(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 101151300 B
(45)授权公告日 2011.05.25

(21)申请号 200680009917.1
(22)申请日 2006.05.31
(30)优先权数据
11/140,863 2005.05.31 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2007.09.26
(86)PCT申请的申请数据
PCT/EP2006/005179 2006.05.31
(87)PCT申请的公布数据
WO2006/128685 EN 2006.12.07
(73)专利权人 格利达股份公司
地址 德国埃伯巴赫
(72)发明人 维尔弗里德·巴贝尔
约翰·M·多尔芬 汤姆·基南
贾森·D·拉塞尔
(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
代理人 樊卫民 郭国清
(51)Int.Cl.
C12P 21/06(2006.01)
C08H 1/06(2006.01)
C08L 89/06(2006.01)
(56)对比文件
CN 1140554 A,1997.01.22,
审查员 皋锋

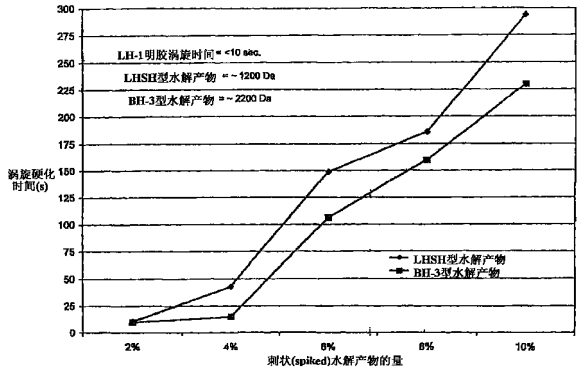
权利要求书 2 页 说明书 24 页 附图 1 页

(54)发明名称

用于制备低分子量明胶水解产物的方法和明胶水解产物组合物

(57)摘要

本发明提供了用于制备明胶水解产物的方法、明胶水解产物和包括明胶水解产物的组合物。更具体地，本发明提供了交联趋势减少且溶解性质改进的明胶组合物。



CN 101151300 B

1. 一种用于制备明胶水解产物的方法，该明胶水解产物的平均分子量为 100 至 2000Da，平均伯胺含量为 $1.0x10^{-3}$ 至 $1.0x10^{-2}$ μMol 伯胺 / μg 明胶水解产物，该方法包括：

(a) 使明胶原材料与一系列至少三种具有内肽酶活性的蛋白水解酶接触，以形成经内肽酶消化的明胶产物，所述三种蛋白水解酶由来自枯草芽孢杆菌的内肽酶、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶组成；和

(b) 使经内肽酶消化的明胶产物与一系列至少两种具有外肽酶活性的蛋白水解酶接触，所述两种蛋白水解酶由来自米曲霉的外肽酶和来自豆曲霉的外肽酶组成。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中按照下列顺序将各种蛋白水解酶依次添加到明胶原材料中：来自枯草芽孢杆菌的内肽酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、来自米曲霉的外肽酶和来自豆曲霉的外肽酶；且其中在添加后续的蛋白水解酶之前，各种蛋白水解酶将明胶原材料消化 0.5 至 2 小时。

3. 如权利要求 1 至 2 中任一项所述的方法，其中使蛋白水解消化过程进行 5 至 12 小时。

4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法，其中在 60℃和明胶浓度为 6.67wt％时，所述明胶原材料的胶凝强度小于 150，粘度小于 30mP。

5. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法，其中使包含 10％至 50％ (w/w) 明胶原材料的水溶液与蛋白水解酶接触。

6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的方法，其中所述明胶原材料是药用级明胶。

7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法，其中将 0.05％至 0.15％ (w/w) **Corolase®** 7089、0.025％至 0.075％ (w/w) **Enzeco®** 菠萝蛋白酶浓缩物、0.05％至 0.15％ (w/w) 木瓜蛋白酶 6000L、0.025％至 0.075％ (w/w) **Validase®** FPII 和 0.05％至 0.15％ (w/w) **Corolase®** LAP 添加到明胶原材料中。

8. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的方法，其中在 5 至 7 的 pH 和 40℃至 65℃的温度下进行蛋白水解消化。

9. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法，其中所述明胶水解产物的平均分子量范围为 100 至 1500Da。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述明胶水解产物的平均分子量范围为 400 至 1200Da。

11. 一种明胶水解产物，其平均分子量为 100 至 2000Da，平均伯胺含量为 $1.0x10^{-3}$ 至 $1.0x10^{-2}$ μMol 伯胺 / μg 明胶水解产物。

12. 如权利要求 11 所述的明胶水解产物，其中所述明胶水解产物的水解程度大于 13％。

13. 如权利要求 11 或 12 所述的明胶水解产物，其中所述明胶水解产物的平均分子量范围为 100 至 1500Da。

14. 如权利要求 13 所述的明胶水解产物，其中平均分子量为 400 至 1200Da。

15. 如权利要求 11 至 14 中任一项所述的明胶水解产物，其中所述明胶水解产物的平均多肽长度为 4 至 18 个氨基酸。

16. 一种通过权利要求 1 至 10 中任一项的方法制备的明胶水解产物。

17. 一种明胶组合物，包括 1wt％至 20wt％的权利要求 11 至 16 中任一项的明胶水解产物和 80wt％至 99wt％明胶。

18. 如权利要求 17 所述的明胶组合物，其中所述组合物包括 5wt％至 10wt％明胶水解产物和 90wt％至 95wt％明胶。

19. 如权利要求 17 或 18 所述的明胶组合物，其中在所述组合物中包括的明胶水解产物和明胶的比率为 1 ： 4 至 1 ： 99(w/w)。

20. 如权利要求 17 至 19 中任一项所述的明胶组合物，其中所述明胶的平均分子量大于 150,000Da。

21. 如权利要求 17 至 19 中任一项所述的明胶组合物，其中所述明胶的平均分子量为 100,000 至 150,000。

22. 如权利要求 17 至 21 中任一项所述的明胶组合物，其中明胶为药用级明胶。

23. 如权利要求 17 至 22 中任一项所述的明胶组合物，其中所述明胶为 B 型明胶。

24. 如权利要求 17 至 22 中任一项所述的明胶组合物，其中所述明胶为 A 型明胶。

25. 如权利要求 17 至 24 中任一项所述的明胶组合物，其中所述明胶水解产物的平均分子量为 100 至 1500Da。

26. 如权利要求 25 所述的明胶组合物，其中所述明胶水解产物的平均分子量为 100 至 1500Da，平均伯胺含量为 $1.0x10^{-3}$ 至 $1.0x10^{-2}$ μMol 伯胺 / μg 明胶水解产物。

27. 如权利要求 17 至 24 中任一项所述的明胶组合物，其中所述明胶水解产物是根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法获得的蛋白水解明胶。

28. 如权利要求 17 至 26 中任一项所述的明胶组合物，其中所述明胶水解产物是酸性水解的明胶。

29. 如权利要求 17 至 28 中任一项所述的明胶组合物，还包括甘氨酸。

30. 如权利要求 29 所述的明胶组合物，其中甘氨酸的量为 0.5wt％至 5wt％。

31. 如权利要求 29 或 30 所述的明胶组合物，还包括柠檬酸。

32. 如权利要求 31 所述的明胶组合物，其中柠檬酸的量为 0.5wt％至 5wt％。

33. 如权利要求 28 所述的明胶组合物，其中甘氨酸的添加量为 1.5wt％至 2.5wt％，柠檬酸盐的添加量为 0.5wt％至 1.5wt％。

34. 如权利要求 17 至 33 中任一项所述的明胶组合物，其中所述组合物的涡旋硬化时间为 200 至 300 秒。

35. 如权利要求 17 至 33 中任一项所述的明胶组合物，其中所述组合物的涡旋硬化时间大于 300 秒。

36. 如权利要求 17 至 35 中任一项所述的明胶组合物，其中所述组合物的平均粘度为 10 至 15cP，且其中在 60℃的反应温度下，在向该组合物中添加 0.5wt％的 [2-(4- 二甲基氨基甲酰基 - 吡啶并)- 乙烷 -1- 磺酸盐] 并使其反应两小时后，组合物的平均粘度为 15 至 50cP。

用于制备低分子量明胶水解产物的方法和明胶水解产物组合物

发明领域

[0001] 本申请要求 2005 年 5 月 31 日提交的 USSN11/140,863 的优先权，该申请的全部内容被纳入本文以供参考。

[0002] 本发明一般涉及明胶水解产物、用于制备该明胶水解产物的方法、和包括该明胶水解产物的组合物。更具体地，本发明提供了具有高伯胺含量的低分子量明胶水解产物、用于制备该明胶水解产物的方法、和包括该明胶水解产物的明胶组合物。

[0003] 发明背景

[0004] 通过使材料如猪皮、牛皮或皮革、和动物骨头中所含的胶原变性来制造明胶。像其母体蛋白质胶原一样，明胶也由包括独特氨基酸掺混物的不同结构来定义。天然胶原是基于多肽链的硬蛋白，包含约 1050 个氨基酸。三种所述多肽链结合起来形成三股螺旋。几种所述三股螺旋叠加产生通过交联而稳定的胶原细丝，从而形成三维网络结构。这种特别的结构使得胶原是不可溶的；然后通过部分水解为明胶或明胶水解产物将其变成可溶形式。胶原以及因此明胶的氨基酸含量为约三分之一甘氨酸和另外 22％脯氨酸和 4- 羟基脯氨酸；剩余 45％包括 17 种不同的氨基酸。明胶具有极高含量的酸性和碱性氨基酸。对于酸性氨基酸（谷氨酸和天冬氨酸），各种数量作为谷氨酰胺和天冬酰胺的酰氨基形式存在，这取决于在明胶制造过程中所用的加工条件。完全不存在半胱氨酸；对于含硫氨基酸，唯一存在的是甲硫氨酸。

[0005] 家禽和鱼胶原的数据稍有不同，但本发明可类似地用于源自家禽和鱼胶原的明胶和 / 或明胶水解产物。

[0006] 明胶能够用于广泛的应用，这取决于其原材料和制造方法。这是因为明胶的物理和化学行为一方面取决于其氨基酸含量与所得空间结构的组合，另一方面取决于各种条件如 pH、离子强度和与其它分子的反应。例如，不同种类的明胶可用于不同的应用，例如食品、照相、化妆品和制药。

[0007] 在制药工业中，明胶特别用于制造硬胶囊和软胶囊。明胶胶囊提供了方便有效的方法来口服施用药物，因为胶囊在暴露于胃的酸性内容物后会迅速崩解，从而将药物释放到体内。尽管明胶胶囊提供了一流的药学手段来施用药物，但风险在于明胶胶囊可能遭遇由称为交联的过程所致的崩解和溶解延迟。据信，当明胶中的羰基、胶囊中包含羰基的填充成分、或填充成分分解成的羰基与明胶所含的伯胺和其它含氮化合物反应以形成交联时，会发生交联。

[0008] 尤其是，交联可能对明胶胶囊在长期贮存和暴露于极端高热和高湿时的行为具有不利的结果。胶囊剂型内的广泛明胶交联可以导致形成非常薄弱、坚硬和水不溶性的膜，通常称为薄皮。薄皮作为橡胶状的水不溶性层，能够限制或防止胶囊内容物的释放。

[0009] 一种广泛报道的用于防止明胶胶囊内部交联的手段关注作为羰基清除剂的产品，它们可以防止羰基如醛基与明胶胶囊壳相互作用，从而防止明胶交联。这些方法通常全都建议将产品添加到明胶胶囊所含的药物组合物中。例如，已经显示将氨基酸甘氨酸和柠檬

酸组合添加到包封在硬明胶胶囊内的剂型中，能够改进硬胶囊的溶解曲线(3)。证实单独添加氨基酸甘氨酸不能获得满意的结果。但是以减少明胶胶囊内部交联所需的量添加羰基清除剂如甘氨酸、和羧酸如柠檬酸盐，这显然受到成本的限制。这样的话，将这些产品添加到明胶中并不是解决明胶胶囊交联的实用方案。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了一种实用的、成本有效的手段来减少明胶的交联。简言之，本发明包括低分子量的明胶水解产物，当其与较高分子量的明胶掺混时，通过增加掺混明胶产物中游离甘氨酸、其它氨基酸和小肽的量，该产物可减少明胶的交联并改进溶解性质。有益地，因为本发明的明胶水解产物和掺混的明胶组合物具有减少的交联性质，而不用将产品如甘氨酸作为独立化合物与柠檬酸混合，所以所述明胶仍然可以作为天然产物出售。

[0012] 因此，在本发明的几个方面，提供了用于制备明胶水解产物的方法，该水解产物的平均分子量为约100至约2000Da，优选约1500Da，平均伯胺含量为约1.0×10^{-3}至约1.0×10^{-2}μMol伯胺/μg明胶水解产物。该方法包括：使明胶原材料与至少一种具有内肽酶活性的蛋白水解酶接触，以形成经内肽酶消化的明胶产物。然后典型地使经内肽酶消化的明胶产物与至少一种具有外肽酶活性的蛋白水解酶接触。通常，内肽酶和外肽酶的蛋白水解消化过程进行足够长的时间，所实施的反应条件可形成明胶水解产物。

[0013] 本发明的另一方面包括用于制备明胶水解产物的方法。该方法包括：使明胶原材料与一系列至少三种具有内肽酶活性的蛋白水解酶接触，以形成经内肽酶消化的明胶产物。典型地，所述三种蛋白水解酶由来自枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)的内肽酶(例如Corolase® 7089)、菠萝蛋白酶(例如Enzeco®菠萝蛋白酶浓缩物)和木瓜蛋白酶(例如木瓜蛋白酶6000L)组成。然后使经内肽酶消化的明胶产物与一系列至少两种具有外肽酶活性的蛋白水解酶接触。通常，所述两种蛋白水解酶由来自米曲霉(Aspergillus oryzae)的外肽酶(例如Validase® FPII)和来自豆曲霉(Aspergillus sojae)的外肽酶(例如Corolase® LAP)组成。

[0014] 本发明的还一方面提供了明胶水解产物。所述明胶水解产物的平均分子量典型地为约100至约2000Da，优选约1500Da，平均伯胺含量典型地为约1.0×10^{-3}至约1.0×10^{-2}μMol伯胺/μg明胶水解产物。在一个实施方案中，通过如下方法制备所述明胶水解产物，该方法包括：使明胶原材料与一系列至少三种具有内肽酶活性的蛋白水解酶接触，以形成经内肽酶消化的明胶产物。典型地，所述三种蛋白水解酶选自：来自枯草芽孢杆菌的内肽酶(例如Corolase® 7089)、菠萝蛋白酶(例如Enzeco®菠萝蛋白酶浓缩物)和木瓜蛋白酶(例如木瓜蛋白酶6000L)。然后使经内肽酶消化的明胶产物与一系列至少两种具有外肽酶活性的蛋白水解酶接触。通常，所述两种蛋白水解酶选自：来自米曲霉的外肽酶(例如Validase® FPII)和来自豆曲霉的外肽酶(例如Corolase® LAP)。

[0015] 本发明的附加方面涉及明胶组合物。该组合物包括明胶水解产物和明胶。典型地，所述组合物将包括约1wt％至约20wt％明胶水解产物和约80wt％至约99wt％明胶。

[0016] 对于本发明的其它目的和特征，一部分是显而易见的，一部分将在下文中指出。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1 显示了 :通过涡旋硬化程序测量,经添加 2 种不同的明胶水解产物 BH-3 型和 LHSH 型,减少了由甲醛诱导的石灰鞣革明胶 LH-1 的交联。BH-3 型水解产物为低分子量石灰鞣革水解产物,LHSH 型为本发明的石灰鞣革水解产物。

[0019] 优选实施方案描述

[0020] 本发明提供了新型明胶水解产物、用于制备所述明胶水解产物的方法和包括所述明胶水解产物的明胶组合物。已经发现,将低分子量的明胶水解产物、尤其是本发明的明胶水解产物与明胶掺混,可以通过增加掺混明胶产物中游离甘氨酸、其它氨基酸和小肽的量来减少明胶交联的趋势,并改进溶解性质。有益地,本发明提供了成本有效的手段来减少明胶交联,并且有益地保留了明胶的初始氨基酸成分,而不需要添加非明胶来源的化合物如柠檬酸。这样的话,本发明的明胶水解产物组合物仍然能够作为天然产物出售。

[0021] I. 用于制备明胶水解产物的方法

[0022] 本发明的一个方面包括用于制备明胶水解产物的方法,该水解产物的平均分子量为约 100 至约 2000Da,优选约 1500Da,平均伯胺含量为约 1.0×10^{-3} 至约 1.0×10^{-2} μ Mol 伯胺 / μ g 明胶水解产物。该方法包括使明胶原材料与至少一种具有内肽酶活性的蛋白水解酶接触,以形成经内肽酶消化的明胶产物。然后典型地使经内肽酶消化的明胶产物与至少一种具有外肽酶活性的蛋白水解酶接触。通常,内肽酶和外肽酶蛋白水解消化过程进行足够长的时间,反应的运行条件能够形成明胶水解产物。

[0023] 本发明方法所用的明胶原材料典型地源自获自几种合适原料的胶原或富含胶原的组织。富含胶原的组织包括来自动物的皮肤和骨头,例如来自鱼、家禽、猪或牛。源自胶原的明胶通常有两种主要的类型,即 A 型和 B 型,其区别在于制造方法。在一个实施方案中,明胶原材料为 A 型明胶。A 型的等离子点为 7 至 10.0,可通过本领域公知的方法,以专用的酸预处理法从胶原获得。在替代实施方案中,明胶原材料为 B 型明胶。B 型的等离子点为 4.8 至 5.8,是胶原的碱预处理的结果,可通过本领域公知的方法制得。

[0024] 在另一个替代实施方案中,明胶原材料为 A 型和 B 型的混合物。A 型和 B 型明胶各自的量可以大不相同,只要不损害所产生的明胶水解产物的性质。

[0025] 基本上,可以用酶解产生的明胶完全或部分地交换 A 型和 B 型明胶中的任何一种。然而,到目前为止,用于制造明胶的酶解方法并未得到广泛使用。

[0026] 无论哪种实施方案,明胶原材料通常都将包含约 80wt% 至约 90wt% 蛋白质、约 0.1wt% 至约 2wt% 矿盐 (对应灰分含量) 和约 10wt% 至约 15wt% 水。

[0027] 还预期明胶原材料的物理性质能够并且将根据明胶水解产物的预期用途而变化。明胶原材料的平均分子量将典型地为约 50,000Da 至约 200,000Da。在特别优选的实施方案中,明胶原材料的平均分子量将小于约 150,000Da。

[0028] 在一个实施方案中,明胶原材料的胶凝强度 (bloom strength) 将为约 50 至约 300,pH 将为约 3.8 至约 7.5,等电点将为约 4.7 至约 9.0,粘度将为约 15 至约 75mP,灰分将为约 0.1 至约 2.0%。

[0029] 在替代实施方案中,当明胶原材料基本上为 A 型明胶时,胶凝强度将为约 50 至约 300,pH 将为约 3.8 至约 5.5,等电点将为约 7.0 至约 9.0,粘度将为约 15 至约 75mP,灰分将为约 0.1 至约 2.0%。

[0030] 在替代实施方案中,当明胶原材料基本上为 B 型明胶时,胶凝强度将为约 50 至约

300，pH 将为约 5.0 至约 7.5，等电点将为约 4.7 至约 5.4，粘度将为约 20 至约 75mP，灰分将为约 0.5 至约 2.0％。

[0031] 在一个优选实施方案中，当明胶水解产物用于制造硬胶囊药物产品时，明胶原材料的胶凝强度将为约 200 至约 300，粘度将为约 40 至约 60mP，pH 将为约 4.5 至约 6.5。在还一个优选实施方案中，当明胶水解产物用于制造软壳胶囊药物产品时，明胶原材料的胶凝强度将为约 125 至约 200，粘度将为约 25 至约 45mP，pH 将为约 4.5 至约 6.5。

[0032] 在本发明的方法中，典型地通过被称为溶胀的过程将明胶原材料与水混合或溶于水，以形成包括约 10wt％至约 60wt％明胶的溶液。在一个优选实施方案中，所述溶液包括约 10wt％至约 50wt％明胶。

[0033] 在进一步优选的实施方案中，所述溶液包括约 20wt％至约 50wt％明胶。在还更优选的实施方案中，所述溶液包括约 35wt％至约 40wt％明胶。

[0034] 预期具有不同粒度的明胶可以用于本发明作为原材料。例如，明胶粒度可以为约 0.1mm 至约 10mm。在一个实施方案中，明胶粒度可以为精细型，平均粒度为约 0.1 至约 0.3mm。在另一个实施方案中，明胶粒度可以为中等，平均粒度为约 0.3 至约 0.8mm。在还一个实施方案中，明胶粒度可以为大型，平均粒度近似大于约 0.8mm。一般来说，明胶原材料的粒度将影响明胶溶于溶液中所需的时间。在溶胀过程中，利用明胶可吸收其十倍重量的冷水的能力。细粒度的明胶在几分钟内溶胀，中等粒度的明胶在约 8 至约 12 分钟内溶胀，而大粒度的明胶在约一小时内溶胀。典型地，能够使用所有粒度制备低浓度的明胶溶液，即包含例如约 10wt％至约 20wt％明胶的溶液。对于高浓度的溶液，即包含例如约 30wt％至约 35wt％明胶的溶液，典型地使用粗粒子，因为它们不会在加工过程中趋于聚集，并且可产生较少的气泡。

[0035] 在通过溶胀过程使明胶成为溶液后，典型地在添加蛋白水解酶前，典型地调整溶液的 pH、温度和氧化还原态，以使明胶在制造过程中存在少量残余过氧化物，从而优化水解反应，尤其是确保在水解反应中所用的包含半胱氨酸的蛋白水解酶作用接近其最佳活性水平。调整明胶溶液的 pH 并保持在约 5 至约 7。在特别优选的实施方案中，调整明胶溶液的 pH 并保持在约 6.0 至约 6.5。在该 pH 下，下面详述的蛋白水解酶接近其最佳活性水平。可以根据本领域公知的方法调整和监测明胶溶液的 pH。例如，要降低明胶溶液的 pH，典型地添加酸如盐酸。或者，要增加明胶溶液的 pH，典型地添加碱如氢氧化钠。在水解反应过程中，优选根据本领域已知的方法，将明胶溶液的温度调整并保持在约 40℃至约 65℃。在特别优选的实施方案中，在水解反应过程中，将明胶溶液的温度调整并保持在约 50℃至约 60℃。通常，高于该范围的温度可能使蛋白水解酶失活，而低于该范围的温度将减缓蛋白水解酶的活性。根据水解反应中所用的蛋白水解酶，典型地应该调整明胶溶液的氧化还原态并保持为中性至稍偏还原一侧。高水平的氧化剂将钝化水解反应中所用的一些包含半胱氨酸的蛋白水解酶，而低水平的还原剂可以用于保留一些蛋白水解酶，如木瓜蛋白酶的活性，直至它们被失活。

[0036] 通常，通过将蛋白水解酶添加到明胶溶液中来进行水解反应。几种蛋白水解酶适用于本发明的方法。在优选实施方案中，蛋白水解酶将为食品级酶，在约 5 至约 7 的 pH 和约 40℃至约 65℃的温度下具有内肽酶或外肽酶活性。在特别优选的实施方案中，蛋白水解酶将为食品级酶，在约 6 至约 6.5 的 pH 和约 50℃至约 60℃的温度下具有内肽酶或外肽酶

活性。

[0037] 在一个实施方案中，内肽酶将为属于EC3.4.21的食品级丝氨酸蛋白酶。在该实施方案的一个替代方案中，丝氨酸蛋白酶为糜蛋白酶。在该实施方案的还一个替代方案中，丝氨酸蛋白酶为枯草杆菌蛋白酶。在另一个实施方案中，内肽酶将为属于EC3.4.22的食品级半胱氨酸蛋白酶。在还一个实施方案中，内肽酶将为属于EC3.4.23的食品级天冬氨酸蛋白酶。在另外的实施方案中，内肽酶将为属于EC3.4.24的食品级金属蛋白酶。可用于本发明方法的食品级内肽酶的示例性非限制性例子包括Validase® AFP、Validase® FP500、碱性蛋白酶浓缩物、Validase® TSP、Enzeco® 菠萝蛋白酶浓缩物、Corolase® 7089、木瓜蛋白酶600L和不含亚硫酸盐的Validase® 木瓜蛋白酶浓缩物。

[0038] 在其它实施方案中，外肽酶将为属于EC3.4.11的食品级氨肽酶。在另一个实施方案中，外肽酶将为属于EC3.4.13的食品级二肽酶。在还一个实施方案中，外肽酶将为属于EC3.4.14的食品级肽基二肽酶或三肽酶。在另一个实施方案中，外肽酶将为属于EC3.4.15的食品级肽基二肽酶。在另外的实施方案中，外肽酶将为属于EC3.4.16的食品级丝氨酸型羧肽酶。在还一个实施方案中，外肽酶将为属于EC3.4.17的食品级金属羧肽酶。在另外的实施方案中，外肽酶将为属于EC3.4.18的食品级半胱氨酸型羧肽酶。在还一个实施方案中，外肽酶将为属于EC3.4.19的食品级 ω 肽酶。可用于本发明方法的食品级外肽酶的示例性例子包括Validase® FP II或Corolase LAP®。

[0039] 可用于本发明方法的食品级水解酶的另一个例子是Validase® FP浓缩物。其它合适的食品级蛋白水解酶的例子示于表A中。

[0040] 表A

[0041]

蛋白水解酶	来源
Alcalase®	Novoenzymes
Flavourzyme®	Novoenzymes
Protamex®	Novoenzymes
真菌蛋白酶浓缩物	Genencor Enzymes
真菌蛋白酶500,000	Genencor Enzymes
Protex™ 6L	Genencor Enzymes

Multifect® P-3000	Genencor Enzymes
Multifect® 中性	Genencor Enzymes
Corolase® TS	AB Enzymes
Corolase® PP	AB Enzymes
Enzeco® 糜蛋白酶 1 ： 1	Enzeco Development Corp.
Enzeco® 胰岛素 1200	Enzeco Development Corp.
Enzeco® 胰岛素 6	Enzeco Development Corp.
Enzeco® 无花果蛋白酶	Enzeco Development Corp.
Enzeco® 真菌酸性蛋白酶	Enzeco Development Corp.
Enzeco® 真菌蛋白酶 100	Enzeco Development Corp.
Enzeco® 真菌蛋白酶 180	Enzeco Development Corp.
Enzeco® 真菌蛋白酶 400	Enzeco Development Corp.

[0042]

Enzeco® 外蛋白酶	Enzeco Development Corp.
Enzeco® 中性细菌蛋白酶 2X	Enzeco Development Corp.
Enzeco® 中性细菌蛋白酶 160K	Enzeco Development Corp.
Enzeco® 谷氨酰胺酶 ADK	Enzeco Development Corp.

Enzeco® 碱性蛋白酶 L-600 FG	Enzeco Development Corp.
Enzeco® 碱性蛋白酶 44MG	Enzeco Development Corp.
Enzeco® 碱性蛋白酶 66L	Enzeco Development Corp.
HT- 蛋白水解酶	Deerland Enzymes
BC 胃蛋白酶 3000_P389P-3	Biocatalysts
BC 胃蛋白酶 10000_P389P-10	Biocatalysts
Promod™ 144MG	Biocatalysts
Promod™ 144L	Biocatalysts
Promod™ 144P	Biocatalysts
Promod™ 192P	Biocatalysts
Promod™ 194P	Biocatalysts
Promod™ 278P	Biocatalysts
Promod™ 279P	Biocatalysts
Promod™ 298L	Biocatalysts
Promod™ 439L	Biocatalysts
Promod™ 648L	Biocatalysts
Promod™ 671L	Biocatalysts

[0043] 典型地，将组合使用内肽酶和外肽酶来催化水解反应。通过考虑酶的蛋白酶活性和选择将最大地裂解明胶原材料中肽键的酶，来优选蛋白水解酶。在优选实施方案中，首先将优先具有内肽酶活性的酶添加到明胶溶液中，以形成经内肽酶消化的明胶产物。然后使经内肽酶消化的明胶产物与优先具有外肽酶活性的酶接触，而不会使内肽酶失活。还预期在某些实施方案中，可以在添加具有内肽酶活性的酶之前或同时添加具有外肽酶活性的酶。

[0044] 在一个优选实施方案中，内肽酶选自 Corolase® 7089、Validase® AFP、Validase® FP 500、碱性蛋白酶浓缩物、Validase® TSP、Enzeco® 菠萝蛋白酶浓缩物、木瓜蛋白酶 600L 和不含亚硫酸盐的 Validase® 木瓜蛋白酶浓缩物；外肽酶为 Validase® FP II 或 Corolase® LAP。在还一个实施方案中，内肽酶选自 Corolase® 7089、Enzeco® 菠萝蛋白酶浓缩物和木瓜蛋白酶 6000L；外肽酶选自 Validase® FP II 和 Corolase® LAP。在优选实施方案中，按照下列顺序，将各种蛋白水解酶依次添加到明胶原材料中：Corolase® 7089、Enzeco® 菠萝蛋白酶浓缩物、木瓜蛋白酶 6000L、Validase® FPII 和 Corolase® LAP。在该实施方案的一个替代方案中，各蛋白水解酶将明胶原材料消化约 0.5 至约 2 小时，然后添加后续的蛋白水解酶。

[0045] 添加到水解反应中的蛋白水解酶的量能够并且将根据所需的明胶水解程度和水解反应持续时间而变化。通常，对于持续时间为约 5 小时至约 24 小时的水解反应，添加约 0.025％至约 0.15％ (w/w) 具有内肽酶活性的蛋白水解酶和约 0.025％至约 0.15％ (w/w) 具有外肽酶活性的蛋白水解酶。在优选实施方案中，将约 0.05％至约 0.15％ (w/w) Corolase® 7089、约 0.025％至约 0.075％ (w/w)Enzeco® 菠萝蛋白酶浓缩物、约 0.05％至约 0.15％ (w/w) 木瓜蛋白酶 6000L、约 0.025％至约 0.075％ (w/w)Validase® FPII 和约 0.05％至约 0.15％ (w/w)Corolase® LAP 添加到明胶原材料中。

[0046] 水解反应将典型地进行高至约 24 小时。典型地，在约 24 小时后，从颜色和气味的角度，明胶水解产物的质量将开始显著减少。在另一个实施方案中，水解反应将进行约 1 小时至约 24 小时。在还一个实施方案中，水解反应将进行约 3 小时至约 15 小时。在还更优选的实施方案中，水解反应将进行约 5 小时至约 12 小时。在这段时间内，易于获得高度经济的加工条件和稳定的明胶水解产物质量。在水解反应结束时，可以将经水解的明胶溶液加热到约 90℃，以使蛋白水解酶失活。可能需要额外的步骤来使半胱氨酸蛋白酶失活。如果需要这样做，可以添加过氧化氢或其它氧化剂，通常不超过 1000ppm。然后可以通过本领域公知的任何方式，例如微量过滤，从水解溶液中纯化明胶水解产物。

[0047] 典型地，在本发明方法中明胶原材料的水解程度 (DH) 大于约 13％。在某些实施方案中，DH 为约 10％至约 20％。在其它实施方案中，DH 为约 20％至约 30％。在另一个实施方案中，DH 为约 30％至约 40％。在还一个实施方案中，DH 为约 40％至约 50％。在另一个实施方案中，DH 为约 50％至约 60％。在另外的实施方案中，DH 为约 60％至约 70％。在还另外的实施方案中，DH 为约 70％至约 80％。在还一个实施方案中，DH 为约 80％至约 90％。在还一个实施方案中，DH 大于约 90％。DH 是明胶原材料中已经被蛋白水解酶水解的肽键总数的百分比。可以通过本领域公知的方法计算 DH，例如根据 Adler-Nissen 法 (19)。

[0048] 已经观察到，具有较低平均分子量的明胶水解产物在防止交联过程方面更有效。结果是，可以减少明胶剂型中的水解产物量，从而优化成本。

[0049] II. 明胶水解产物

[0050] 本发明的还一个方面包括由本发明方法制备的明胶水解产物。一般来说，与明胶原材料相比，明胶水解产物将包括不同长度的肽的混合物，其中游离甘氨酸、其它氨基酸和小肽的量增加。与明胶原材料相比，明胶水解产物还将具有较低的平均分子量和较高的伯胺含量。

[0051] 明胶水解产物的平均分子量将典型地为至少约100Da。在其它实施方案中，明胶水解产物的平均分子量将典型地不超过约2000Da。在一些实施方案中，明胶水解产物的平均分子量将为约100Da至约2,000Da。在其它实施方案中，明胶水解产物的平均分子量将为约700Da至约1800Da。在另一个实施方案中，明胶水解产物的平均分子量将为约700Da至约1500Da。在还另外的实施方案中，明胶水解产物的平均分子量将为约800Da至约1200Da。

[0052] 平均分子量为按电喷雾离子化液相色谱质谱(ESI-LC/MS)测量的明胶水解产物重量。例如，平均分子量为约1200Da的明胶水解产物的分子量范围可以为约75Da至约8000Da。

[0053] 通常，明胶水解产物的平均伯胺含量将不小于约1.0×10^{-3}μMol/μg明胶水解产物。在另一个实施方案中，明胶水解产物的平均伯胺含量将不小于约1.5×10^{-3}μMol/μg明胶水解产物。在还一个实施方案中，明胶水解产物的平均伯胺含量将不小于约2.0×10^{-3}μMol/μg明胶水解产物。在另外的实施方案中，明胶水解产物的平均伯胺含量将为约1.0×10^{-3}至约1.0×10^{-2}μMol/μg明胶水解产物。通过衍生和随后的UV吸收(6-8)测量明胶水解产物的伯胺含量，如实施例所示。

[0054] 本发明的明胶水解产物包括多肽，多肽长度典型地为高至约75个氨基酸，优选长度为高至50个氨基酸。在一个实施方案中，明胶水解产物所含的平均多肽长度为约6至约18个氨基酸。在另一个实施方案中，本发明明胶水解产物所含的平均多肽长度为约9至约20个氨基酸。可以通过尺寸排阻色谱/高效液相色谱(SEC/HPLC)间接确定多肽链的长度。

[0055] 在一个实施方案中，明胶水解产物的平均分子量将为约100Da至约2,000Da，平均伯胺含量将为约1.0×10^{-3}至约1.0×10^{-2}μMol/μg明胶水解产物，平均多肽长度将高至约20个氨基酸。在还一个实施方案中，明胶水解产物的平均分子量将为约700Da至约1500Da，平均伯胺含量将为约1.0×10^{-3}至约2.0×10^{-3}μMol/μg明胶水解产物，平均多肽长度将高至约18个氨基酸。在另一个实施方案中，明胶水解产物的平均分子量将为约800Da至约1200Da，平均伯胺含量将为约1.0×10^{-3}至约2.0×10^{-3}μMol/μg明胶水解产物，平均多肽长度将为约4至约18个氨基酸。

[0056] III. 明胶组合物

[0057] 本发明的另一个方面包括含有低分子量明胶水解产物和明胶的明胶组合物。令人惊讶地发现，当低分子量的明胶水解产物与较高分子量的明胶掺混时，通过增加掺混明胶产物中游离甘氨酸、其它氨基酸和小肽的量，该水解产物可以减少明胶的交联并改进溶解性质，如实施例所示。

[0058] 许多不同的明胶水解产物适用于所述明胶组合物。在一个实施方案中，明胶水解产物将为酶消化的水解产物。作为非限制性例子，通过酶水解程序制备本发明的明胶水解产物，如上面的详述。在另一个实施方案中，明胶水解产物将为经酸消化的水解产物。例如，在约110℃的反应温度下，通过用约6N的盐酸将明胶原材料消化约24小时，可以进行酸性水解。在还一个实施方案中，明胶水解产物将为经碱消化的水解产物。作为非限制性例子，

通过用强碱如氢氧化钠消化明胶原材料，可以进行碱水解。酸和碱水解将典型地导致包含游离氨基酸的水解产物。在各实施方案中（即酶、酸和碱水解），在上面的部分 I 中详细描述了合适的明胶原材料，其中描绘了要用于本发明方法的明胶原材料的结构和功能性质。

[0059] 典型地，明胶水解产物将具有低分子量。在一个实施方案中，平均分子量将为约 400Da 至约 2000Da。在另一个实施方案中，平均分子量将为约 700Da 至约 1500Da。此外，明胶水解产物的平均伯胺含量范围还将为约 1.0×10^{-3} 至约 1.0×10^{-2} μMol 伯胺 / μg 明胶水解产物。

[0060] 在另一个实施方案中，平均伯胺含量范围可以为约 1.0×10^{-3} 至约 2.0×10^{-3} μMol 伯胺 / μg 明胶水解产物。

[0061] 在还一个实施方案中，平均伯胺含量范围可以为约 2.0×10^{-3} 至约 4.0×10^{-3} μMol 伯胺 / μg 明胶水解产物。在另一个实施方案中，平均伯胺含量范围可以为约 4.0×10^{-3} 至约 6.0×10^{-3} μMol 伯胺 / μg 明胶水解产物。在还另外的实施方案中，平均伯胺含量范围可以为约 6.0×10^{-3} 至约 1.0×10^{-2} μMol 伯胺 / μg 明胶水解产物。

[0062] 明胶水解产物的平均多肽链长通常还将为约 4 至约 50 个氨基酸。在一个实施方案中，明胶水解产物包括的平均多肽长度高至约 30 个氨基酸。在另一个实施方案中，明胶水解产物包括的平均多肽长度为约 9 至约 20 个氨基酸。按照部分 II 的详述确定平均分子量、平均伯胺含量和平均多肽链长。

[0063] 在优选实施方案中，组合物所用的明胶水解产物将为部分 II 详述的本发明水解产物。可以用于组合物的其它示例明胶水解产物的例子描绘于表 B。也可以使用上述明胶水解产物的混合物。

[0064] 表 B

[0065]

GELITA 明胶水解产物	GELITA 制造位置	原料	分子量	粘度
A-2 型	欧洲	猪皮	2.5-4.5kDa	30-60mP(25% @20℃)
A-3 型	芝加哥	猪皮	2.5-3.0kDa	40-60mP(25% @25℃)
BH-1 型	欧洲	牛皮	2.0-4.0kDa	32-47mP(20% @25℃)
BH-2 型	欧洲	牛皮	2.0-4.0kDa	32-47mP(20% @25℃)
A-5 型	苏城(Sioux City)	猪皮	2.0-4.0kDa	42-71mP(20% @25℃)
BB-1 型	苏城	牛骨	2.0-4.0kDa	42-90mP(20% @25℃)
BB-2 型	苏城	牛骨	2.0-4.0kDa	20-40mP(20% @25℃)

BBH-1 型	欧洲	牛骨 / 皮	2.0-4.0kDa	32-50mP(20% @25℃)
BB-3 型	芝加哥	牛骨	2.0-4.0kDa	30-50mP(20% @25℃)
BB-4 型	芝加哥	牛骨	2.0-4.0kDa	30-50mP(20% @25℃)
BB-5 型	芝加哥	牛骨	2.0-4.0kDa	42-90mP(20% @25℃)
BB-6 型	芝加哥	牛骨	2.0-4.0kDa	42-90mP(20% @25℃)
A-6 型	芝加哥	猪皮	2.0-4.0kDa	30-60mP(20% @25℃)

[0066]

A-7 型	芝加哥	猪皮	2.0-4.0kDa	30-60mP(20% @25℃)
A-8 型	南美	猪皮	2.0-4.0kDa	30-60mP(20% @25℃)
BH-3 型	南美	牛皮	2.0-4.0kDa	30-60mP(20% @25℃)

[0067] 明胶水解产物可以与具有广泛物理和功能性质的几类明胶掺混。对具体明胶的选择能够并将根据明胶组合物的预期用途而显著变化。一般来说，无论实施方案或预期用途如何，明胶都典型地源自胶原或富含胶原的组织，它们获自几种适当的原料如来自动物的皮肤和骨头。在一个实施方案中，明胶为 A 型明胶。在另一个实施方案中，明胶为 B 型明胶。在还一个实施方案中，明胶为 A 型和 B 型明胶的混合物。此外，可以用在酶解过程中制备的明胶代替 A 型和 / 或 B 型明胶。

[0068] 无论实施方案如何，明胶都将优选包含约 80wt％至约 90wt％蛋白质、约 0.1wt％至约 2wt％矿盐（灰分含量）和约 10wt％至约 15wt％水。

[0069] 明胶将典型地具有高平均分子量。在一个实施方案中，明胶的平均分子量将大于约 200,000Da。在另一个实施方案中，明胶的平均分子量将大于约 150,000Da。在还一个实施方案中，明胶的平均分子量将为约 100,000Da 至约 200,000Da。

[0070] 在一个实施方案中，明胶的胶凝强度将为约 50 至约 300，pH 将为约 3.8 至约 7.5，等电点将为约 4.7 至约 9.0，粘度将为约 15 至约 75mP，灰分将为约 0.1 至约 2.0％。

[0071] 在替代实施方案中，当明胶基本上为 A 型明胶时，胶凝强度将为约 50 至约 300，pH 将为约 3.8 至约 5.5，等电点将为约 7.0 至约 10.0，粘度将为约 15 至约 75mP，灰分将为约 0.1 至约 2.0％。

[0072] 在替代实施方案中，当明胶基本上为 B 型明胶时，胶凝强度将为约 50 至约 300，pH 将为约 5.0 至约 7.5，等电点将为约 4.8 至约 5.8，粘度将为约 20 至约 75mP，灰分将为约 0.5 至约 2.0％。

[0073] 在一个优选实施方案中，当明胶组合物用于制造硬胶囊药物产品时，明胶的胶凝强度将为约 200 至约 300，粘度将为约 40 至约 60mP，pH 将为约 4.5 至约 6.5。

[0074] 在还一个优选实施方案中，当明胶组合物用于制造软壳胶囊药物产品时，明胶的胶凝强度将为约 125 至约 200，粘度将为约 25 至约 45mP，pH 将为约 4.5 至约 6.5。

[0075] 本发明的明胶组合物通常将包括约 1wt％至约 20wt％明胶水解产物和约 80wt％至约 99wt％明胶。在另一个实施方案中，明胶组合物将包括约 1wt％至约 5wt％明胶水解产物和约 95wt％至约 99wt％明胶。在还一个实施方案中，明胶组合物将包括约 5wt％至约 10wt％明胶水解产物和约 90wt％至约 95wt％明胶。在另一个实施方案中，明胶组合物将包括约 10wt％至约 15wt％明胶水解产物和约 85wt％至约 90wt％明胶。在另外的实施方案中，明胶组合物将包括约 15wt％至约 20wt％明胶水解产物和约 80wt％至约 85wt％明胶。在典型的实施方案中，明胶组合物将包括比率为约 1 ： 4 至约 1 ： 99(w/w) 的明胶水解产物和明胶。

[0076] 在优选实施方案中，明胶组合物将包括本发明的明胶水解产物和较高分子量的药用级明胶。在一个实施方案中，明胶组合物将包括约 5wt％至约 10wt％明胶水解产物和约 90wt％至约 95wt％药用级明胶。在另一个实施方案中，明胶组合物将包括约 10wt％至约 15wt％明胶水解产物和约 85wt％至约 90wt％药用级明胶。

[0077] 有益地，按照涡旋硬化测试和粘度测试，本发明和本实施方案的明胶组合物典型地具有减少的交联。本实施方案的明胶组合物的涡旋硬化时间典型地为约 200 至约 300 秒。在另一个实施方案中，涡旋硬化时间大于约 300 秒。用于确定涡旋硬化时间的程序描述于实施例中。该实施方案的明胶组合物的平均初始粘度还典型地为约 10 至约 15cP，在约 60℃的反应温度下，在约两小时内，在向明胶组合物中添加少于约 0.5wt％的 [2-(4-二甲基-氨基甲酰基-吡啶并)-乙烷-1-磺酸盐](H.W.Sands Corporation 的 OB1207®) 后，明胶组合物的平均粘度为约 15 至约 50cP。用于测量粘度的程序描述于实施例中。

[0078] 在一个实施方案中，可以将甘氨酸作为独立的化合物添加到本发明的明胶组合物中。可以将约 0.5wt％至约 5wt％甘氨酸添加到明胶组合物中。在更典型的实施方案中，甘氨酸的量将为约 1.5wt％至约 2.5wt％。在还一个实施方案中，可以将柠檬酸添加到明胶组合物中。柠檬酸的添加量可以为约 0.5wt％至约 5wt％。在更典型的实施方案中，将约 0.5％至约 1.5％柠檬酸添加到明胶组合物中。

[0079] 本发明的明胶组合物可以用于几种应用，包括作为食品成分、作为化妆品成分和作为照相成分。因为明胶组合物的交联趋势减少并且溶解性质得到改善，所以在优选实施方案中，使用所述明胶组合物制造药物产品。

[0080] 在一个优选实施方案中，所述明胶组合物用于制造硬明胶胶囊。如上详述，当明胶组合物用于制造硬胶囊药物产品时，明胶的胶凝强度将为约 200 至约 300，粘度将为约 40 至约 60mP，pH 将为约 4.5 至约 6.5。典型的硬明胶胶囊剂型将包括约 30wt％本发明的明胶组合物、约 65wt％水、约 5wt％合适的染料，并且在需要时将包含颜料。可以根据本领域公知的任何方法制备硬明胶胶囊。

[0081] 在还一个实施方案中，明胶组合物用于制造软明胶胶囊。如上详述，当明胶组合物用于制造软壳胶囊药物产品时，明胶的胶凝强度将为约 125 至约 200，粘度将为约 25 至约 45mP，pH 将为约 4.5 至约 6.5。典型的软明胶胶囊剂型将包括约 40wt％至约 45wt％本发明的明胶组合物、约 15wt％至约 35wt％增塑剂和约 20wt％至约 45wt％水。可以根据本领域公知的任何方法制备软明胶胶囊。增塑剂的典型例子为甘油（通常以 85wt％水溶液的形式

使用）和山梨醇（通常以 70wt％水溶液的形式使用）及其混合物。

[0082] 本申请引用的所用出版物、专利、专利申请和其它参考文献均被全文纳入本文以供参考，如同每个单独的公开、专利、专利申请或其它参考文献被具体和单独的声明纳入以供参考。

[0083] 定义

[0084] “两性物”指性质能够为阳离子性和阴离子性两者的物质，例如蛋白质。

[0085] “胶凝值”是按克测量的凝胶坚固程度。胶凝值是限定形式和尺寸的冲头渗入 6.7wt％明胶溶液表面内 4mm 深处所需的力。市售明胶的胶凝值为 80 至 280。

[0086] “骨头屑”指切碎、脱脂并干燥的骨头，然后软化（参见浸渍），从中制得明胶。

[0087] “交联”指例如在药物软胶囊上形成薄皮的机理。典型地，交联会减少胶囊的溶解性质。

[0088] “Da”是道尔顿的简写。

[0089] “EC”是酶分类的简写。它典型地用作酶数字命名的前缀。

[0090] “内肽酶”是典型地属于 EC3.4 子类、即肽水解酶的酶，它水解低聚肽或多肽的非末端肽联接，包括任何酶子类 EC3.4.21-99。

[0091] “外肽酶”是子类 EC3.4 内的一组肽水解酶，它催化与低聚肽或多肽的末端氨基或羧基相邻的肽键水解。该组典型地包括酶子类 3.4.11-3.4.19。

[0092] “食品级酶”是典型地不含基因改性的有机体的酶，在被有机体如人类消费时是安全的。典型地，根据可应用的 FDA 指导原则制备该酶及酶的来源产品。

[0093] “硬胶囊”是由添加或不添加染料的纯明胶制成的各种尺寸的中空胶囊。它们包括上部和下部；一旦完成填充，上部和下部就结合到一起。

[0094] “速溶明胶”是能够在冷水中溶胀的明胶粉末。

[0095] “微凝胶”被认为是分子量大于 300,000Da 的明胶。

[0096] “硬蛋白”是在体内提供支撑功能的那些蛋白质。它们不溶于水并具有纤维性结构。这些蛋白质包括例如存在于毛发和指甲中的角蛋白、存在于支撑和连接组织、皮肤、骨头和软骨中的弹性蛋白和胶原。

[0097] “软胶囊”是由明胶制成的弹性胶囊，用于填充活性成分 / 赋形剂混合物。它们能制成不同的壁厚，具有或没有接缝。

[0098] “Split”是明胶原料；是牛皮连接组织的中层。

[0099] “三股螺旋”是由 3 种蛋白质链组成的胶原基础结构。这些蛋白质通常具有稍微不同的氨基酸序列。

[0100] “A 型明胶”是经酸消化的明胶。

[0101] “B 型明胶”是经碱（碱性）消化的明胶。

[0102] “LBSH 型”是通过蛋白水解消化明胶制备的本发明石灰鞣骨水解产物。

[0103] “LHSH 型”是通过蛋白水解消化明胶制备的本发明石灰鞣革水解产物。

[0104] 由于在不背离本发明范围的情况下，可以对上述化合物、产品和方法进行各种变化，所以希望上面描述和下列实施例中包含的所有内容均应理解为说明而非限制。

[0105] 实施例

[0106] 下列实施例说明了本发明。

[0107] 实施例 1

[0108] 可以根据下列方法制备本发明的明胶水解产物。向 1.0kg 去离子化处理的明胶中加入 1.94kg 水，制备包含 34wt％明胶的溶液（石灰鞣骨明胶 B 型，胶凝强度＝ 100）。将明胶水化 1 小时，然后放到 55℃的水浴中以溶解。一旦完全溶解，就用氢氧化钠水溶液将明胶溶液的 pH 调整到 6.0-6.5。按溶液中明胶的量计 (CDG 市售干明胶（含湿量为约 10wt％），本程序中的所有添加均基于该量），将 0.037％ w/w 氯化钙添加到明胶溶液中。为了测试溶液的氧化还原态，取出等份量并稀释成5wt％。使用过氧化物测试条 (EM Science) 快速测量过氧化物的量。如果存在过氧化物，则以 0.5ml 的增量添加 Fermcolase® 1000F(GenencorInternational Inc.)。在每次添加后，将溶液放置反应 30 分钟，然后重复过氧化物测量。重复添加 Fermcolase® 1000F，直至过氧化物水平接近零。

[0109] 将 0.1％ w/w Corolase® 7089(AB Enzymes) 添加到溶液中。在接近 1 小时反应时间的末尾，在添加下一种酶之前，取出少量样品并分析分子量。对于每次酶添加重复该过程。在 1 小时的反应时间后，添加 0.05％ w/w Enzeco® 菠萝蛋白酶浓缩物 (Enzyme Development Corp.)，使溶液再反应 1 小时。然后添加 0.1％ w/w 液体木瓜蛋白酶 6000L(ValleyResearch)。在 1 小时后，向溶液中添加 0.05％ w/w Validase® FPII(ValleyResearch)，再反应 1 小时。最后添加的酶是 0.1％ w/w Corolase® LAP(ABEnzymes)。在 1 小时后，将溶液加热到 90℃，以使剩余的功能酶失活。在一些情况下，额外添加 30-40ppm 过氧化氢，以确保木瓜蛋白酶 6000L 失活。在加热失活后看不到酶活性的证据。表 1 给出了在水解过程中所用的五种酶的细节摘要。

[0110] 表 1

[0111]

名称	酶类型	来源	最佳范围	供应商
Corolase® 7089	蛋白酶－内肽酶	微生物枯草芽孢杆菌	＜ 60℃ pH5-7.5	AB Enzymes
Enzeco® 菠萝蛋白酶浓缩物	蛋白酶－内肽酶	植物－菠萝	50-60℃ @ pH 5.0 3.0-9.0	Enzyme Development Corp.
木瓜蛋白酶 6000 L	蛋白酶－水解酶－内肽酶	植物－木瓜	65-80℃ pH5.0-7.0	Valley Research
Validase® FPII	蛋白酶－水解酶－外肽酶	微生物－真菌米曲霉	50-60℃ pH5.0-8.0	Valley Research

Corolase® LAP	蛋白酶－纯外肽酶	微生物－豆曲霉	＜70℃ pH6.0-9.0	AB Enzymes

[0112] 将在该实施例中获得的明胶水解产物用作下列实施例中的 LHSH 型水解产物。确定平均分子量为约 1500Da。

[0113] 实施例 2

[0114] 使用下列程序来定量各种明胶组合物的交联减少程度。在对照实验中，将 10.0±0.1g 明胶添加到 250ml 烧杯中，向其中添加 90.0±0.5g 去离子水。将表面皿放到烧杯上，使明胶溶胀 30-60 分钟。将溶胀的明胶在 60±0.1℃的水浴中放置 15-30 分钟，或者直至所有明胶溶解。将磁力搅拌棒放到明胶溶液中，在搅拌盘上，用稀 NaOH 或 H_2SO_4 将 pH 调整到 7.00±0.05，然后除去磁力搅拌棒。将溶液在 40±0.1℃的水浴中放置 15-60 分钟以冷却。使用装配有 4 叶混合器的数字搅拌机 (Heidolph Brinkman 2102)，以产生 750±10RPM 的涡旋。随即，添加 20±0.5ml pH7 磷酸盐缓冲的 10％福尔马林溶液 (Fisher Scientific)。将涡旋硬化时间（秒）记录为当交联的明胶溶液沉淀到 4 叶混合器柄上时的时间。

[0115] 在涉及包含添加剂的明胶组合物的实验中，用所需添加剂代替明胶的百分比（例如 10％添加水解产物的样品包含 9.0g 明胶和 1.0g 水解产物）。相信具有较长涡旋硬化时间的明胶具有减少的甲醛诱导交联趋势。

[0116] 如表 2 所示，涡旋硬化测试证实了前面的发现，即甘氨酸与柠檬酸的组合能够减少明胶交联的量。更重要地，单独添加甘氨酸对这种特定石灰鞣骨明胶样品的涡旋硬化时间具有显著影响。添加柠檬酸盐不能减少交联。

[0117] 惊讶地，在该特定样品中，添加 1.5％柠檬酸盐会促进交联。这些结果可以用于支持甘氨酸在该模型体系中作为醛清除剂的地位。不能容易地解释对仅包含柠檬酸盐的样品之一所经历的交联损害影响。

[0118] 涡旋硬化测试在本文中用作分析工具，来迅速筛选添加剂对明胶组合物的交联行为的影响。

[0119] 表 2

[0120]

样品	样品编号	平均涡旋硬化 (sec)	相对标准偏差
高胶凝强度石灰鞣骨明胶	21	221.07	3.93％
1.5％甘氨酸	6	292.46	4.67％
2.5％甘氨酸	6	342.69	3.43％
0.5％柠檬酸盐	6	218.11	4.21％
1.5％柠檬酸盐	6	177.88	3.97％

2.5％甘氨酸 &0.5％柠檬酸盐	6	346.33	9.63％

[0121] 图 1 详述了添加按照与实施例 1 相似的过程获得的石灰鞣革明胶水解产物 LHSH 型水解产物 (MW ～ 1200Da)、和 BH-3 型明胶水解产物 (MW ～ 2200Da) 对 LH-1 的影响，LH-1 是典型的石灰鞣革明胶，其胶凝强度为 260g，6.67％粘度为 45mP。术语“6.67％粘度”用作以 6.67％ CDG 水溶液观察到的粘度的简写。结果显示对于所添加的两种水解产物，涡旋硬化时间均增加。然而，在添加本发明水解产物 LHSH 型的情况下，效果更好。几种皮革明胶展示出以前仅在 6.67％粘度接近 60mP 的石灰鞣骨明胶中见到的这种非常迅速的交联。

[0122] 表 3 显示几种灰石鞣革明胶的涡旋硬化时间与不同分子量性质的关系。不能推导出结论性的趋势，除了微凝胶百分比和粘度的增加可能与交联增加和随后的涡旋硬化时间减少有关。

[0123] 表 3

[0124]

样品	涡旋硬化 (sec)	胶凝强度 / 粘度 (mP)	MW (Da)	MN (DA)	MZ (DA)	MZ+1 (DA)	多分散性	微凝胶 %
LH-1	8.30	260/45	213,904	52,949	600,246	851,367	4.0398	17.41
LH-2	8.70	229/44	225,257	50,655	629,993	880,268	4.446	18.76
LH-3	8.99	264/48	225,013	61,969	592,328	847,234	3.6311	18.80
LH-4	9.33	240/33	206,317	46,151	620,740	887,725	4.4705	16.46
LH-5	10.85	260/52	232,321	63,612	600,657	852,871	3.6522	18.58
LH-6	34.18	247/48	232,608	63,148	599,777	852,031	3.6836	17.73
LH-7	47.31	263/42	232,384	55,568	635,932	888,496	4.1827	20.00
LH-8	55.49	276/46	247,005	60,234	653,816	897,853	4.1157	22.51
LH-9	186.51	151/40	184,474	45,503	526,119	780,369	4.0541	12.76
LH-10	208.14	239/36	202,601	49,094	579,370	826,045	4.1268	16.28
LH-11	315.30	222/32	175,773	45,076	520,956	779,246	3.8232	12.363

[0125] 表 4 显示将 10％实施例 1 的 LBSH 型水解产物 (平均 MW ＝ 1500)、BB-4 型明胶水解产物和甘氨酸添加到高粘度石灰鞣骨明胶中的结果，该明胶的胶凝强度为 240g，6.67％粘度为 64mP。这种高粘度提取物具有与一些极低粘度的石灰鞣革明胶相似的交联性质。当所有三种添加剂都存在的情况下，这种明胶显示出交联显著减少。然而，与 BB-4 型相比，LBSH 型水解产物可将涡旋硬化时间增加近 30％。甘氨酸显示出最大的交联减少和随后最

大的涡旋硬化时间增加，如表 4 所示。

[0126] 表 4

[0127]

样品	平均涡旋硬化 (sec)	相对标准偏差
高粘度石灰鞣骨对照	28.8	40.1%
对照 w/10% LBSH 型	242.6	5.1%
对照 w/10% BB-4 型	187.7	5.1%
对照 w/10%甘氨酸	＞ 480	N/A

[0128] 表 5 显示通过涡旋硬化测试测量的实验结果，该实验试图确定当添加到中等粘度的石灰鞣骨药用明胶中（胶凝强度＝ 244，6.67%粘度＝ 47.0TnP）时，匹配甘氨酸性能所需的低分子量水解产物量。结果暗示需要 4-5% LBSH 型来匹配 2.5%甘氨酸的性能，而需要 5-6% BB-4 型。类似地，需要 10% LBSH 型和 11-12% BB-4 型来匹配由 5.0%甘氨酸获得的交联减少。

[0129] 表 5

[0130]

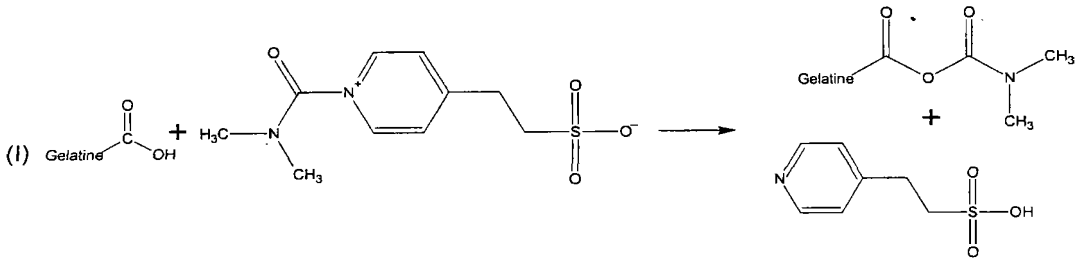
样品	平均涡旋硬化 (sec)	相对标准偏差
中等粘度的灰石鞣骨对照	192.5	11.1%
w/2.5%甘氨酸	307.8	3.1%
w/5.0%甘氨酸	506.5	3.9%
w/4.0% LBSH 型	281.5	2.1%
w/5% LBSH 型	356.7	2.7%
w/7.5% LBSH 型	395.9	3.7%
w/10% LBSH 型	492.2	4.0%

w/5% BB-4 型	295.8	3.1%
w/6% BB-4 型	323.7	0.4%
w/7.5% BB-4 型	339.6	0.2%
w/10.0% BB-4 型	434.0	2.4%
w/11.0% BB-4 型	483.6	3.6%
w/12.0% BB-4 型	519.9	3.7%

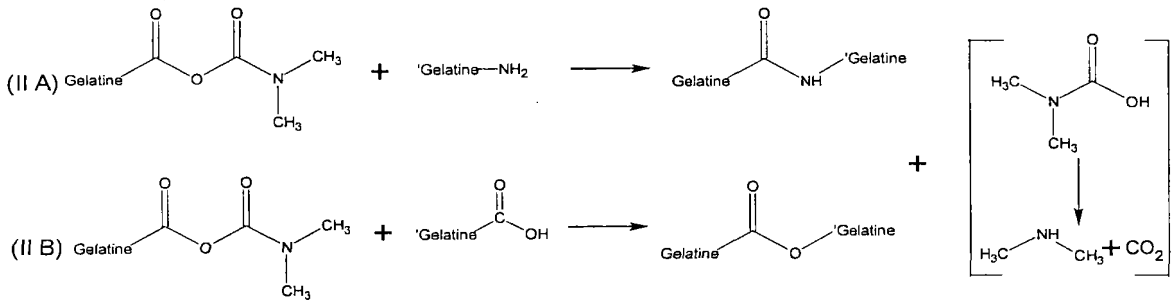
[0131] 实施例 3

[0132] 从 H.W.Sands Corporation 获得明胶硬化剂 OB1207® [2-(4- 二甲基氨基甲酰基 - 吡啶并)- 乙烷 -1- 磺酸盐]。在照相乳液中，OB1207® 已经被吹捧为甲醛的替代物。反应 1 描述了 OB1207® 与明胶的交联。通过与 OB1207® 的反应，在明胶链之间形成酰胺和酯键可以近似地模仿在如下明胶样品中见到的交联类型，由于暴露于极端的高热和高湿，所述样品已经老化和 / 或受压。

[0133]



[0134]



[0135] 反应 1(gelatine :明胶)

[0136] 在对照实验中，将 15.0±0.1g 明胶 (石灰鞣骨明胶 B 型，胶凝强度 = 200) 添加到 250ml 烧瓶中。向其中添加 95.0±0.5g 去离子水，添加磁力搅拌棒。用石蜡膜盖住明胶，使其溶胀 30-60 分钟。将烧瓶在 60±1.0℃的水浴中放置 15-20 分钟，或者直至所有明胶溶解。使用 BrookfieldDV-III+ 流变仪，在 50RPM 和 60.0±0.1℃测量该溶液的粘度。在搅拌盘上搅拌的同时，将由 0.30g OB1207® 溶于 10.0g 去离子水制得的溶液缓慢添加到烧瓶内

的明胶中。将烧瓶放回水浴中。2 小时后测量溶液的粘度。在包含水解产物添加剂的实验中，用所需水解产物代替对照明胶的百分比（即 10％添加水解产物的样品包含 13.5g 明胶和 1.5g 水解产物）。

[0137] 表 6 给出了在与 OB1207 ® 交联后，具有中等胶凝强度和粘度的明胶 (LB-1) 的粘度实验结果。对照 A LB-1 没有添加水解产物或 OB1207 ®，而对照 B LB-1 不包含水解产物，但用 OB1207 ® 交联过。两小时后，对照 B 太粘而不能在 Brookfield 流变仪上读数，这暗示非常高的交联程度。包含水解产物的样品显示交联程度减少，其中本发明的水解产物 LBSH 型获得了最佳结果，尤其在 10％的水平下。

[0138] 表 6

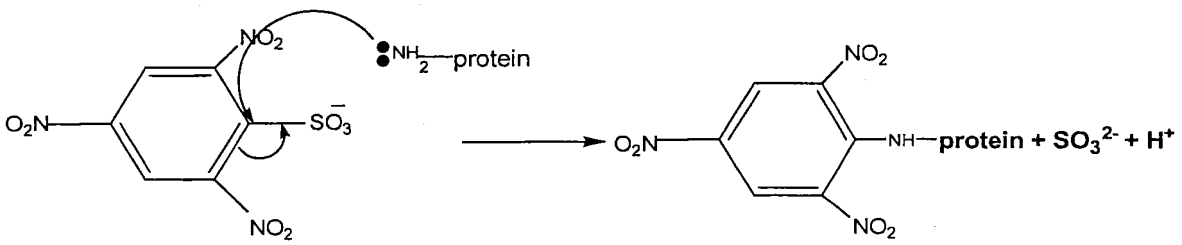
[0139]

样品	平均初始粘度 (cP)	平均最终粘度 (cP)
对照 A LB-1	16.2	16.5
对照 B LB-1（无添加剂）	15.9	73.5
w/5％ LBSH 型	13.2	48.6
w/5％ BB-4 型	13.2	53.2
w/5％ BB-1a 型	14.4	69.0
w/5％ BB-1b 型	13.2	62.4
w/10％ LBSH 型	12	31.2
w/10％ BB-4 型	11.2	39.8
w/10％ BB-1a 型	12.6	57.4
w/10％ BB-1b 型	12	46.8

[0140] 实施例 4

[0141] 下列程序用于确定明胶水解产物中的伯胺含量。Alder-Nissen 描述了使用三硝基苯磺酸 (TNBS) 来测量伯胺的量 (6)。使用该程序的改良版本来测量明胶水解产物中的伯胺相对量。反应 2 示意用 TNBS 衍生伯胺。

[0142]



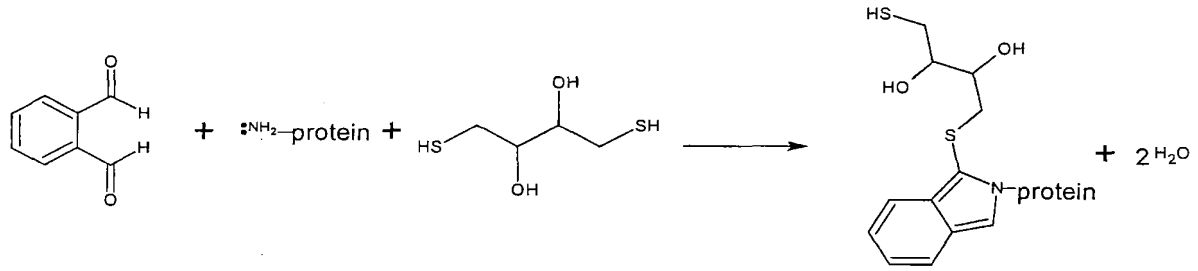
[0143] 反应 2(protein :蛋白质)

[0144] 将 2.000±0.002g 甘氨酸 (Acros) 添加到 250ml 烧杯中，使用 1％十二烷基硫酸钠 (“SDS”, Aldrich) 溶液使重量达到 200.00±0.01g(该甘氨酸溶液称为 G-1)。将 4.000±0.002g 明胶水解产物添加到 250ml 烧杯中，使用 1％ SDS 溶液使重量达到 100.00±0.01g(该水解产物溶液称为 H-1)。将包含 G-1 和 H-1 溶液的烧杯放置到电热板上，加热到 80-85℃的温度，以完全溶解和分散固体。将溶液冷却到室温，然后将 1.00g G-1 添加到 250ml 烧杯中，使用 1％ SDS 溶液使重量达到 200.00±0.01g(G-2)。通过分别添加 50、37.5、25、12.5、5 和 0.5ml G-2，在 50ml 容量瓶中制备 G-2 的稀释液 (G-3 标准液)。通过使用 1％ SDS 溶液，将烧瓶稀释至刻度。在 250ml 烧杯中，通过添加 1.00g H-1 并使用 1％ SDS 溶液使其重量达到 200.00±0.01g，将 H-1 溶液稀释以产生 H-2。向 15ml 试管中添加 2ml 0.2125M 磷酸盐缓冲液 (通过将 0.2125M NaH_2PO_4 添加到 0.2125 M Na_2HPO_4 中，直至达到 pH 8.20±0.02 而制得) 和 250μl G-3 标准液。这相当于六个标准甘氨酸基准，每个样品分别包含 0.1667、0.1250、0.0833、0.0417、0.0167 和 0.0017μmole 伯胺。类似地，将 250μl 各 H-2 溶液与 2ml 磷酸盐缓冲液添加到 15ml 试管中 (相当于 50μg 样品)。通过将 250μl 1％ SDS 溶液和 2ml 缓冲液添加到 15ml 试管中，制备对照样品。通过将 170±2μl 1M TNBS 溶液 (Sigma) 添加到 50ml 容量瓶中，用去离子水稀释至刻度，立即用铝箔盖住 (因为 TNBS 对光敏感)，来制备 0.1％三硝基苯溶液。

[0145] 下列所有步骤均在照相暗室中进行。向试管中添加 2ml 1％ TNBS 溶液。然后将试管涡旋 (Fisher Scientific Vortexgenie 2)5 秒。然后将样品在 50.0±0.1℃的水浴中放置 30 分钟。然后将样品再涡旋 5 秒，再在水浴中放置 30 分钟。从水浴中取出样品，添加 4ml 0.100N HCl 溶液以终止 TNBS 反应。将溶液涡旋 5 秒，冷却 10 分钟 (较长的冷却可能导致由 SDS 所致的混浊)。以水为空白，在 340nm(Beckman DU-7 分光光度计) 处读取各样品的吸光度。通过使用甘氨酸标准液的吸光度线性回归计算，计算样品中的伯胺量。

[0146] Church 等人描述了用邻苯二甲醛 (OPA) 衍生伯胺来测量牛奶蛋白的蛋白水解 (7)。Nielsen 等人 (8) 使用 OPA 来测量其他食品蛋白、包括明胶蛋白的水解程度。Nielsen 方法的优点是用更环境友好的二硫苏糖醇 (DTT-Cleland 试剂) 代替 β－硫基乙醇作为含硫还原剂。本程序改编自 Nielson 等人的工作。反应 3 示意在 DTT 存在的情况下，伯胺与 OPA 的反应。

[0147]



[0148] 反应 3(protein :蛋白质)

[0149] 通过将 7.620g 四硼酸钠十水合物 (Fisher Scientific) 和 200mg SDS 添加到 200ml 容量瓶中,制备 OPA 试剂。添加约 150ml 去离子水,搅拌溶液直至完全溶解。将 160mg OPA(Aldrich) 溶于 4ml 乙醇 (FisherScientific) 中,使用去离子水定量转移至容量瓶中。添加 176mgDTT(Aldrich),用去离子水将全部溶液稀释到体积。通过将 50mg 甘氨酸添加到 500ml 容量瓶中并用去离子水稀释至刻度,产生甘氨酸标准液。通过将 100、75、50、25 和 5ml 甘氨酸溶液添加到 100ml 容量瓶中并用去离子水填充至刻度,制备稀释液,从而产生 5 个甘氨酸标准液。通过将 0.500g 水解产物添加到 100ml 容量瓶中并添加去离子水至刻度,制备明胶水解产物样品。向另一个 100ml 容量瓶中添加 10ml 水解产物溶液并用去离子水填充至刻度。向 15ml 试管中添加 3.0ml OPA 试剂溶液,然后添加 400μl 甘氨酸标准液 (得到 40、30、20、10 和 2μg 甘氨酸) 或明胶水解产物样品 (200μg 水解产物)。还使用 400μL 水作为对照样品来测量单独 OPA 的吸光度。将样品涡旋 5 秒。在添加样品后恰好 2 分钟时,相对于水空白读取吸光度。偏离 2 分钟的要求会显著影响吸光度。然后以两分钟的间隔测定各样品或标准液。通过使用甘氨酸标准液的吸光度线性回归计算来计算样品中的伯胺量。

[0150] 表 7 和表 8 显示在 6 种明胶水解产物、第一提取明胶、甘氨酸三聚体和赖氨酸单体中,TNBS 和 OPA 对伯胺的衍生结果。将水解程度报告为伯胺量除以 HCl 水解样品 (6N HCl 24 小时,110℃) 的伯胺数目。TNBS 和 OPA 衍生物的分子量是每个样品量中伯胺量的倒数。认为 TNBS 和 OPA 衍生物的分子量仅仅是定性的,真正的显著性是各样品中的伯胺测得量。伯胺衍生物的分子量不考虑赖氨酸和羟基赖氨酸的双衍生,也不考虑如下事实,即仲胺没有被任一衍生试剂衍生。然而,当假设这些因素对所有明胶水解产物相对稳定时,伯胺衍生物的分子量可用于比较各种不同明胶水解产物类型的相对水解程度。与其他酶消化的水解产物相比,显示 LBSH 型和 LHSH 型,即本发明的石灰鞣骨和石灰鞣革水解产物的伯胺平均增加近 30-130%。还给出了由 SEC/HPLC 方法测得的平均分子量。要注意赖氨酸和甘氨酸三聚体的分子量距离已知分子量值很远。TNBS 和 OPA 衍生物的分子量还非常相似于 HCl 水解明胶样品的期望值,尽管 HPLC/SEC 数据几乎为该量的 5 倍。这证明通常用于测量明胶水解产物分子量的低分子量 SEC/HPLC 方法的相对不精确性。明胶并不考虑 TNBS 和 OPA 衍生物的分子量。明胶大分子的络合物阻止使用这种简化模型来精确描绘分子量。与用 TNBS 衍生相比,证实 OPA 衍生是用于测量伯胺含量的更可靠方法。

[0151] 表 7

[0152]

样品	平均伯胺 μMol/μg		相对标准偏差		水解程度		平均衍生物分子量 (Da)		
	TNBS	OPA	TNBS	OPA	TNBS	OPA	TNBS	OPA	SEC
LBSH 型	1.05E-03	1.10E-03	11.7%	2.8%	14.1%	14.5%	952	911	~ 1800
LHSH 型	1.02E-03	1.07E-03	13.7%	1.3%	13.7%	14.1%	980	936	---
BB-4 型	7.52E-04	8.56E-04	18.6%	2.6%	10.1%	11.3%	1330	1169	~ 1900
BB-1a 型	4.53E-04	4.91E-04	46.8%	2.4%	6.1%	6.5%	2209	2035	~ 3000
BB-1b 型	5.26E-04	5.54E-04	30.8%	2.0%	7.1%	7.3%	1902	1805	~ 3500
明胶	2.31E-04	3.39E-04	2.3%	1.0%	3.1%	4.5%	---	---	---
HCl 水解产物	7.43E-03	7.57E-03	5.3%	0.7%	100.0%	100.0%	135	132	~ 750
Gly-Gly-Gly	3.66E-03	4.98E-03	13.3%	0.7%	---	---	273	201	~ 800
赖氨酸	6.43E-03	5.85E-03	10.1%	0.7%	---	---	156	171	~ 900

[0153] 表 8

[0154]

样品	伯胺与 HCl 水解产物的比率	伯胺与 LBSH 型的比率	伯胺与明胶的比率

	TNBS	OPA	TNBS	OPA	TNBS	OPA
LBSH 型	0.14	0.14	1.00	1.00	4.56	3.24
LHSH 型	0.14	0.14	0.97	0.97	4.43	3.15
BB-4 型	0.10	0.11	0.72	0.78	3.26	2.52
BB-1a 型	0.06	0.06	0.43	0.45	1.96	1.45
BB-1b 型	0.07	0.07	0.50	0.50	2.28	1.63
明胶	0.03	0.04	0.22	0.31	1.00	1.00
HCl 水解产物	1.00	1.00	7.08	6.90	32.24	22.34

[0155] 参考文献

[0156] 在为本文所列内容提供示例的、程序的或其他细节补充的范围内，本申请上文或下列参考文献列表中引用的所有参考文献均被明确纳入本文以供参考，如同每个单独的公开或专利申请被具体和单独地声明纳入本文以供参考。

[0157] 1.Ofner，CM.，Zhang，Y.，Jobeck，V.，Bowman，B.，“用甲醛处理的明胶胶囊和暴露于高温和高湿的胶囊的交联研究”(Crosslinking Studiesingelatin Capsules Treated with Formaldehyde and in Capsules Exposed toElevated Temperature and Humidity). J.Pharm.Sci.，Jan.2001，90(1)：79-88.

[0158] 2.Singh，S.，Rama Rao，K.V.，Venugopal，K.Manikandan，R.，“溶解特性：问题、实验方法和解决方法的综述”(Dissolution Characteristics：A Review of the Problem，Test Methods，and Solutions).PharmaceuticalTechnology.Apr.2002；36-58.

[0159] 3.Adesunloye，T.A.，Stach，P.E.，“甘氨酸/柠檬酸对硬明胶胶囊的溶解稳定性的影响”(Effect of glycine/Citric Acid on the DissolutionStability of Hardgelatin Capsules).Drug Dev.Ind.Pharm.，1998，24(6)，493-500.

[0160] 4.Rama Rao，K.V.，Pakhale，S.P.，Singh，S.，“用于稳定明胶制剂来对抗交联的膜方法”(A film Approach for the Stabilization of gelatinPreparations Against Cross-Linking).Pharmaceutical Technology.Apr.2003：54-63.

[0161] 5.Fraenkel-Conrat，H.，Olcott，H.，“甲醛与蛋白质的反应 II. 胍基的参与和交联的证据”(Reaction of Formaldehyde with Proteins.II.Participation of guanidyl groups and Evidence of Crosslinking).J.Am.Chem.Soc，Jan.1946，68(1)：34-37.

[0162] 6.Adler-Nissen，J.，“通过三硝基苯磺酸确定食用蛋白水解产物的水解程度”(Determination of the Degree of Hydrolysis of Food ProteinHydrolysates by Trinitrobenzene Sulfonic Acid)，J.Agric.Food Chem.，Nov.-Dec.1979，27(6)：1256-62.

[0163] 7.Church,F.,et al,“使用邻苯二甲醛确定牛奶和分离牛奶蛋白中蛋白质水解的分光光度法测定”(Spectrophotmetric Assay Usingo-phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and IsolatedMilk Proteins).J.of Dairy Sd.,1983,66(6):1219-1227.

[0164] 8.Nielsen,P.M.,Petersen,D.,Dambmann,C,“用于确定食用蛋白水解程度的改进方法”(Improved Method for Determining Food ProteinDegree of Hydrolysis).J.of Food Sd.,2001,66(5):642-646.

[0165] 9.Fraenkel-Conrat,H.,Cooper,M.,Olcott,H.,“甲醛与蛋白质的反应”(The Reaction of Formaldehyde with Proteins).J.Am.Chem.Soc,Jun.1945,67(6):950-954.

[0166] 10.Fraenkel-Conrat,H.,Olcott,H.,“甲醛与蛋白质的反应V.氨基与伯酰胺或胍基的交联”(The Reaction of Formaldehyde with Proteins V.Cross linking between Amino and Primary Amide orguanidyl groups).J.Am.Chem.Soc,Aug.1948,70(8):2673-2684.

[0167] 11.Ward,A.g.,Courts,A.,The Science and Technology of gelatin.Academic Press Inc.1977,pp.231.

[0168] 12.Davis,P.,Tabor,B.,“甲醛和乙二醛交联明胶的动力学研究”(Kinetic Study of the Crosslinking of gelatin by Formaldehyde andglyoxal).J.Polym.Sd.Part A.,1963,1:799-815.

[0169] 13.Albert,K.,Peters,B.,Bayer,E.,Treiber,U.,Zwilling,M.,“明胶与甲醛的交联;13CnmR研究”(Crosslinking of gelatin withFormaldehyde;a 13CnmR Study).Z.Naturforsch.,1986,41b:351-358

[0170] 14.gold,T.B.等人,“使用核磁共振研究pH和胰酶对^{13}C甲醛诱导的明胶交联的影响”(Studies on the Influence of pH and Pancreatin on13C-Formaldehyde-Induced gelatin Cross-Links Using Nuclear MagneticResonance).Pharm.Dev.Tech.,1996,1(1):21-26.

[0171] 15.Matsuda,S.,Iwata,H.,Se,N.,Ikada,Y.,“用戊二醛交联的生物粘附明胶薄膜”(Bioadhesion of gelatin Films Crosslinked withglutaraldehyde).J Biomed Mater.Res.Apr.1999;45(1):20-7.

[0172] 16.Jiskoot,W.等人,“甲醛诱导的蛋白质变性的鉴别:与模型肽反应”(Indentification of Formaldehyde-induced Modifications in Proteins:Reaction with Model Peptides).J.Bio.Chem.,Feb.2004,279(8):6235-6243.

[0173] 17.Digenis,g.A.,gold,T.B.,Shah,V.P.,“明胶胶囊的交联及其与体外-体内行为的相关性”(Cross-Linking of gelatin Capsules and itsRelevance to Their in Vitro-in Vivo Performance).J.Pharm.Sci.,July1994,83(7):915-921.

[0174] 18.Nagaraj,R.H.,Shipanova,I.N.,Faust,F.M.,“通过美拉反应交联蛋白质”(Protein Cross-Linking by the Maillard Reaction).J.Biol.Chem.,Aug.1996,271(32):19338-19345.

[0175] 19.“食用蛋白的酶水解”(Enzymic Hydrolysis of Food Proteins);Elsvier Applied Science Publishers Ltd.(1986),122页.

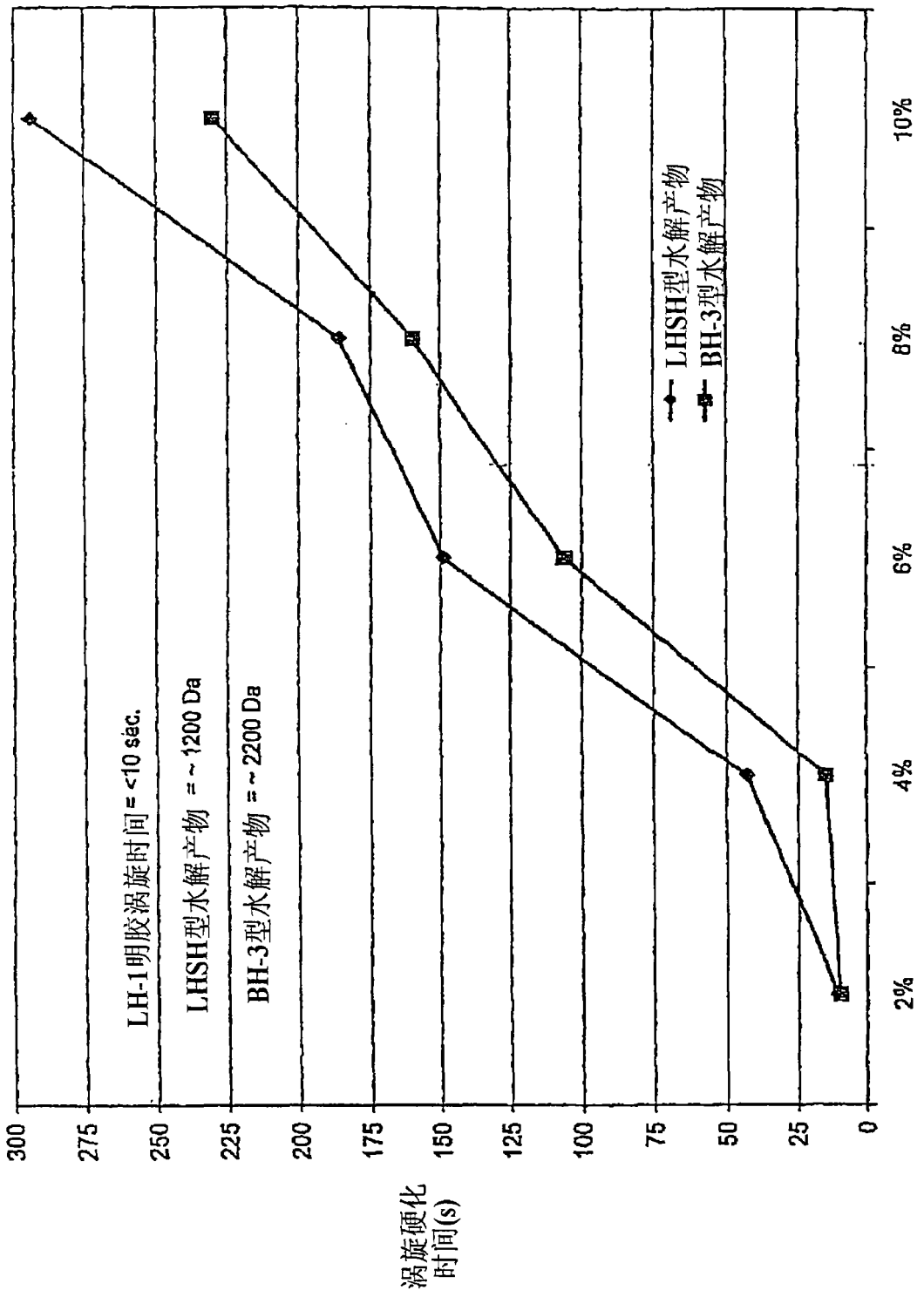

LH-1明胶涡旋时间 = <10 sec.
LHSH型水解产物 = ~ 1200 Da
BH-3型水解产物 = ~ 2200 Da
涡旋硬化的时间(s)
300
275
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
2%
4%
6%
8%
10%
刺状(spiked)水解产物的量
LHSH型水解产物
BH-3型水解产物

图1