(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1845749 B
(45)授权公告日 2010.04.28

(21)申请号 200480025481.6

(22)申请日 2004.07.02

(30)优先权数据
20033082 2003.07.04 NO

(85)PCT申请进入国家阶段日
2006.03.06

(86)PCT申请的申请数据
PCT/NO2004/000204 2004.07.02

(87)PCT申请的公布数据
WO2005/002606 EN 2005.01.13

(73)专利权人 伯格生物医药有限公司
地址 挪威博尼斯
专利权人 拜奥食品饲料有限公司

(72)发明人 R·贝格 G·克勒佩

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 郭建新

(51)Int.Cl.
A61K 35/74(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 3/06(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)

(56)对比文件
王中风等．单细胞蛋白发展状况及作为食物的前景．四川食品与发酵 2.1994,(2),14-17.
李师翁,李虎乾．植物单细胞蛋白资源－小球藻开发利用研究的现状．生物技术 7 3.1997,7(3),45-48.

审查员 刘萍

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 4 页

(54)发明名称

单细胞蛋白材料的用途

(57)摘要

本发明涉及一种单细胞蛋白材料(SCP)的用途。该SCP材料降低了血浆中胆固醇的浓度,并降低了肝中甘油三酸酯的浓度。SCP还诱导脂肪酸图谱的有利变化,并降低血浆中高半胱氨酸的浓度。本发明的一个优选实施方式涉及SCP作为抗动脉粥样硬化和心脏保护剂的用途,或者以药用或者以营养组合物,例如以功能食品给出。

CN 1845749 B

1. 从细菌中得到的单细胞蛋白材料在制备用于治疗和/或预防动物中动脉粥样硬化、冠心病、狭窄、血栓形成、心肌梗塞、中风和脂肪肝的药物或营养制品中的用途，其中所述单细胞材料是包含甲烷营养菌的微生物培养物。

2. 根据权利要求 1 的用途，其中所述甲烷营养菌是荚膜甲基球菌。

3. 根据权利要求 1 的用途，其中所述动物是人。

4. 根据权利要求 1 的用途，其中所述动物是农业动物。

5. 根据权利要求 4 的用途，其中所述动物是家禽、牛、羊或猪。

6. 根据权利要求 1 的用途，其中所述动物是家畜。

7. 根据权利要求 1 的用途，其中所述动物是宠物。

8. 根据权利要求 7 的用途，其中所述动物是狗或猫。

9. 根据权利要求 1 的用途，其中所述动物是鱼或贝壳类。

10. 根据权利要求 1 的用途，其中所述动物是鲑鱼、鳕鱼、罗非鱼、蛤类、牡蛎、龙虾或蟹类。

11. 根据权利要求 1 的用途，其中所述微生物培养物还包括一种或多种异养菌。

12. 根据权利要求 1 的用途，其中所述微生物培养物包括含有荚膜甲基球菌、Ralstonia sp.、Brevibacillus agri 和 A neurinibacillus sp. 的微生物培养物的组合。

13. 根据权利要求 2 的用途，其中荚膜甲基球菌是单细胞蛋白材料的主要或唯一组分。

14. 根据权利要求 1 的用途，其中单细胞材料是通过连续发酵生产的。

15. 根据权利要求 14 的用途，其中所述连续发酵是用以干重计 2-3％生物质操作的。

16. 根据权利要求 14 的用途，其中在发酵之后单细胞材料在工业连续离心机中经受 3,000rpm 的离心，接着使用排除尺寸为 100,000 道尔顿的膜进行超滤。

17. 根据权利要求 16 的用途，其中所述单细胞材料还在热交换器中经过灭菌步骤。

18. 根据权利要求 16 的用途，其中所述单细胞材料还经过均化步骤。

19. 根据权利要求 16 的用途，其中所述单细胞材料通过喷雾干燥进行干燥。

20. 根据权利要求 19 的用途，其中在喷雾干燥之前，所述材料在小于 20℃的温度和小于 6.5 的 pH 下保存在贮存罐中。

21. 根据权利要求 1 的用途，其中所述单细胞材料由烃部分或天然气的发酵获得。

22. 根据权利要求 1 的用途，其中所述药物或营养制品是食品级产品或添加剂。

23. 根据权利要求 22 的用途，其中所述食品级产品或添加剂是动物饲料。

24. 根据权利要求 22 的用途，其中所述食品级产品或添加剂是宠物食品。

单细胞蛋白材料的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及单细胞蛋白材料 (SCP) 的用途。该SCP材料降低血浆中胆固醇的浓度，并降低肝中的甘油三酸酯。SCP还诱导脂肪酸模式的有利变化，并降低血浆中高半胱氨酸的浓度。本发明的一个优选实施方式涉及 SCP 作为抗动脉粥样硬化和心脏保护剂的用途，或者以药物或者以功能食品给出。而且，本发明涉及该 SCP 材料作为营养组合物的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 最近，对新蛋白源的开发特别关注，它们可以加入到食品中用于人和 / 或动物消费。已提出许多不同含蛋白质的材料在人类食品中作为较传统蛋白源，例如鱼肉、大豆制品和血浆的替代品，或者作为动物饲料。这些材料包括单细胞微生物例如含有大量蛋白质的真菌、酵母和细菌。这些可以通过单细胞繁殖生长，并且已经开发出几种生物合成方法用于在烃或其它底物上通过生长单细胞微生物来制备蛋白质。现在，最广泛使用的含蛋白质的微生物 (本文也简称为“单细胞蛋白”) 是得自真菌或酵母的微生物。单细胞蛋白材料可以直接用于食品，例如作为喷雾干燥的产品。

[0004] WO01/60974 公开了一种赋予单细胞材料功能性质的方法。所述产品可以用作胶凝剂或乳化剂。

[0005] 本发明者已显示本发明的单细胞蛋白材料具有几种有益的生物学作用，并且这种材料可以用作药物或功能食品。

[0006] 我们显示，单细胞蛋白材料降低血浆胆固醇和高半胱氨酸的浓度，并且还降低肝三酰甘油的浓度。基于这些发现，预料该单细胞材料对狭窄、动脉粥样硬化、冠心病、血栓形成、心肌梗塞、中风和脂肪肝将具有预防和 / 或治疗作用。用单细胞蛋白材料治疗代表了治疗这些疾病的一种新方法。

[0007] 单细胞生物例如细菌由许多极小的细胞组成，这些细胞各自含有包封在细胞壁结构中的蛋白质。

[0008] 方便地，单细胞材料可以通过发酵法生产，其中将氧和合适的底物例如液态或气态烃、醇或碳水化合物，例如甲烷、甲醇或天然气，与营养矿物溶液一起加入到含有微生物的管状反应器中。大量的这类方法在本领域为公知并且描述过。

[0009] 用于本发明特别优选的是由对烃部分或者天然气发酵获得的单细胞蛋白材料。尤其优选的是由天然气发酵获得的单细胞蛋白。随着发酵罐内微生物的浓度增加，将一部分反应器内容物或肉汤抽出并且可以通过本领域公知的技术，例如离心和 / 或超滤分离微生物。方便地，在这种发酵方法中，将从发酵罐中连续取出肉汤并且它将具有 1-5％重量，例如约 3％重量的细胞浓度。

[0010] 根据本发明可以使用由两种或更多种微生物生产的单细胞材料。尽管这些可以在相同或者分开的发酵罐中生产，但是通常这些将在相同发酵罐中于相同发酵条件下生产。由单独的发酵过程生产的材料可以混合在一起然后均化。

[0011] 用于本发明优选的细菌包括荚膜甲基球菌 (Methylococcuscapsulatus)(Bath)，是最初从 Bath，England 的温泉中分离的一种嗜热菌，可从 Norferm Danmark AS，Odense，

Denmark 获得。荚膜甲基球菌 (Bath) 在约 45℃下生长最好，尽管在 37℃ -52℃之间也可以生长。它是革兰氏阴性的、非运动性球形细胞，通常成对出现。胞内膜以 I 型甲烷营养菌的泡状复盘特性的束排列。荚膜甲基球菌 (Bath) 在遗传上是非常稳定的生物，没有已知的质粒。它可以利用甲烷或甲醇生长并利用氨、硝酸盐或分子氮作为蛋白质合成的氮源。

[0012] 适用于本发明的其它细菌包括异养菌 Alcaligenes acidovoransDB3、坚硬芽孢杆菌 (Bacillus firmus)DB5 和短芽孢杆菌 (Bacillusbrevis)DB4，它们各自在约 45℃的温度下生长最好。这些菌株可以从 Norferm Danmark AS，Odense，Denmark 获得。

[0013] A.acidovorans DB3 是一种革兰氏阴性的、需氧的、运动杆菌，属于假单胞菌科，它可以使用乙醇、乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐用于生长。短芽孢杆菌 DB4 是一种革兰氏阴性的、形成内生孢子的、需氧杆菌，属于芽孢杆菌属，它可以利用乙酸盐、D- 果糖、D- 甘露糖、核糖和 D- 塔格糖。坚硬芽孢杆菌 DB5 是一种革兰氏阴性的、形成内生孢子的、运动性、芽孢杆菌属的需氧杆菌，它可以利用乙酸盐、N- 乙酰基 - 葡糖胺、柠檬酸盐、葡糖酸盐、D- 葡萄糖、甘油和甘露醇。

[0014] 适用于本发明的方法的酵母可以选自酵母属 (Saccharomyces) 和念珠菌属 (Candida)。使用天然气作为唯一碳和能源的发酵方法的一个实例是描述在 EP-A-306466(Dansk Bioprotein) 中的方法。该方法基于在甲烷上生长的甲烷营养菌荚膜甲基球菌的连续发酵。使用空气或纯氧气氧合并使用氨作为氮源。除了这些底物之外，细菌培养物典型地将还需要水、磷酸盐（例如以磷酸的形式）和几种矿物质，它可以包括镁、钙、钾、铁、铜、锌、锰、镍、钴和钼，通常以硫酸盐、氯化物或硝酸盐的形式使用。所有在用于制备单细胞材料的矿物质应属于食品级质量。

[0015] 天然气主要由甲烷组成，尽管其组成将随不同的气田而变化。通常，可以预料到天然气含有约 90％甲烷、约 5％乙烷、约 2％丙烷和一些高级烃。在天然气的发酵过程中，甲烷被甲烷营养菌氧化成生物质和二氧化碳。甲醇、甲醛和甲酸是代谢中间体。甲醛以及一定程度的二氧化碳被同化成生物质。然而，甲烷营养菌不能使用包括碳 - 碳键的底物用于生长，并且天然气的剩余组分，即乙烷、丙烷和一定程度的高级烃，被甲烷营养菌氧化产生相应的羧酸（例如乙烷被氧化成乙酸）。这些产物会抑制甲烷营养菌，因此在制备生物质期间它们的浓度保持低，优选低于 50mg/l 是重要的。解决这一问题的一个方案是组合使用一种或多种异养菌，它们能够利用甲烷营养菌产生的代谢物。

[0016] 这样的细菌也能够利用经细胞溶解释放到发酵肉汤中的有机材料。为了避免形成泡沫这是重要的，并且也用于使被不希望的细菌污染的培养的危险性最小化。甲烷营养菌和异养菌的组合获得稳定且高产率的培养。

[0017] 在制备单细胞材料过程中，通常将发酵混合物的 pH 调整至约 6-7，例如调整至 6.5±0.3。本领域技术人员可以容易地选择调节 pH 的合适的酸 / 碱。在这一点上特别适用的是氢氧化钠和硫酸。发酵期间发酵罐内的温度应优选保持在 40℃ -50℃的范围内，最优选 45℃ ±2℃。

[0018] 特别优选用于本发明的是包括如下细菌的组合的微生物培养物：甲烷营养菌荚膜甲基球菌 (Bath)、和异养菌 Alcaligenes acidovoransDB3 和坚硬芽孢杆菌 DB5，任选组合有短芽孢杆菌 DB4（所有菌株都可以从 Norferm Danmark AS，Odense，Denmark 获得）。A.acidovorans DB3 的作用是利用由荚膜甲基球菌 (Bath) 从天然气中的乙烷和丙烷产生

的乙酸盐和丙酸盐。A. acidovorans DB3可以占所得生物质的总细胞数的至多10%，例如约6-8%。短芽孢杆菌DB4和坚硬芽孢杆菌DB5的作用是利用培养基中的溶解产物和代谢物。通常，在连续培养期间短芽孢杆菌DB4和坚硬芽孢杆菌DB5将各自占细胞数的不到1%。

[0019] 用于制备单细胞材料的合适发酵罐为环状发酵罐，例如DanskBioprotein的DK 1404/92、EP-A-418187和EP-A-306466中所述的发酵罐，或者气升式反应器。优选的反应器描述在申请人的PCT申请WO 03/016460中，将其加入本文作为参考。具有静态混合器的环状发酵罐由于发酵罐的活塞式流动特性而能够高度利用气体（例如至多95%）。沿环在几个位置引入气体并且保持与液体接触直到在环末端将它们分离到头部空间中。可以使用2-3%生物质（以干重为基础）和0.02-0.50h^{-1}，例如0.05-0.25h^{-1}的稀释速率实现连续发酵。

[0020] 可以使用其它发酵罐制备单细胞材料，它们包括管状发酵罐和搅拌槽发酵罐。

[0021] 理想地，通过发酵天然气制得的生物质或单细胞材料，将包括60-80%重量粗蛋白；5-20%重量粗脂肪；3-10%重量灰分；3-15%重量核酸（RNA和DNA）；10-30g/kg磷；至多350mg/kg铁；和至多120mg/kg铜。特别优选，生物质将包括68-73%，例如约70%重量粗蛋白；9-11%，例如约10%重量粗脂肪；5-10%，例如约7%重量灰分；8-12%，例如约10%重量核酸（RNA和DNA）；10-25g/kg磷；至多310mg/kg铁；和至多110mg/kg铜。优选，蛋白质内容物中氨基酸图谱应在营养上有利地具有高比例的较重要的氨基酸半胱氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、赖氨酸、色氨酸和精氨酸。通常它们分别可以约0.7%、3.1%、5.2%、7.2%、2.5%和6.9%的量存在（以氨基酸的总量的百分数表示）。通常脂肪酸主要包括饱和棕榈酸（约50%）和单不饱和的棕榈油酸（约36%）。产物中矿物质含量通常将包括大量的磷（约1.5%重量）、钾（约0.8%重量）和镁（约0.2%重量）。

[0022] 通常，由连续发酵法获得的单细胞蛋白材料将经过离心和过滤，例如超滤，除去存在的大多数水并形成含水糊剂或浆的过程。离心期间生物质的干物质含量通常从约2%重量增加至约15%重量，例如增加至约12%重量。超滤，可以在40-50℃，例如42-46℃之间的温度下进行，将生物质进一步浓缩至含有10-30%，优选15-25%，例如15-22%重量单细胞材料的产物。超滤期间使用的尺寸排除通常在约100,000道尔顿的范围内。

[0023] 超滤之后可以将生物质冷却，优选冷却至10-30℃，例如至约15℃的温度，例如将浓缩蛋白浆从超滤装置通过热交换器，之后将其保持在缓冲罐中于恒温下，例如在10-20℃，更优选5-15℃的温度下并在5.5-6.5的范围内的pH下持续1-24小时，优选5-15小时，例如5-12小时。任选，可以将单细胞蛋白材料灭菌。

[0024] 另外，可以任选将单细胞材料均化以便将细胞壁结构破碎。该均化可以任意常规方式进行，但是可以在常规高压均化机中进行，其中细胞可以通过首先加压，例如直到150MPa(1500bar)的压力，然后将均化机内部减压而破碎。优选，施加到生物质的总压降将在40MPa-120MPa(400-1200bar)的范围内，例如约80MPa(800bar)。压降可以分步，即它可以包括一个或多个步骤，尽管通常它将包括一个或两个步骤，优选单一步骤。在以两步法进行均化的情况下优选第二步的压降应低于均化机中总压降的1/5，优选低于1/10，例如约1/20。均化期间材料的温度应优选不超过50℃。均化步骤详细描述在申请人的PCT申请WO 01/60974，将其加入本文作为参考。

[0025] 本文所述的均化步骤能够制备包含，优选基本上由粉碎的细胞材料组成的产物。

例如，破碎的细胞材料将以至少 80％，优选至少 90％重量的量存在。典型地，产物将是含有可溶性和微粒细胞组分的相对粘的浆液。尽管它可以直接用作食品的添加剂或者作为药品，然而经常将其进一步加工以从产物中除去过量水。任何其它干燥步骤的选择将取决于均化之后产物的水含量和最终产物的所需水分含量。

[0026] 典型地，产物将进一步根据本领域公知的喷雾干燥技术加工。可以使用任意有或者没有流化床装置的常规喷雾干燥器，例如 3-SPD 型喷雾干燥器，可从 APV Anhydro，Denmark 获得。优选喷雾干燥器的空气的入口温度可以是约 300℃，出口温度可以是约 90℃。优选最终产物将具有约 2-10％重量，例如 6-8％重量的水含量。所得产物通常将具有 0.1-0.5mm 的粒径。

[0027] 特别优选，均质步骤之后即刻进行喷雾干燥。或者，可能必需，或者真正需要，将均化产物贮藏或者保存在，例如贮藏或缓冲罐中，然后进一步加工。在这样的情况下，已发现产物的贮藏条件可以减少喷雾干燥之后最终产物的胶凝性能。均化材料的胶凝性能可以通过将其贮藏在低于 20℃和 pH ＜ 7，优选＜ 6.5，特别优选 pH 在 5.5-6.5，例如 5.8-6.5 的范围内来保持。在这些条件下，产物可以贮藏直到 24 小时，胶凝性能没有任何实质损失。

[0028] 我们已发现，单细胞材料具有几个有益的生物学作用，例如降低血浆和肝中胆固醇的浓度的能力。该材料还增加线粒体 β－氧化。因此本发明的单细胞材料可以用作药物组合物。

[0029] 而且，单细胞材料特别适用于作为食品中的功能组分，特别是当用作动物饲料和宠物食品中的天然血浆的代用品时。当用于宠物食品时，可以将其它成分例如脂肪、糖、盐、调味剂、矿物质等加入到该产物中。然后将产物成型为在外观和质地上类似天然肉块的大块。本发明的产品还具有它易于配制成含有必需营养素，易于被动物消化并且对动物可口的优点。

[0030] 发明详述

[0031] 本发明涉及一种单细胞蛋白材料，它用于制备治疗和／或预防动脉粥样硬化、冠心病、狭窄、血栓形成、心肌梗塞、中风和脂肪肝的药物或营养制品。

[0032] 试验数据清楚地显示，本发明的 SCP 材料降低血浆中高半胱氨酸的浓度。高半胱氨酸是疾病例如动脉粥样硬化、冠心病、狭窄、血栓形成、心肌梗塞和中风的危险因素，并且因此预测本发明的 SCP 材料将有效地预防和治疗这些疾病。

[0033] 数据还显示，通过给药 SCP 使得肝中三酰甘油的水平降低，并且预测该 SCP 材料可用于治疗和预防脂肪肝。

[0034] 本发明的另一实施方式涉及一种单细胞蛋白材料，它用于制备治疗和／或预防高胆固醇血症的药物或营养组合物，这是由于我们已显示所述材料能够降低胆固醇的血浆浓度。

[0035] 再一实施方式涉及单细胞蛋白材料在制备用于降低血浆中高半胱氨酸浓度的药物或营养组合物中的用途。在表现出上述疾病之前可以建立高水平的高半胱氨酸。给药该 SCP 材料具有一般的高半胱氨酸降低效果，并且本发明的材料因此特别适于预防上述疾病的发生，并降低这些疾病的危险性。

[0036] 结果还显示 SCP 材料具有一般的心脏和动脉保护特性，并且我们预测可以给予该材料以降低与动脉和心脏有关的疾病的危险性。

[0037] 本发明的目的在于将该材料以预防药或药用药物、或者以功能饲料或食品材料给药；该料可以给药到人和非人动物。

[0038] 本发明的一个优选实施方式涉及一种包括该单细胞蛋白材料的饲料材料。该材料例如可用于喂养农业动物，例如家禽 (gallinaceousbirds)，牛、羊、山羊或猪哺乳动物，家畜或宠物，例如狗或猫，和鱼或贝壳类，例如鲑鱼、鳕鱼、罗非鱼、蛤类、牡蛎、龙虾或蟹类。

[0039] 本发明的一个优选实施方式使用通过发酵包括甲烷营养菌的微生物培养物制得的 SCP 材料。一个更优选的实施方式还包括一种或多种异养菌。一种优选实施方式使用甲烷营养菌荚膜甲基球菌 (Bath)、和异养菌 Alcaligenes acidovorans DB3 和坚硬芽孢杆菌 DB5 的组合，任选混合有短芽孢杆菌 DB4（所有菌株都得自 Norferm Danmark AS，Odense，Denmark）。

[0040] 附图简述

[0041] 图 1 显示了单细胞材料 (SCP) 降低血浆中胆固醇的浓度。

[0042] 图 2 显示了单细胞材料 (SCP) 降低肝中三酰甘油的浓度。

[0043] 图 3 显示了 SCP 材料抑制 ACAT 酶。

[0044] 图 4 显示了单细胞材料增加线粒体 β－氧化。

[0045] 本申请所用的定义

[0046] 动物

[0047] 在本文中术语“动物”包括人和农场（农业）动物，特别是经济上重要的动物，例如牛、羊、山羊和猪哺乳动物，特别是产生适合人食用的产品，例如肉、蛋和乳的那些。而且，该术语打算包括鱼和贝壳类，例如鲑鱼、鳕鱼、罗非鱼、蛤类和牡蛎。该术语还包括家畜例如狗和猫。

[0048] 治疗

[0049] 与本发明的药物应用有关，术语“治疗”是指降低疾病的严重度。

[0050] 预防

[0051] 术语“预防”是指预防给定的疾病，即在发生所述病况之前给药本发明的化合物。这意味着本发明的化合物可用作预防剂或者作为功能食品或饲料中的组分以便预防给定疾病的危险或发生。

[0052] 单细胞蛋白材料 (SCM) 是一种包括单细胞微生物的材料。该微生物尤其可以是真菌、酵母和细菌。该 SCP 材料优选含有高比例的蛋白质。

[0053] 本发明的化合物的给药

[0054] 优选，本发明的材料经口施用，尽管可以使用任意已知类型的给药途径或方案。就口服药物组合物而言，可以使用如下载体材料：例如水、明胶、树胶、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、滑石粉、油、聚链烯二醇、凡士林等。这种药物制剂可以为单位剂量形式，并且可以另外含有其它有治疗价值的物质或常规药物佐剂例如防腐剂、稳定剂、乳化剂、缓冲剂等。这些药物制剂可以为常规液体形式例如片剂、胶囊、糖锭剂、安瓿剂等，以常规剂量形式例如干安瓿剂和栓剂等。

[0055] 此外，本发明的化合物适宜地与用于抗击或预防特定疾病的其它治疗组合给药。

[0056] 参照以下实施例可以更充分地理解本发明。然而，它们不应解释为对本发明范围的限制。

[0057] 作为营养组合物，可以将该单细胞材料以任何常规方式配制成饲料或食品。

[0058] 试验部分

[0059] 下面非限制性实施例用于进一步描述本发明。

[0060] 化学物质

[0061] [1-^{14}C] 棕榈酰 -L- 肉碱 (54Ci/mmol) 购自 Amersham。用于实时 RT-PCR 的化学物质得自 Applied Biosystems。所有其它化学物质从普通商业源获得并且属于试剂级。

[0062] 单细胞蛋白 (SCP) 材料

[0063] 用于试验的 SCP 材料如实施例 1 所示制得。

[0064] 动物和处理

[0065] 4-5 周龄雄性肥胖 Zucker 大鼠 (Crl :(ZUC)/faBR) 得自 CharlesRiver，Germany，试验开始时平均 120±3g，以 12 小时亮 - 暗循环保持在室内，温度为 20±3℃，相对湿度为 65±15%。到达的第二天将大鼠随机化、单独放置在代谢笼中并分成三个实验组，每一组 6 只动物。使大鼠适应试验条件和试验膳食持续 4 天，之后收集 7 天粪便。半纯化膳食（表 1），含有 SCP 或酪蛋白（对照）形式的 20% 粗蛋白 (Nx 6,25)。

[0066] 表 1

[0067] 试验膳食的组成

[0068]

g/kg 膳食	SCP	酪蛋白
蛋白质	270	217,6
大豆油 [1]	100	100
蔗糖	110	110
维生素 [2]	10	10
矿物质 [3]	30	30
纤维素	20	20
NaCl	-	21,8
糊精	496,1	490,6

[0069] [1] 大豆油的脂肪酸组成 (g/100g 脂肪）：18:2n-6(54.1±0.5)、18:1n-9(21.8±0.2)、16:0(11.2±0.1)、18:3n-3(6.1±0.2)、18:0(3.7±0.1)、18:1n-7(1.5±0.1)、20:0(0.5±0.1)、22:0(0.5±0.1)。

[0070] [2] 维生素 (mg/kg 膳食）：8mg 维生素 A(4000I.U.)、2mg 维生素 D3(1000I.U.)、60mg 维生素 E(30I.U.)、0.1mg 维生素 K(0.05I.U.)、1000mg 酒石酸氢胆碱、4mg 硫胺素、3mg 核黄素、6mg 维生素 B6、20mg 烟酸、8mg 泛酸钙、1mg folin、5mg 维生素 B12(0.05I.U.)。

[0071] [3] 矿物质 (g/kg 膳食）：8.5g $CaCO_3$、6.2g $CaHPO_4x2H_2O$、12.3gKH_2PO_4、1.4g $MgCO_3$、

0.4$NaCO_3$、0.8g NaCl、0.02g $CuSO_4x5H_2O$、0.002g NaF、0.0002g KI、0.2g $FeSO_4xH_2O$、0.05g $ZnSO_4xH_2O$。

[0072] 动物每天给予等量的饲料，进行调整满足生长动物的需要。动物自由接触自来水。适应之后大鼠喂养 22 或 23 天（在第 22 天将每组中 3 只大鼠杀死并在第 23 天杀死余下的大鼠），每周测定体重。喂养结束时，动物用 1 ： 1 **Hypnorm®/Dormicum®**（芬太尼 / 氟阿尼酮 - 咪达唑仑）经皮下麻醉、0.2mL/100g 体重，进行心脏穿刺收集血样（在肝素中），并将肝切开。将一部分肝立即在液 N_2 中冷冻，而剩余肝在冰上冷却匀化。该方案得到挪威国家活动物生物试验委员会的批准。

[0073] 亚细胞部分的制备

[0074] 将得自大鼠的肝单独在冰冷蔗糖溶液 (0.25mol/L 蔗糖于 10mmol/L HEPES 缓冲液 pH 7.4 和 1mmol/L EDTA 中）中使用 Potter-Elvehjem 均化机均化。如 Berge，R.K. 等人 (Berge,R.K.,Flatmark,T.& Osmundsen,H.(1984),Enhancement of long-chainacyl-CoA hydrolase activity in peroxisomes and mitochondria of ratliver by peroxisomal proliferators.Eur J Biochem 141:637-644) 中所述，将这些亚细胞部分分离。简言之，匀浆在 1000xg 下离心 10 分钟以从核部分分离出后核部分。在 10000xg 下持续 10 分钟由该后核部分制备富含线粒体的部分。通过在 23500xg 下离心该后线粒体部分 30 分钟，制备富含过氧化物酶体的部分。由该后过氧化物酶体部分在 100000xg 下持续 75 分钟分离富含微粒体的部分。收集剩余上清液作为胞质部分。该步骤在 0-4℃下进行，并且将这些部分贮存在 -80℃。使用 BioRad 蛋白质测定试剂盒 (BioRad,Heraules,CA) 和牛血清白蛋白作为标准物测定蛋白质。

[0075] 酶测定

[0076] 基本上如 Bremer(Bremer,J.(1981),The effect of fasting on theactivity of liver carnitine palmitoyltransferase and its inhibition bymalonyl-CoA.Biochim Biophys Acta 665:628-631) 所述测定肉碱棕榈酰基转移酶 I(CPT-I) 活性。CPT-I 的试验含有 20mmol/L HEPES pH7.5、70mmol/L KCl、5mmol/L KCN、100μmol/L 棕榈酰基 -CoA、10mg BSA/mL 和 0.6mg 组织蛋白 /mL。反应用 200μmol/L[甲基 -^{14}C]L- 肉碱 (200cpm/nmol) 开始。CPT-II 的测定条件相同，只是省去 BSA 而含有 0.01% Triton X-100。组织蛋白浓度是 2.5μg/mL。使用 130mg 蛋白质和 ^{14}C- 油酰基 -CoA 作为底物测定酰基 - 辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 (ACAT)。产物在 TLC 板上使用己烷：二乙醚：乙酸 (80 ： 20 ： 1) 作为流动相进行分离，并在闪烁计数器 (Win Spectral 1414 液体闪烁计数器，Wallac) 中计数。使用 80mg 蛋白质和 ^{14}C-HMG-CoA 作为底物测定 3- 羟基 -3- 甲基戊二酰基 (HMG)-CoA 还原酶。产物在 TLC 板上使用丙酮：苯 (1 ： 1) 作为流动相进行分离，并在闪烁计数器中计数。如 Roncari(Roncari,D.A.(1981)Fatty acid synthase from human liver. MethodsEnzymol 71Pt C:73-79) 所述测定脂肪酸合酶，根据 Skorve 等人 .(Skorve,J.,al-Shurbaji,A.,Asiedu,D.,Bjorkhem,I.,Berglund,L.&Berge,R.K.(1993)On the mechanism of the hypolipidemic effect ofsulfur-substituted hexadecanedioic acid(3-thiadicarboxylic acid)innormolipidemic rats.J Lipid Res 34:1177-1185) 进行改进，并通过测定结合到丙二酸单酰 -CoA 的 $NaH^{14}CO_3$ 的量来确定乙酰基 -CoA 羧化酶。

[0077] 脂质分析

[0078] 在 Tecnicon Axon 系统 (Miles, Tarrytown, NY) 中,用 Bayer 甘油三酸酯和胆固醇酶促试剂盒 (Bayer, Terrytown, NY) 和 PAP 150 磷脂酶促试剂盒 (bioMerieux, Lyon, France) 测定整个肝和肝素化血浆中的脂质。首先按照 Bligh and Dyer(Bligh, E.G.& Dyer, W.J.(1959)Arapid method of total lipid extraction and purification.CanJ BiochemPhysiol 37 :911-91) 提取肝脂质。

[0079] 粪甾醇

[0080] 按照 Suckling 等人 (Suckling, K.E., Benson, G.M., Bond, B., Gee, A., Glen, A., Haynes, C.& Jackson, B.(1991), Cholesterol loweringand bile acid excretion in the hamster with cholestyramine treatment.Atherosclerosis 89 :183-190), 作一些改进制备粪便总胆汁酸。将 2mL 在乙醇中的 NaBH(mg/mL) 加入到 0.1g 粉状于粪便中。在室温下使该混合物反应 1 小时,之后加入 50μl 的 2mol/L HCl 以除去任意过量的 NaBH。用正己烷从样品中萃取中性甾醇 (两次连续洗涤), 之后样品用 200μl 10mol/L NaOH 在 110℃下水解过夜。将 240μl 该水解物与 2.8mL 水一起供应到 Bond Elut C^{18} 柱 (Varian, 200mg, 3mL), 它预先用 3mL 甲醇和 3mL 水活化。胆汁酸保留在柱内,用 3mL 的 20%水中的甲醇洗涤两次,之后胆汁酸用 3mL 甲醇洗脱。胆汁酸在 45℃下风干并溶解在 1mL 异丙醇中。使用总胆汁酸诊断试剂盒 (Sigma 450A) 在 Tecnicon Axon 系统上酶促测定总胆汁酸。

[0081] 氨基酸

[0082] 在 6M HCl 中于 110±2℃下水解 22 小时并用异硫氰酸苯酯按照 Cohen 和 Strydom 的方法 (34) 预衍生化之后测定膳食中的氨基酸。用 9 : 1 过甲酸 (89%) : H_2O_2(30%) (v/v) 将半胱氨酸和胱氨酸氧化获得半胱磺酸之后测定饲料中的总半胱氨酸。然后将样品在 6M HCl 中于 110±2℃下水解 22 小时,再如上述的氨基酸分析进行处理。在配备有锂柱的 Biochrom 20 加上氨基酸分析仪 (Amersham PharmaciaBiotech、Sweden) 中,用如上所述 (24) 后柱水合茚三酮衍生法测定肝和血浆中的氨基酸。分析之前,肝样品通过添加 2 体积的 5%磺基水杨酸,在冰上保持 30 分钟并在 5000xg 下离心 15 分钟进行萃取和去蛋白。上清液以 4 : 1(v/v) 与内标 (2.5mmol/L 正亮氨酸在 0.1mol/L HCl 中) 混合。血浆样品以 1 : 1 与内标 (1mmol/L 正亮氨酸在 0.1mol/L HCl 中) 混合,在 10000xg 下离心 5 分钟,之后在过滤管 (切割 10kDa,Biomax PB 聚醚砜膜,Millipore Corp.,USA) 中在 10000xg 下将上清液离心 30 分钟。

[0083] 脂肪酸组成

[0084] 从样品中用 2 : 1 氯仿 : 甲醇 (v/v)(35) 萃取脂肪酸。样品经过滤、皂化和在 12% BF_3 的甲醇 (v/v) 中酯化。使用 Lie 和 Lambertsen 所述的方法 (Lie, O.& Lambertsen, G.(1991)Fatty acid composition ofglycerophospholipids in seven tissues of cod(Gadus morhua), determined by combined high-performance liquid chromatographyand gas chromatography.J Chromatogr 565 :119-129) 分析肝和血浆中的总脂质的脂肪酸组成。使用配备有 50m CP-sil 88(Chrompack,Middelburg,荷兰) 融合硅石毛细管柱 (内径 0.32mm) 的 Carlo Erba 气相色谱仪 (′ 柱上冷′ 注射,69℃持续 20 秒,以 25℃ min^{-1} 升高至 160℃并在 160℃下保持 28 分钟,以 25℃ min^{-1} 升高至 190℃并在 190℃保持 17 分钟,以 25℃ min^{-1} 升高至 220℃并在 220℃下保持 9 分钟) 分离脂肪酸甲酯。使用标准甲酯混合物 (Nu-Chek-Prep,Elyian,MN,USA) 通过保留时间鉴定脂肪酸。使用连

接到GLC的积分仪(TurbochromNavigator,Version 4.0)计算脂肪酸组成(重量百分数)。

[0085] 使用氯仿和甲醇的混合物从血浆富含三酰甘油的脂蛋白部分萃取脂质,并通过薄层色谱法在硅胶板(0.25mm硅胶60,Merck)上分离,在己烷-二乙醚-乙酸(80 ： 20 ： 1,v/v/v)中展开并使用若丹明6G(0.05％在甲醇中,Sigma)和紫外光显影。刮掉斑点并转移到含二十一烷酸(21 ： 0)作为内标的管中。向样品中加入BF_3-甲醇转酯化。为了除去中性甾醇和不能皂化的物质,将脂肪酰基甲酯的萃取物在0.5mol/L KOH的乙醇-水溶液(9 ： 1)中加热,然后将回收的脂肪酸用BF_3-甲醇再酯化。在GC8000Top气相色谱仪(Carlo Erba Instrument)上分析这些甲酯,该色谱仪配备有火焰电离检测器(FID)、程序控制温度的蒸发注射器、AS 800自动采样器(Carlo Erba Instrument)和含有高极性SP 2340相并且膜厚0.20pm(Supelco)的毛细管柱(60m x 0.25mm)。初始温度是130℃,以1.4℃/min升温至最终温度214℃。注射器温度是235℃。检测器温度是235℃,使用氢气(25mL/min)、空气(350mL/min)和氮气作为补充载气(30mL/min)。使用氢气作为载气(1.6mL/min)使样品以恒定流量运行样品。分流比是20 ： 1。通过与已知标准物(LarodanFine Chemicals,Malmo,Sweden)比较阳性鉴定这些甲酯并通过质谱法核实。用基于二十一烷酸作为内标的Chrom-Card A/D1.0色谱仪站(Carlo Erba Instruments)进行脂肪酸的定量。

[0086] 酰基-CoA-酯

[0087] 通过反相高效液相色谱法测定肝中酰基-CoA酯。将100mg冻肝在冰冷1.4mol/L $HClO_4$和2mmol/L D-二硫苏糖醇中均化获得10％(w/v)匀浆,并在12000xg下离心1分钟。将122μl冰冷3mol/L K_2CO_3和0,5mol/L三乙醇胺加入到500μl上清液中。在冰上10分钟之后,溶液在12000xg、4℃下离心1分钟。将40μl上清液注入到高效液相色谱柱中,并按照Demoz等人(39)测定酰基-CoA酯,具有如下改进:将洗脱缓冲液A调整至pH 5.00,梯度洗脱特征如下:0分钟,83.5％A;10分钟,55％A;17分钟,10％A,并且流速是1.0mL/min。

[0088] 实时定量RT-PCR

[0089] 使用Trizol(Gibco BRL)将所有RNA纯化,并在总体积100μl中使用逆转录酶试剂盒(Applied Biosystems)将1μg总RNA逆转录。将其中省去RNA的反应用作阴性对照,并且将其中稀释RNA的反应用作标准曲线。

[0090] 使用Primer Express(Applied Biosystems)设计Δ^9、Δ^6和Δ^5去饱和酶、过氧化物酶体增殖子-活化的受体(PPAR)α和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的引物和Taqman探针。使用GAPDH和18S rRNA作为内源性对照。18S rRNA的引物和Taqman探针购自Applied Biosystems。

[0091] 每个样品一式三份在ABI 7900序列检测系统(Applied Biosystems)上进行实时PCR。对Δ^9、Δ^6和Δ^5去饱和酶、PPARα和GAPDH而言,每20μl反应含有3μl第一链cDNA、1x Universal Master Mix(AppliedBiosystems)、300nmol/L的每个正向和反向引物、和250nmol/LTaqman探针。对18S rRNA而言,反应含有3μl第一链cDNA、1xUniversal Master Mix(Applied Biosystems)和1x18S探针/引物反应混合物。所有反应都使用以下循环参数进行:50℃持续2分钟和95℃持续10分钟,接着40个循环的95℃持续15秒钟和60℃持续1分钟,通常如Applied Biosystems推荐。使用每个未知样品的Ct读数(treshold循环数)计算去饱和酶、PPARa和GAPDH和18S rRNA的量。对每一样品而言,将

结果标准化成 GAPDH 和 18S rRNA。

[0092] 结果以每个试验组中 6 只动物的平均 SEM 报道。统计分析是通过单向 Anova Dunett′ s 试验 (Prism, GraphPad) 进行的。

[0093] 实施例 1

[0094] 单细胞蛋白 (SCP) 材料的制备

[0095] 含有荚膜甲基球菌 (Bath), Ralstonia sp.、Brevibacillus agri 和 Aneurinibacillus sp 的微生物培养物，它们都可以从 Norferm DanmarkAS, Odense, Denmark 商购获得，在环型发酵罐中通过在铵 / 无机盐培养基 (AMS) 中于 45℃、pH 6.5 下并以 0.15h^{-1} 的稀释速率连续需氧发酵天然气制得。该 AMS 培养基每升含有以下物质：10mg NH_3、75mgH_3PO_4 • $2H_2O$、380mg $MgSO_4$ • $7H_2O$、100mg $CaCl_2$ • $2H_2O$、200mgK_2SO_4、75mg $FeSO_4$ • $7H_2O$、1.0mg $CuSO_4$ • $5H_2O$、0.96mg$ZnSO_4$ • $7H_2O$、120μg $CoCl_2$ • $6H_2O$、48μg $MnCl_2$ • $4H_2O$、36g H_3BO_3、24g $NiCl_2$ • $6H_2O$ 和 1.20μg $NaMoO_4$ • $2H_2O$。

[0096] 发酵罐中充满在 125℃下热杀菌 10 秒钟的水。根据它们的消耗调整不同营养物的添加。用 2-3％生物质（以干重的基础）进行连续发酵。

[0097] 连续收获具有表 2 中给出的特性的单细胞材料：

[0098] 表 2

[0099] 单细胞蛋白 (SCP) 材料的组成

[0100]	组成(产物中％)		矿物质	
[0101]	粗蛋白*	66	磷	1.0％
[0102]	粗脂肪	9	氯	0.7％
[0103]	灰分	7	硫	0.5％
[0104]	水	6	钙	0.4％
[0105]	粗纤维	1	钾	0.4％
[0106]	无N萃取物	11	镁	0.2％
[0107]	合计	100	钠	0.1％
[0108]			铁	200ppm
[0109]	氨基酸(产物中％)		铜	90ppm
[0110]	赖氨酸	4.3	锌	15ppm
[0111]	甲硫氨酸	1.9	砷	0.05ppm
[0112]	胱氨酸	0.4	硒	0.02ppm
[0113]	苏氨酸	3.1	铅	0.0002ppm
[0114]	色氨酸	1.5	镉	0.00002ppm
[0115]	亮氨酸	5.2	汞	＜0.02ppm
[0116]	异亮氨酸	3.2		
[0117]	缬氨酸	4.2	维生素	mg/kg
[0118]	酪氨酸	2.8	烟碱酸	123
[0119]	苯丙氨酸	3.1	核黄素B2	69
[0120]	组氨酸	1.7	肌醇	28
[0121]	精氨酸	4.1	硫胺素B1	11
[0122]	丙氨酸	4.9		
[0123]	天冬氨酸	6.2	能量	MJ/kg
[0124]	谷氨酸	7.3	总能量	22.1
[0125]	甘氨酸	3.4		
[0126]	脯氨酸	3.0	其它数据	

[0127]	丝氨酸	2.5	颜色	浅褐色
[0128]	合计	62.8	风味	中性
[0129]			粒径	100-300ppm

[0130] *以干重为基础，粗蛋白含量为约 70％。

[0131] 生物质在工业连续离心机中于 3,000rpm 下经过离心，接着使用排除尺寸为 100,000 道尔顿的膜超滤。所得产物然后在热交换器中于约 130℃下进行约 90 秒钟的灭菌。

[0132] 实施例 2.

[0133] SCP 降低血浆胆固醇的浓度。

[0134] 给予肥胖 Zucker 大鼠含有 20％ SCP 作为唯一蛋白源的膳食。该 SCP 如上面实施例 1 所述制得。

[0135] 与喂食酪蛋白作为饲料蛋白的大鼠相比，在喂食 SCP 的 Zucker 大鼠中血浆胆固醇水平降低 57％。结果示于图 1。结果清楚地证实 SCP 降低血浆中胆固醇的水平并且可用作胆固醇降低剂。

[0136] 实施例 3

[0137] SCP 降低肝中三酰甘油的浓度

[0138] 图 2 显示 SCP 诱导肝中三酰甘油 (TG) 的浓度降低约 50％。这说明本发明的化合物可用作脂质降低剂，并可用于治疗和预防脂肪肝。

[0139] 实施例 4

[0140] SCP 抑制酰基 -CoA :胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 的活性

[0141] 酰基 -CoA :胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 催化脂肪酰基 -CoA 被酯化成胆固醇的反应。然后可以将胆固醇酯以液滴的形式贮存在细胞质中或者作为一部分 VLDL 以及游离胆固醇分泌。因此，ACAT 在 VLDL 分泌和接下来的胆固醇酯累积以及心血管疾病的危险中起主要作用。在本 Zucker 大鼠试验中，SCP 蛋白改变富含三酰甘油的脂蛋白部分中脂质分类的组成，即与喂食酪蛋白的大鼠相比，胆固醇酯和磷脂含量更低，而三酰甘油含量更高。图 3 显示与喂食酪蛋白的大鼠相比，在喂食 SCP 蛋白的大鼠中 ACAT 活性降低。由于存在有力证据证实 ACAT 活性增加在动脉粥样硬化的进展中起着重要作用，该发现说明以饲料补充物或药物给予的 SCP 可以保护心脏。

[0142] 图 3 显示与喂食酪蛋白的 Zucker 大鼠相比，在喂食 SCP 的大鼠中 ACAT 活性降低约 20％。

[0143] 实施例 5

[0144] SCP 增加线粒体 β－氧化

[0145] 图 4 显示 SCP 增加线粒体 β－氧化。增加的脂肪酸氧化是 SCP 的脂质降低效果下的重要因素。增加的脂肪酸代谢将使用于酯化的脂肪酸的量减少，并由此减少肝产生和分泌 VLDL。从图 4 可以看出与对照相比，SCP 显著增加棕榈酰基－辅酶 A 的氧化。

[0146] 实施例 6

[0147] SCP 干扰脂质体内稳态

[0148] 本数据说明 SCP 材料干扰脂质体内稳态，并且可以促进内源性配体的累积。尽管 PPARα 的未变化的肝 mRNA 水平（数据未显示），但是与喂食酪蛋白的大鼠相比，喂食 SCP 的大鼠中肝、血浆和富含三酰甘油的脂蛋白部分中脂肪酸组成发生变化，并且该变化在肝

和血浆中不平行（表 3 和 4）。与喂食酪蛋白的大鼠相比，在喂食 SCP 的大鼠中肝中饱和 14:0、16:0 和 18:0 脂肪酸的浓度增加。在喂食 SCP 的大鼠中，肝中几种单不饱和脂肪酸的浓度降低。与肝相反，在血浆中发现对饱和以及单不饱和脂肪酸的相反效果。在血浆中，通过喂食 SCP，饱和脂肪酸 14:0 和 16:0 增加。在喂食 SCP 的大鼠中单不饱和脂肪酸 18:1n-9 增加约 2 倍。在喂食 SCP 的动物中发现 20:4n-6 增加两倍。因此预测其肝伸长活性增加。喂食 SCP 的动物显示血浆 18:2n-6 浓度增加，而它们显示 20:4n-6 的血浆浓度降低。结果它们的血浆中 20:4n-6/18:2n-6 比降低。在喂食 SCP 的大鼠中肝中测定的所有 n-3 脂肪酸增加。通过喂食 SCP，血浆中 18:3n-3 增加 4 倍。在喂食 SCP 的大鼠中 20:5n-3 显著增加。

[0149] 表 3

[0150] 喂食 SCP 或酪蛋白 3 周后 Zucker 大鼠的肝中的脂肪酸组成[1]

		SCP		酪蛋白	
[0152]		平均值	SD	平均值	SD
[0153]	C14:0	1,98	0,20	1,47	0,16
[0154]	C15:0	0,15	0,03	0,11	0,02
[0155]	C16:0	36,84	2,59	38,77	1,90
[0156]	C17:0	0,18	0,03	0,09	0,02
[0157]	C18:0	8,18	1,14	3,59	0,26
[0158]	C20:0	0,05	0,01	0,03	0,00
[0159]	C22:0	0,05	0,01	0,01	0,00
[0160]	C23:0	0,02	0,01	0,01	0,00
[0161]	C24:0	0,11	0,02	0,03	0,01
[0162]	C14:1n-5	0,12	0,00	0,12	0,02
[0163]	C16:1n-9	0,68	0,06	0,72	0,08
[0164]	C16:1n-7	5,28	0,14	7,73	0,85
[0165]	C17:1n-8	0,12	0,02	0,14	0,02
[0166]	C18:1n-9	20,29	0,96	30,33	2,40
[0167]	C18:1n-7	2,22	0,38	4,16	0,18
[0168]	C20:1n-11	0,02	0,01	0,01	0,00
[0169]	C20:1n-9	0,06	0,02	0,08	0,01
[0170]	C20:1n-7	0,02	0,01	0,03	0,01
[0171]	C24:1n-9	0,02	0,01	0,01	0,00
[0172]	C20:3n-9	0,03	0,01	0,04	0,01
[0173]	C18:2n-6	14,21	2,52	8,73	0,85
[0174]	C20:2n-6	0,12	0,04	0,04	0,01
[0175]	C18:3n-6	0,57	0,12	0,35	0,06
[0176]	C20:3n-6	0,66	0,15	0,11	0,01
[0177]	C20:4n-6	4,69	1,00	2,03	0,36
[0178]	C22:4n-6	0,22	0,06	0,12	0,04
[0179]	C22:5n-6	0,15	0,04	0,08	0,02
[0180]	C18:3n-3	0,76	0,16	0,30	0,03
[0181]	C18:4n-3	0,08	0,02	0,02	0,00
[0182]	C20:4n-3	0,06	0,03	0,01	0,00
[0183]	C20:5n-3	0,23	0,06	0,04	0,01
[0184]	C22:5n-3	0,59	0,16	0,15	0,04
[0185]	C22:6n-3	1,23	0,36	0,53	0,11

[0186] 表 4

[0187] 喂食 SCP 或酪蛋白 3 周后 Zucker 大鼠的血浆中的脂肪酸组成[1]

		SCP		酪蛋白	
[0189]		平均值	SD	平均值	SD
[0190]	C12:0	0,05	0,01	0,02	0,01
[0191]	C14:0	0,99	0,15	0,31	0,03
[0192]	C15:0	0,13	0,02	0,08	0,01
[0193]	C16:0	24,59	2,08	17,48	0,97
[0194]	C17:0	0,14	0,01	0,09	0,01
[0195]	C18:0	10,95	1,30	12,62	0,71
[0196]	C20:0	0,09	0,02	0,06	0,01
[0197]	C22:0	0,19	0,07	0,21	0,03
[0198]	C23:0	0,07	0,02	0,09	0,01
[0199]	C24:0	0,30	0,10	0,31	0,05
[0200]	C14:1n-5	0,06	0,02	0,01	0,01
[0201]	C16:1n-9	0,40	0,06	0,27	0,06
[0202]	C16:1n-7	2,70	2,04	1,13	0,89
[0203]	C17:1n-8	0,07	0,02	0,05	0,01
[0204]	C18:1n-9	11,54	2,38	6,39	1,15
[0205]	C18:1n-7	1,43	0,21	1,47	0,11
[0206]	C20:1n-9	0,07	0,02	0,05	0,01
[0207]	C20:1n-7	0,04	0,01	0,03	0,00
[0208]	C24:1n-9	0,14	0,06	0,25	0,03
[0209]	C20:3n-9	0,05	0,01	0,08	0,02
[0210]	C18:2n-6	22,99	2,14	11,92	1,22
[0211]	C18:3n-6	0,60	0,09	0,40	0,10
[0212]	C20:2n-6	0,14	0,02	0,08	0,01
[0213]	C20:3n-6	1,29	0,12	0,47	0,07
[0214]	C20:4n-6	16,14	3,76	41,56	1,90
[0215]	C22:4n-6	0,34	0,07	0,35	0,05
[0216]	C22:5n-6	0,22	0,03	0,39	0,05
[0217]	C18:3n-3	0,92	0,17	0,22	0,05
[0218]	C18:4n-3	0,05	0,03	0,00	0,00
[0219]	C20:4n-3	0,09	0,03	0,01	0,01
[0220]	C20:5n-3	0,66	0,09	0,24	0,06
[0221]	C22:5n-3	0,89	0,11	0,52	0,08
[0222]	C22:6n-3	1,68	0,33	2,85	0,24

[0223] 实施例 7

[0224] SCP 降低血浆中高半胱氨酸的浓度

[0225] 已提出增加水平的高半胱氨酸，即高高半胱氨酸血症与动脉疾病有关，因此我们测定了大鼠的血浆样品中高半胱氨酸的水平。

[0226] 通过全自动荧光试验测定总血浆高半胱氨酸。由 30μl NaBH4/DMSO 溶液 (6mol/L) 还原 30μl 血浆。1,5 分钟后加入 20μl 乙腈中的荧光试剂 monobromobimane(25mmol/L) 并使其反应 3 分钟。通过将 20μl 样品注入到强阳离子交换柱中，然后柱转换到环己基二氧化硅柱中，立即用 HPLC 分析。SCX 柱经过等度洗脱，CH 柱用 20mmol/L 甲酸盐缓冲液中的线性甲醇梯度 (17-35%，在 5 分钟内) 洗脱。在 4.5 分钟的保留时间下洗脱出高半胱氨酸。结果示于表 5。

[0227] 表 5.

[0228] 高半胱氨酸的血浆浓度

[0229]

	血浆浓度（μmol/L）
对照（酪蛋白）	1,37±0,27
SCP	1,09±0,18

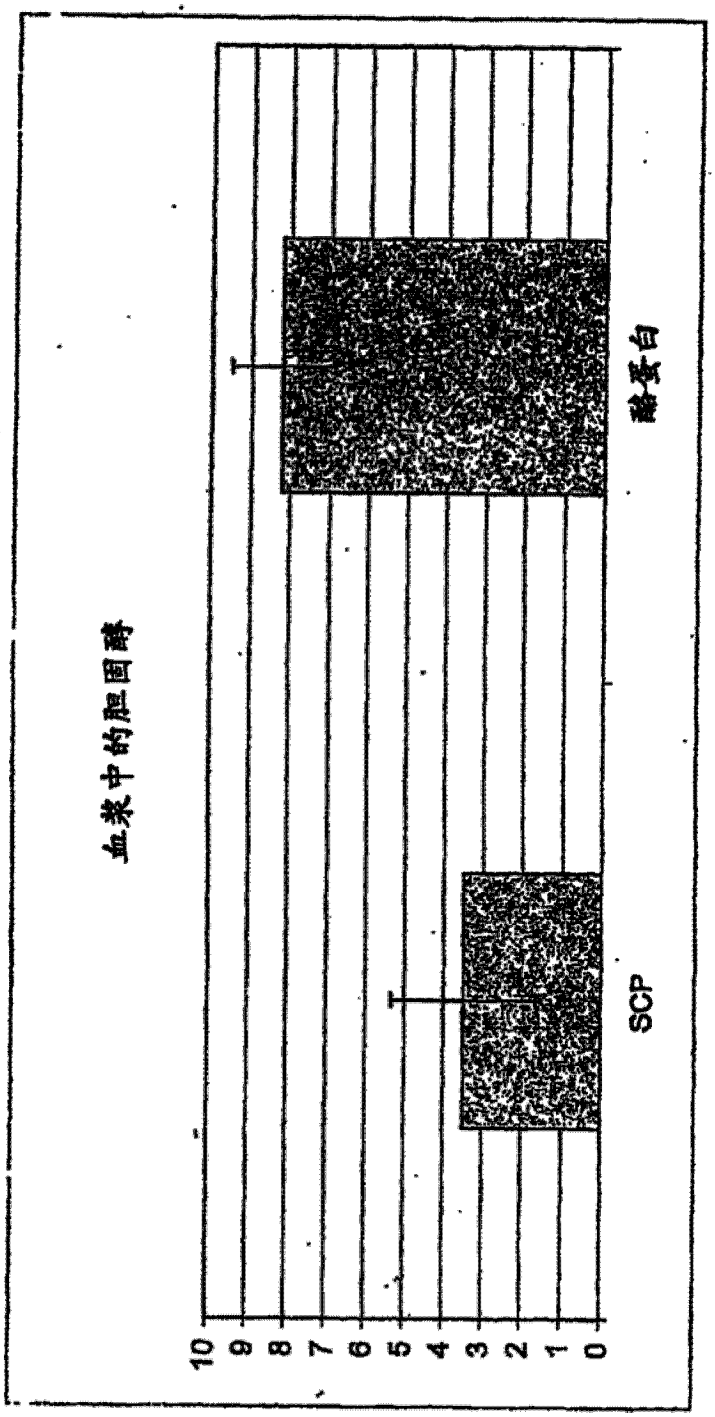


图 1

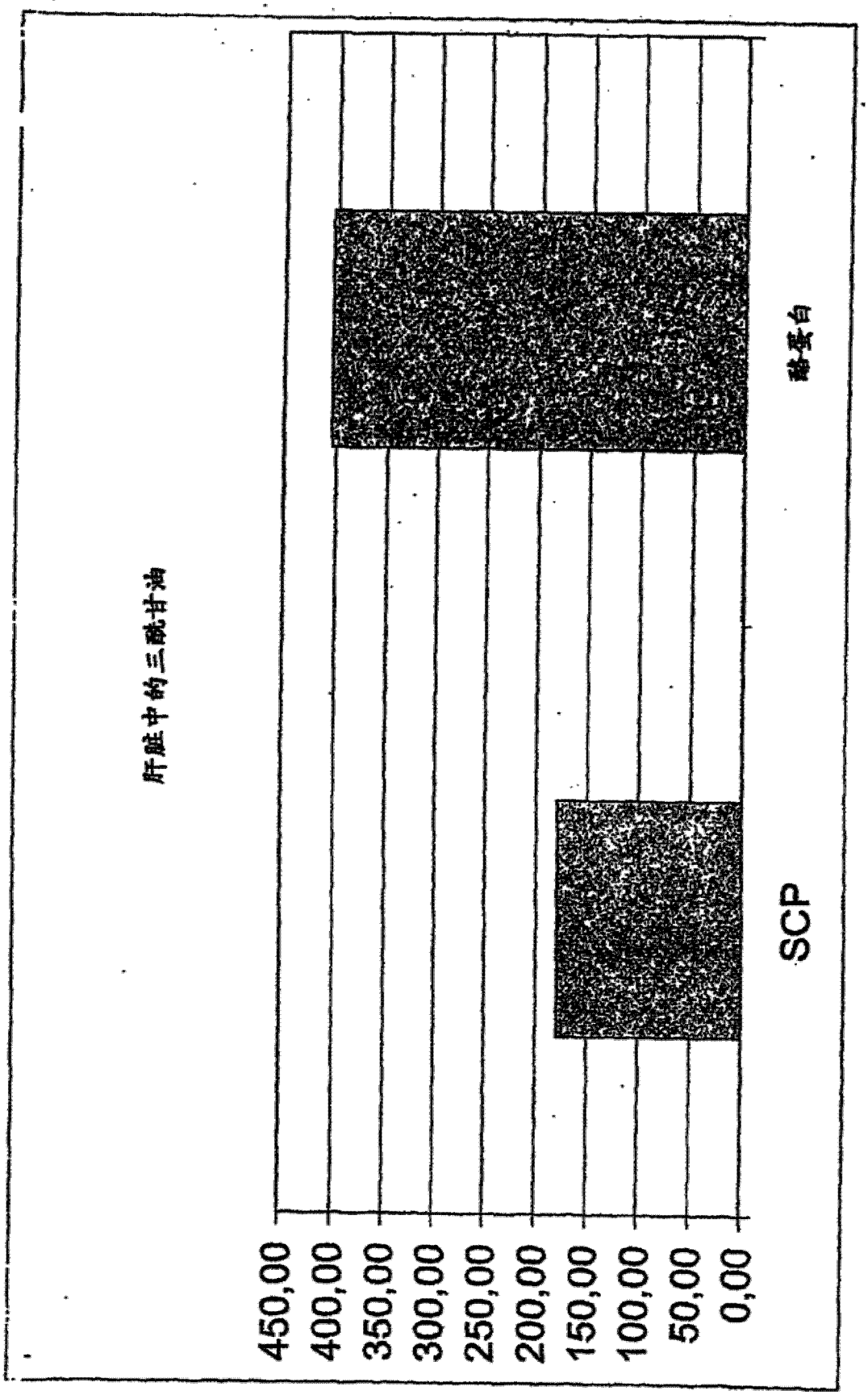

肝脏中的三酰甘油
450,00
400,00
350,00
300,00
250,00
200,00
150,00
100,00
50,00
0,00
SCP
融蛋白

图 2

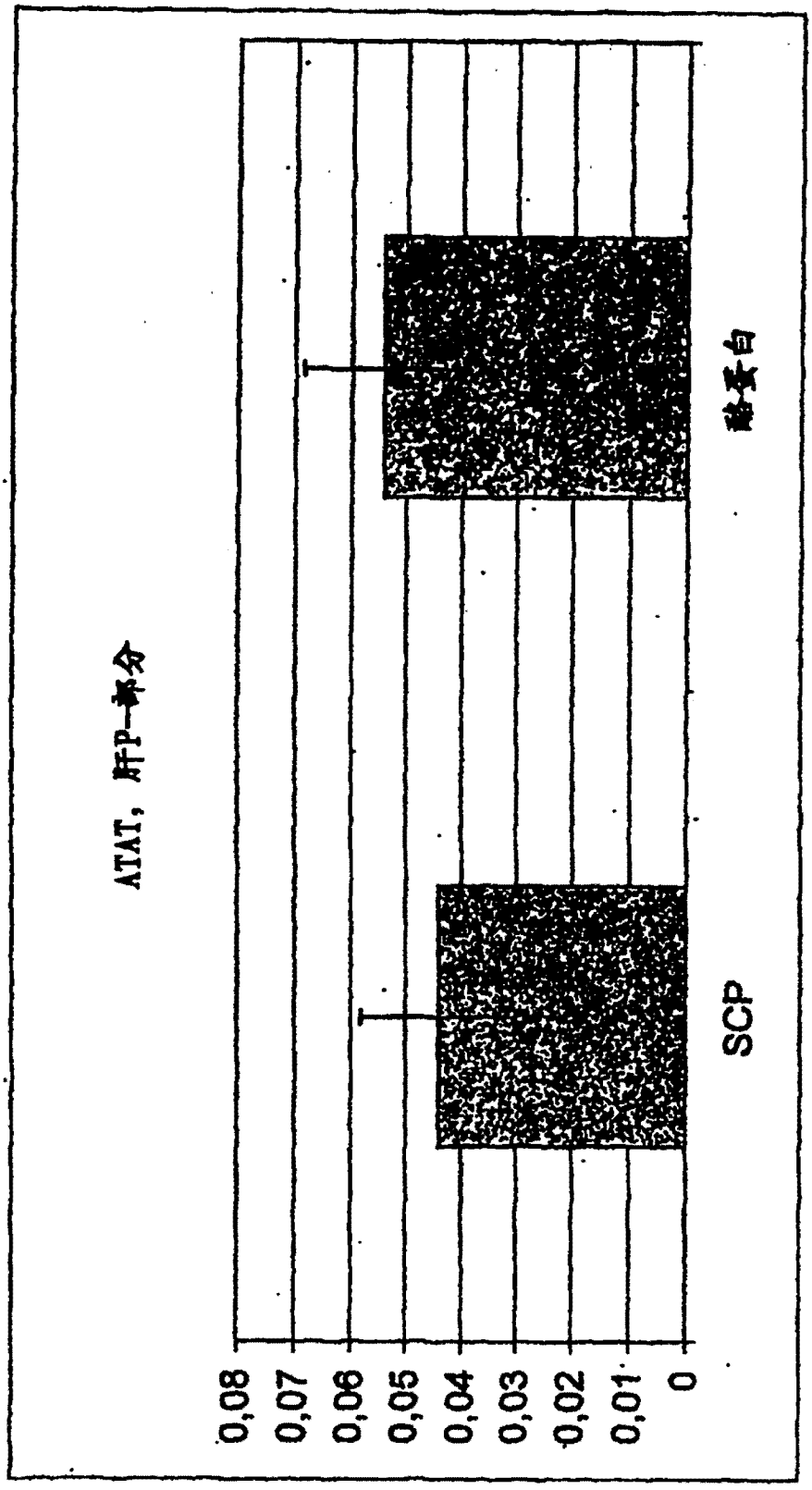


图 3

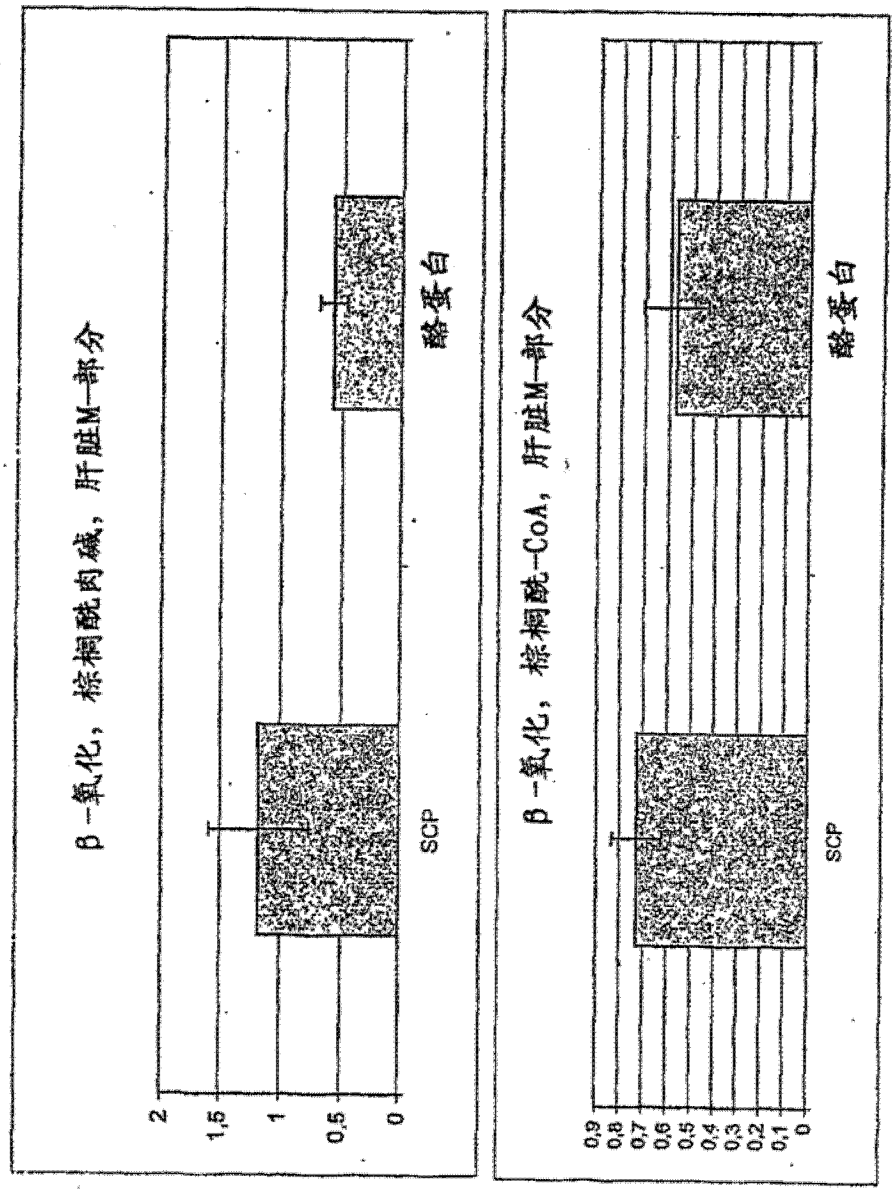

β-氧化，棕榈酰肉碱，肝脏M-部分
酪蛋白
SCP
2
1,5
1
0,5
0
β-氧化，棕榈酰-CoA，肝脏M-部分
酪蛋白
SCP
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0

图 4