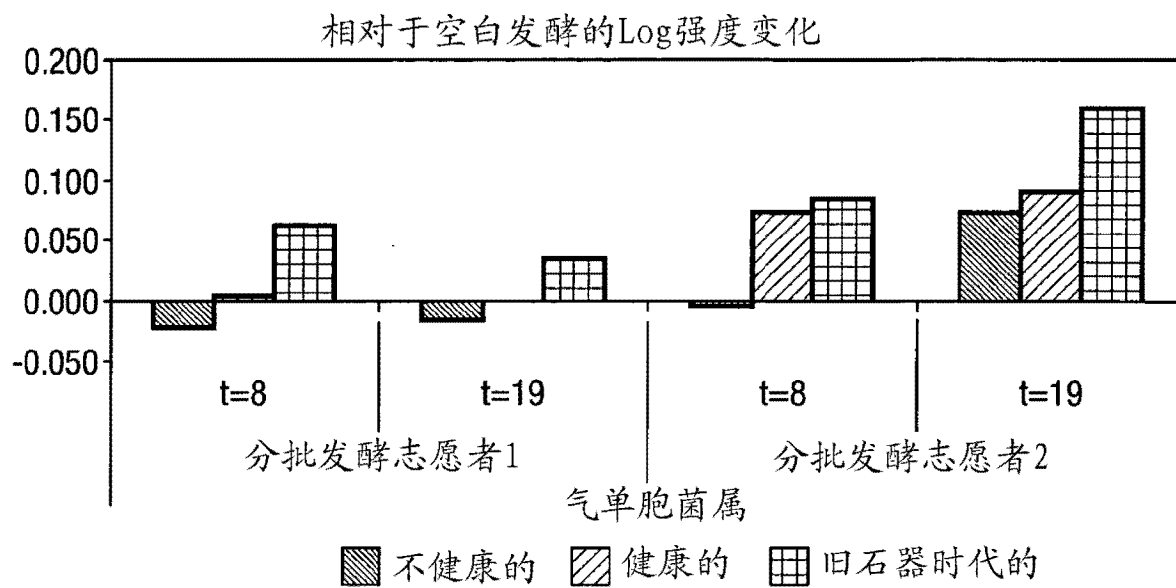


图 4a

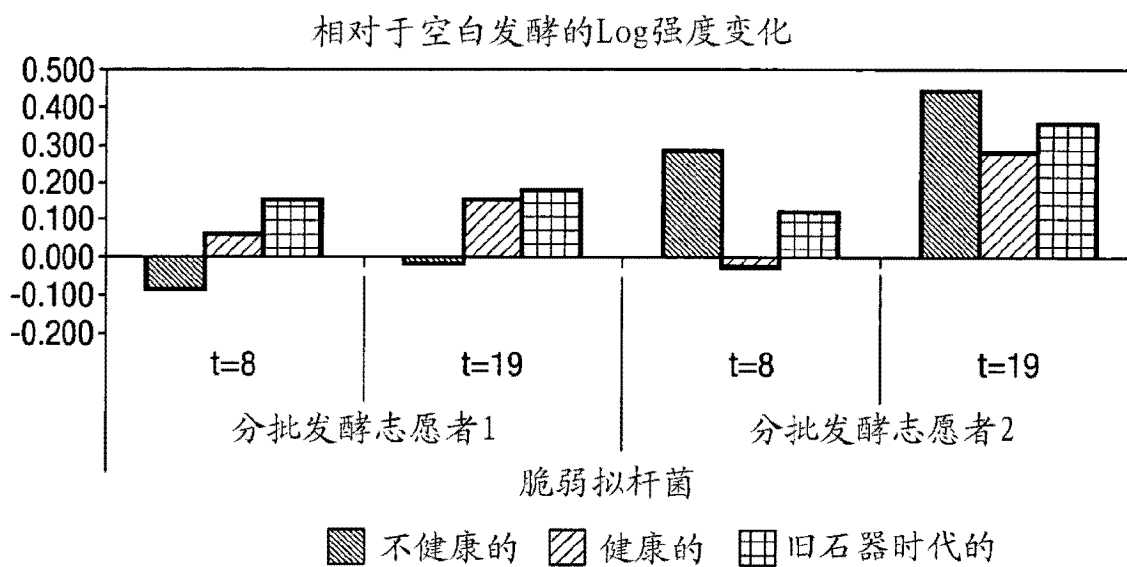


图 4b