

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A23L 1/304

A23G 1/00 A23J 3/34

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00807029.6

[43] 公开日 2002 年 5 月 15 日

[11] 公开号 CN 1349386A

[22] 申请日 2000.3.1 [21] 申请号 00807029.6

[30] 优先权

[32] 1999.3.1 [33] US [31] 60/122,289

[86] 国际申请 PCT/EP00/01743 2000.3.1

[87] 国际公布 WO00/51447 英 2000.9.8

[85] 进入国家阶段日期 2001.10.31

[71] 申请人 雀巢制品公司

地址 瑞士沃韦

[72] 发明人 A·舍尔 M·R·雅各布森

C·R·马兰吉 D·V·瓦德拉

E·R·维德拉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 杨九昌

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 铁强化体系

[57] 摘要

一种可以用于增强食品和饮料中铁含量的铁-蛋白水解复合物。该复合物由与部分水解的卵清蛋白整合的亚铁离子形成。所述的水解卵清蛋白的分子量范围大约为 500-10,000。当被适当地应用于灭菌产物例如加热提纯产物时,该复合物十分稳定。再者,除了稳定性外,复合物中的铁基本上与硫酸亚铁具有相同的生物利用度。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1.一种铁-蛋白水解复合物,该复合物包括与具有分子量范围大约为 500-10 000 的部分水解卵清蛋白整合的亚铁离子。

2.一种根据权利要求 1 所述的复合物,其中所述的部分水解卵清蛋白拥有的分子量范围大约为 2 000-6 000。

3.一种根据权利要求 1 所述的复合物,其中所述的部分水解卵清蛋白是微生物蛋白酶的水解物。

4.一种根据权利要求 3 所述的复合物,其中所述的微生物蛋白酶从米曲霉中获得并含有内肽酶和外肽酶。

5.一种根据权利要求 1 所述的复合物,其中所述的部分水解卵清蛋白是微生物蛋白酶的水解物,该水解物通过用一种从米曲霉中获得并含有内肽酶和外肽酶的蛋白酶,和一种从地衣芽孢杆菌中获得并含有内肽酶的蛋白酶,水解卵清蛋白得到。

6.一种根据权利要求 1 所述的复合物,该复合物含有以干重计,大约为 1%-2%或大约为 4.5%-10%的亚铁离子。

7.一种根据权利要求 1 所述的复合物,该复合物在中性的 pH 中稳定,但在低于 3 的 pH 中解离。

8.一种铁-蛋白水解复合物,该复合物包含与部分水解卵清蛋白整合的亚铁离子,所述的水解卵清蛋白是一种微生物蛋白酶的水解物,微生物蛋白酶为内肽酶和外肽酶。

9.一种根据权利要求 8 所述的复合物,其中该部分水解卵清蛋白拥有的分子量范围大约为 500-10 000。

10. 一种根据权利要求 9 所述的复合物,其中该部分水解卵清蛋白拥有的分子量范围大约为 2 000-6 000。

11. 一种根据权利要求 8 所述的复合物,该复合物含有以干重计,大约为 1%-2%或大约为 4.5%-10%的亚铁离子。

12. 一种根据权利要求 8 所述的复合物,该复合物在中性的 pH 中稳定,但在低于 3 的 pH 中解离。

13. 一种铁-蛋白水解复合物,该复合物包含与部分水解卵清蛋白整合的亚铁离子;该复合物含有以干重计,大约为 1%-2%或大约为 4.5%-10%的亚铁离子。

14. 一种根据权利要求 13 所述的复合物,其中该部分水解卵清

蛋白拥有的分子量范围大约为 500-10 000。

15. 一种根据权利要求 13 所述的复合物，其中该部分水解卵清蛋白拥有的分子量范围大约为 2 000-6 000。

16. 一种根据权利要求 13 所述的复合物，其中所述的部分水解卵清蛋白是微生物蛋白酶的水解物。

17. 一种根据权利要求 13 所述的复合物，其中所述的真菌蛋白酶含有内肽酶和外肽酶。

18. 一种根据权利要求 13 所述的复合物，该复合物在中性的 pH 中稳定，但在低于 3 的 pH 中解离。

10 19. 一种灭菌的液体饮料，该饮料含有脂和稳定的铁强化体系，所述的铁强化体系包括一种与部分水解的卵清蛋白螯合的亚铁离子的铁-蛋白水解复合物。

20. 一种根据权利要求 19 所述的饮料，该饮料是含巧克力的饮料。

15 21. 一种灭菌的液体饮料，该饮料含有多酚和稳定的铁强化体系，所述的铁强化体系包括一种与部分水解的卵清蛋白螯合的亚铁离子的铁-蛋白水解复合物。

22. 一种根据权利要求 21 所述的饮料，该饮料是茶饮料。

20 23. 一种饮料粉末，该饮料粉末含有脂和稳定的铁强化体系，所述的铁强化体系包括一种与部分水解的卵清蛋白螯合的亚铁离子的铁-蛋白水解复合物。

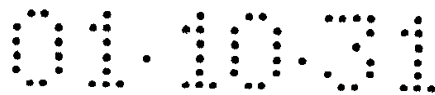
24. 一种根据权利要求 23 所述的饮料粉末，该饮料粉末含有可可。

25. 一种制备铁强化体系的方法，该方法包括：

25 用一种微生物蛋白酶酶水解卵清蛋白，以提供部分水解的卵清蛋白；

在酸性条件下，把亚铁源加到部分水解的卵清蛋白中；然后

提高 pH 到 6.5-7.5，形成一种作为铁强化体系的水解卵清蛋白亚铁复合物。



说明书

铁强化体系

发明领域

5 本发明描述一种基于卵清蛋白的水解物，可以用于食品和饮料的铁强化体系。本发明也描述一种制备该体系的方法以及以铁强化食品和饮料。

发明背景

10 铁是一种动物和人类营养必需的微量元素。它是血红蛋白中血红素的组分，并且是肌红蛋白、细胞色素和几种酶类的组分。铁的主要作用是参与氧的运输、储存和利用。铁不足是贫血高发的主要原因，尤其在儿童、青少年和妇女更为常见。对足量铁的需求贯穿于人的一生中。

15 不过，人体不产生铁，完全依赖于外源铁如营养和添加剂的供给。一般来说，推荐的每天铁吸收允许量大约是每天 10 mg。不过，需要量还依赖于年龄和性别。儿童、过了绝经期的妇女和怀孕及哺乳的母亲对铁有更高的需求。

20 因此，铁缺乏基本上是营养问题，这不仅仅是发展中国家普遍的问题。该问题容易通过天然提供适量铁的消费食品解决，但在不发达社会中经常是不可能的。另外，一般在发达国家消费的许多食品也含铁不足。

25 为提供铁源，许多食品和饮料添加铁。一般来说，添加时所用的铁源是可溶的铁盐，如硫酸亚铁、乳酸亚铁、葡萄糖酸亚铁、富马酸亚铁、柠檬酸铁、柠檬酸胆碱铁和柠檬酸铁铵。尤其是硫酸亚铁因其良好的生物利用度，应用更为普遍。不幸的是，铁添加物特别是硫酸亚铁添加物，具有有害的影响。尤其是，由于能与多酚和脂类相互作用并促进破坏性自由基反应，铁经常引起脱色和丧失味道。这种情况特别在高温以及氧和光线的存在下出现。

30 例如，把可溶性铁源加到巧克力奶粉中，当用水或奶重新溶解时，引起该饮料变成暗灰色。一般认为，这是因为铁与铁敏感的成分如多酚相互作用引起的。而且，把可溶性铁源加到奶、谷物和其他含脂肪的产品中，最常见的是含高水平的不饱和脂肪酸的产品，由于脂

质氧化引起味道的改变。脂质氧化不仅影响食品和饮料的味觉感受特性，而且还令人讨厌地影响这些产品的营养质量。在热处理如巴氏灭菌法或灭菌法中，也能加强这些相互作用。此外，某些铁盐体系的 pH 可能不和其他成分兼容，或者可能影响味道。另外，从技术观点来看，可溶性铁盐能引起处理设备的腐蚀。

不幸的是，不溶或轻微可溶的铁源，例如元素铁、焦磷酸铁，生物利用度不够。因此，尽管它们可能微弱或不引起脱色和丧失味道的问题，但它们很难被人体吸收。

为了解决这些问题，已经出现几种囊化或复合可溶铁源的方法，这些方法降低它们的反应性但仍保留其生物利用度。不过，这些方法没有完全取得成功。

在美国 3,992,555 号专利中，描述了囊化铁源的一个实施例，在该专利中，用一种可食用能代谢的脂肪包被铁，该脂肪的熔点大约为 38-121℃。氢化并精制的植物油，尤其是来自完全氢化棉子油的提取单酸甘油酯，据描述适用该方法。尽管这种铁的囊化方法导致了其生物利用度降低大约 20%，假如所用的铁源具有足够良好生物利用度，据述该方法是可以接受的。不过，主要问题是，如果食品必须经过任何形式的粗级处理，就会毁坏所述的包囊。结果，该囊化铁不能用于需要提纯或进行其它形式粗级处理的产品中。

铁复合体的一个早期实施例在美国专利 505,986 号中有描述。该复合物是一种铁白蛋白制备物。所述的白蛋白是完整但热凝结的形式。该复合物作为沉淀物重新获得。不过，当这些铁白蛋白复合物被用于饮料时，确实发生了脱色和氧化。例如，用铁白蛋白复合物增强的巧克力饮料变成灰色。

在美国 3,969,540 号专利中，描述了铁复合物的最近实施例，在该专利中，以亚铁形式的铁与水解酪蛋白或水解肝粉复合。也提到了作为可能配体的各种其他水解蛋白。所述的复合物作为不可溶的沉淀物收集。令人遗憾的是，在该复合物中的铁不可能具有可接受的生物利用度。

在美国 4,172,072 号专利中，进一步描述了铁复合物的实施例，在该专利中，铁与基本上完全水解的胶原复合。也提到了作为可能配体的各种其他水解蛋白。不过，据述该复合物在酸性条件下稳定；由

于在食道中是酸性的，该复合物中的铁不可能具有可接受的生物利用度。此外，该复合物不足以防止脱色和脂质氧化。

在美国 4,216,144 号专利中，进一步描述了实施例，在该专利中，亚铁形式的铁与水解蛋白尤其是大豆蛋白复合。在该复合物中，铁生物利用度据称比硫酸亚铁更好。不过，当把该大豆水解物亚铁复合物用于饮料时，确实发生了脱色和氧化。例如，用大豆水解物亚铁复合物增强的巧克力饮料变成灰色。

在日本 2-083333 和 2-083400 号专利申请书中，描述了铁复合物的其他实施例。在这些申请书中，酪蛋白化的亚铁复合物被用于治疗贫血。不过，这些复合物不适用于强化食品和饮料，因为它们不够稳定。此外，这些复合物是凝结物的形式，难以分散。

因此，本发明的目的是提供一种铁强化体系，该体系相对稳定但其中的铁具有相对的生物利用度。

本发明概述

因此，在一方面，本发明提供一种铁-蛋白水解复合物，该复合物包括与分子量范围大约为 500-10 000 的部分水解卵清蛋白螯合的亚铁离子。

令人惊奇地发现，来自以亚铁形式的铁与部分水解的卵清蛋白形成的复合物非常稳定。事实上，所述的复合物足够稳定，适用于含脂类和多酚的甾馏 (retorted) 提纯产品中。不过，尽管具有稳定性，复合物中的铁基本上与明显良好的硫酸亚铁相同的生物利用度。

优选地，部分水解卵清蛋白拥有的分子量范围大约为 2 000-6 000。

在另一方面，本发明提供一种铁-蛋白水解复合物，该复合物包括与用微生物蛋白酶部分水解的卵清蛋白螯合的亚铁离子。

优选地，所述的微生物蛋白酶是一种从米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 中获得的，含有内肽酶和外肽酶的真菌蛋白酶。

在另一方面，本发明提供一种铁-蛋白水解复合物，该复合物包括与部分水解的卵清蛋白螯合的亚铁离子。所述的复合物含有干重大约为 1%-2% 或大约为 4.5%-10% 的亚铁离子。

优选地，该复合物在中性的 pH 中稳定，但在低于 3 的 pH 中解离。

仍是另一方面，本发明提供一种含脂和稳定的铁强化体系的无菌

液体饮料，所述的铁强化体系包括一种与部分水解的卵清蛋白螯合的亚铁离子的铁-蛋白水解复合物。所述的饮料可以是含巧克力的饮料。

5 仍是另一方面，本发明提供一种含多酚和稳定的铁强化体系的无茵液体饮料，所述的铁强化体系包括一种与部分水解卵清蛋白螯合的亚铁离子的铁-蛋白水解复合物。所述的饮料可以是茶饮料。

所述的饮料可以甾馏提纯法或超高温巴氏灭菌法灭菌。

10 本发明也提供一种含脂和稳定的铁强化体系的饮料粉末，所述的铁强化体系包括一种与部分水解的卵清蛋白螯合的亚铁离子的铁-蛋白水解复合物。所述的饮料粉末可以含有巧克力。

在进一步方面，本发明提供一种制备铁强化体系的方法，该方法包括：

优选地在酸性条件下，用微生物蛋白酶优选的是酸性真菌蛋白酶，酶水解卵清蛋白，以提供部分水解的卵清蛋白；

15 在酸性条件下，把亚铁源加到部分水解的卵清蛋白中；然后提高 pH 到 6.5-7.5，形成一种作为铁强化体系的水解卵清蛋白亚铁复合物。

20 部分水解的卵清蛋白在加入亚铁源之前，可以实行进一步的水解。优选的真菌蛋白酶是从米曲霉中获得，并且含有内肽酶和外肽酶。

所述的方法也包括如下步骤，把水解卵清蛋白亚铁复合物干燥成粉末。

优选实施方案详述

现在本发明的实施方案仅以举例的方式描述。

25 本发明基于如下的发现，部分水解的卵清蛋白能与亚铁离子形成牢固的复合物，而以生物可利用的方式提供铁。所得到的铁复合物，降低了引起诸如脂质氧化、颜色破坏和维生素 C 降解等有害影响的可能性。这使该铁复合物成为一种理想的载体，用于强化食品和饮料；尤其是用于期望改善营养状态的食品和饮料。

30 可用在铁复合物中的铁源，可以是任何食品级的亚铁盐，如硫酸亚铁、氯化亚铁、硝酸亚铁、柠檬酸亚铁、乳酸亚铁或富马酸亚铁，或其混合物。不过，优选的铁源是硫酸亚铁。所述的铁源优选地以亚

铁溶液的形式提供。

通过制备部分水解的卵清蛋白，在酸性条件下加入铁源，然后调至中性，制备所述的铁复合物。

部分水解的卵清蛋白应该这样，其蛋白级分的分子量范围大约为
5 500-10000； 优选的大约 2000-6000。已经发现，从完整的卵清蛋白或完全水解的卵清蛋白制备的铁复合物并不足够牢固。不过，从部分水解的卵清蛋白制备的铁复合物极为稳定。

作为常规的一步或多步方法，进行卵清蛋白的水解。不过，当水解程序包括在酸性培养基中用酸性蛋白酶的酶水解步骤时，获得最好的
10 的结果。合适的酸性蛋白酶可从商业途径得到。特别合适的酸性蛋白酶，可以通过如米曲霉等真菌的控制发酵获得。这些蛋白酶含有内肽酶和外肽酶。上述酸性蛋白酶的一个实例是 VALIDASE FP-60（可从 Valley Research, Inc., South Bend, Indiana 获得）。

可以用合适的食品级无机或有机酸，使所述的培养基变酸。可使
15 用的这些酸的实例是磷酸、盐酸、硫酸、乳酸、苹果酸、富马酸、葡萄糖酸、琥珀酸、抗坏血酸或柠檬酸。最优选的酸是磷酸。选择 pH 以发挥所述酶的最佳特性。所选的 pH 是使该酶最适地起作用。这种信息可以从供应商或通过简单的试验获得。

用酸性蛋白酶水解后获得的水解蛋白，可以以上述形式应用。不
20 过，所述的水解蛋白如果需要，可以进一步水解。对于任何需要进一步酶水解步骤来说，可用任一种合适的酶。实例包括但不限于，ALCALASE、FLAVORZYME 和 NEUTRASE（Novo Nordisk A/S, Novo Alle, Denmark）和 PROZYNE 以及 PANCREATIN（Amano International Enzyme Co. Inc., Troy, VA）。所述的酶可以是酸性蛋白酶、碱性
25 蛋白酶或中性蛋白酶。特别适合的是碱性蛋白酶。

把铁源加到部分水解的卵清蛋白之前，该部分水解的卵清蛋白应该是酸性的 pH，大约 3.0-5.5。如果有必要，该 pH 可加入上面所述的合适的食品级无机或有机酸调节。最优选的酸是磷酸。

然后把亚铁溶液与部分水解的卵清蛋白混合。优选地缓慢加入，
30 把亚铁溶液加入到部分水解的卵清蛋白中，优选地在搅拌的情况下进行该过程。选择加入亚铁溶液的量，以提供需要的亚铁负载量。不过，令人惊奇的发现，在该复合物中与亚铁的结合与所结合的亚铁量相

关。当所述的复合物含有干重大约为 1%-2%或大约为 4.5%-10%的铁离子时，获得最合适的结合。当然，可以使用超过 10%的亚铁负载量，但是其结合和随后的所述复合物的稳定性，可能轻微降低。

5 把铁源加入到部分水解的卵清蛋白后，所述的溶液应该变为中性，以促进亚铁复合物的形成。不过，该混合物不许成为碱性，以避免沉淀和过氧化物离子的形成。推荐的 pH 范围大约是 6.5-7.5。

如果有必要，加入一种碱，中和该混合物的 pH。任何食品级的碱可用于中和作用，这些碱包括但不限于，氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化镁、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾和碳酸氢钾。优选的是氢氧化铵。

所有步骤优选地在搅拌下进行。

15 获得的复合物可以作为液体形式得到。不过，更优选地把所述的复合物干燥成粉末。干燥方法可以是冷冻干燥或喷雾干燥。可以使用任何合适的方法，把该复合物喷雾或冷冻干燥成粉末。合适的方法在本领域众所周知。

使用时，所述的复合物被包括在制成所需食品或饮料的成分中，并且这些成分用常规方式处理。尽管所述的铁的生物利用度可能比硫酸亚铁的生物利用度轻微降低，但发现它仍然在可接受的范围之内。在多数的情况下，生物利用度的差异并不明显。而且，已经发现该复合物非常稳定，当用于食品和饮料时，没有导致增加脱色或丧失味道的情况出现。再者，也发现该复合物没有增加如腐败等处理过程的问题。

25 所述的复合物特别适用于液体形式的食品和饮料中，例如婴儿配方浓缩液和即喝型饮料，如巧克力和麦芽奶饮料。这些食品或饮料作为其处理过程的一部分，通常经过甾馏或其他方法灭菌，因此，该复合物抵抗粗级处理的能力大为改善。不过，该复合物可用于其他类型的食品或饮料中，如粉末化的饮料、婴儿配方食品和婴儿谷物。

所述的复合物也可以包括通常含有脂类和维生素的宠物食品中。

30 可以看出，含有所述复合物的产品与未强化的食品相比较，具有相似的味觉感受特性和颜色。这表现了优点，产品可以强化，而不引起不利于消费者感受的明显变化。此外，还发现维生素 C 不被复合物

降解。因此，所述的复合物可以用于需要营养平衡的产品中。

现在描述本发明的具体实施例，进一步说明本发明。

实施例 1

把量为 1000 g 的冷冻卵清加到发酵罐 (Biostat® M) 中，在室温下溶化。搅拌下，用 85% H_3PO_4 缓慢调节 pH 至 3.0。然后加热该溶液到 42 °C。加入量为 2.5 g 的一种酸性蛋白酶 (可从 Valley Research, Inc., South Bend, Indiana 获得 VALIDASE FP-60)，然后在 pH 3.0-3.3，低/适中速度搅拌下，使该溶液反应 16 小时。该酸性蛋白酶可从米曲霉中获得，它含有内肽酶和外肽酶。

反应 16 小时后，加入氢氧化铵 (28%)，提高 pH 至 7.4。在搅拌下，加入量为 2.5 g 的碱性蛋白酶 (从 Novo Nordisk A7S 获得的 ALCALASE 2.4L)，并把该溶液的温度提高到 50 °C。这种蛋白酶从地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 中得到，主要含内肽酶。在低/适中速度搅拌下反应 3 小时后，把该溶液冷却到室温。在搅拌下，加入在 50 ml 水中的量为 5.0 g 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，接着加入量为 43.5 g 的 85% H_3PO_4 。然后搅拌下，用 28% NH_4OH 调 pH 至 6.7。然后把该溶液加热到 90 °C，稳定 10 分钟。然后把该溶液冷却到室温。

收获所述的液状铁复合物。

实施例 2

重复实施例 1 的过程。然后搅拌下，加入量为 90 g 的 M.D.5 麦芽糖糊精到液状铁复合物中。用自动旋转圆盘喷雾干燥机，喷雾干燥该混合物 ($T_{\text{in}}=145$ °C, $T_{\text{out}}=80$ °C)。

收获所述的粉末状铁复合物。

实施例 3

把量为 1000 g 的冷冻卵清加到发酵罐 (Biostat® M) 中，在室温下融化。搅拌下，用 85% H_3PO_4 缓慢调节 pH 至 3.0。然后加热该溶液到 42 °C。加入量为 2.5 g 的一种酸性蛋白酶 (可从 Valley Research, Inc., South Bend, Indiana 获得 VALIDASE FP-60)，然后在 pH 3.0-3.3，低/适中速度搅拌下，使该溶液反应 4 小时。

反应后，把该溶液冷却到室温。在搅拌下，加入在 50 ml 水中的量为 5.0 g 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。然后搅拌下，用 28% NH_4OH 调 pH 至 6.7。然后把该溶液加热到 60 °C，10 分钟。然后把该溶液冷却到室温。

搅拌下，加入量为 90 g 的 M.D.5 麦芽糖糊精到该溶液中。用自动旋转圆盘喷雾干燥机，喷雾干燥该混合物 ($T_{in}=145\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{out}=80\text{ }^{\circ}\text{C}$)。收获所述的粉末状铁复合物。

实施例 4

5 除了卵清进行水解 6 小时外，重复实施例 1 的过程。收获所述的粉末状铁复合物。

实施例 5

10 通过重新溶解巧克力奶粉末 (QUIK, Nestlé USA, Inc) 至 8.5% 重量比的浓度，制备 4 种巧克力奶饮料。每种饮料含有 12.5 ppm 的添加铁，这些铁是实施例 1-4 之一不同铁复合物的形式。

把所述的饮料放入密封的 125 ml 玻璃罐中，大约 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($250\text{ }^{\circ}\text{F}$) 高压 5 分钟。把这些罐冷却到室温，然后储存 6 个月。

15 经 1、2、3、4、5 和 6 个月后，评价这些饮料的物理稳定性、颜色和口感。口感通过 10 人的口感测试组评价。评价认为，所有饮料没有脱色，沉淀或凝结，具有良好的味道。

实施例 6

通过重新溶解巧克力奶粉末 (QUIK, Nestlé USA, Inc) 至 8.5% 重量比的浓度，制备 4 种巧克力奶饮料。每种饮料含有 12.5 ppm 的添加铁，这些铁是实施例 1-4 之一不同铁复合物的形式。

20 把所述的饮料预先加热到大约 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($175\text{ }^{\circ}\text{F}$)，注入蒸汽加热到大约 $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($285\text{ }^{\circ}\text{F}$)，在该温度下保持 5 秒，然后冷却到大约 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($175\text{ }^{\circ}\text{F}$)。接着把这些饮料在大约 17/3.5 MPa (2500/500 psi) 下匀浆，冷却到 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($60\text{ }^{\circ}\text{F}$)，注入到 250 ml 的 Tetra Brik Aseptic® 包装袋 (Tetra Pak Inc., Chicago IL) 中

25 经 1 天、2 周、1 和 2 个月后，评价这些饮料的物理稳定性、颜色和口感。口感通过 10 人的口感测试组评价。评价认为，所有饮料没有脱色，沉淀或凝结，具有良好的味道。

实施例 7

30 通过重新溶解巧克力奶粉末 (QUIK, Nestlé USA, Inc) 至 8.5% 重量比的浓度，制备 4 种巧克力奶饮料。每种饮料含有 12.5 ppm 的添加铁，这些铁是实施例 1-4 之一不同铁复合物的形式。

把所述的饮料预先加热到大约 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($175\text{ }^{\circ}\text{F}$)，注入蒸汽加热到

大约 148℃ (298 °F)，在该温度下保持 5 秒，然后冷却到大约 80℃ (175 °F)。接着把这些饮料在大约 17/3.5 MPa (2500/500 psi) 下匀浆，冷却到 16℃ (60 °F)，注入到 250 ml 的 Tetra Brik Aseptic® 包装袋 (Tetra Pak Inc., Chicago IL) 中

- 5 经 1、2、3、4、5 和 6 个月后，评价这些饮料的物理稳定性、颜色和口感。口感通过 10 人的口感测试组评价。评价认为，所有饮料没有脱色，沉淀或凝结，具有良好的味道。

实施例 8

- 10 通过重新溶解巧克力奶粉末 (QUIK, Nestlé USA, Inc) 3 份和重新溶解麦芽粉末 (MILO, Nestlé Australia Ltd) 3 份，共制备 6 种饮料。每种饮料包含在 180 ml 开水中的 22.0 g 粉末。把实施例 2-4 之一的铁复合物加入到巧克力饮料和麦芽饮料中。在巧克力饮料中铁的最终浓度为 15.0 ppm，而在麦芽饮料中铁的最终浓度为 25.0 ppm。

- 15 短暂地搅拌所述的饮料，在室温下放置 15 分钟。15 分钟后，通过 10 人的口感测试组评价饮料。当这些样品与未加入铁的对照样品相比较时，没有发现颜色变化或丧失味道。

实施例 9

- 20 用 180 ml 开水重新溶解 55 g 含香蕉粉的婴儿谷物 (Nestlé USA, Inc)，制备 3 种婴儿谷物膳食。把实施例 2-4 之一的铁复合物加入到每种膳食中，每 100 g 谷物粉末为 7.5 mg 铁。

短暂地搅拌所述的饮料，在室温下放置 15 分钟。15 分钟后，通过 10 人的口感测试组评价饮料。当这些样品与未加入铁的对照样品相比较时，没有发现颜色变化或丧失味道。

- 25 实施例 10

所述的复合物的生物利用度按如下方法测定：

动物：所用的动物是刚断奶的雄性 Sprague-Dawley 大鼠，鼠龄为 3 周 (IFFA-CREDO, L' Arbresle, 法国)。

- 30 食物：对照食物是 ICN 低铁食物 (Soccochim SA, Lausanne, 瑞士)，其铁含量为 3 mg/kg。该食物基于酪蛋白，除铁外，提供作为生长大鼠的营养需求。

试验食物是：

食物 A: 用 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加的对照食物, 以提供 10 mg/kg 的铁。

食物 B: 用 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加的对照食物, 以提供 20 mg/kg 的铁。

食物 1: 用实施例 4 的复合物添加的对照食物, 以提供 10 mg/kg 的铁。

5 食物 2: 用实施例 4 的复合物添加的对照食物, 以提供 20 mg/kg 的铁。

食物 3: 以 10mg/kg 添加实施例 2 的复合物的对照食物, 提供 10 mg/kg 的铁。

10 食物 4: 以 20mg/kg 添加实施例 2 的复合物的对照食物, 提供 10 mg/kg 的铁。

分析方法

1) 用异氟烷醚麻醉大鼠, 然后从眼眶静脉丛抽取 200 μL 的血液样品, 进行血红蛋白的分析。通过氰化正铁血红蛋白法 (Hb MPR3 试剂盒, Boehringer Mannheim GmbH, 德国), 使用自动测定仪 (Hemocue, 15 Baumann-Medical SA, Wetzikon, 瑞士) 测定样品中血液血红蛋白的水平。在所有血红蛋白的测定中, 测量具有一系列范围的血红蛋白水平的商用质量对照血液样品 (Dia-HT Kontrollblut, Dia MED, Cressier, 瑞士)。

2) 根据血红蛋白水平, 应用斜率比值计算与七元硫酸亚铁相比较的铁生物利用度。多元回归方程说明所加入的铁量与血红蛋白水平 20 的关系。该方程给出每种食物零剂量时截取的一条直线。然后以 2 个斜率的比值, 计算相对于七元硫酸亚铁的铁源生物利用度。把该比值乘以 100, 得到生物利用度的相对值。

25 步骤: 把大鼠单个养在配有不锈钢栅的聚碳酸酯笼中。允许这些动物自由喝蒸馏水。为使大鼠贫血, 给大鼠随机喂对照食物 24 天。每天补充新鲜食物。用钢栅盖住食物, 而降低大鼠对食物的糟蹋。

24 天后, 测定血红蛋白和体重。具有血红蛋白水平为 4.5-5.8 mg/dl 的 70 只大鼠, 被随机分为每组 10 只, 共 7 组, 各组间具有大约相等平均值的血红蛋白和体重。1 组动物喂以 1 种试验食物 14 天。 30 在 0 天开始, 以 20 g/天给所述的大鼠, 随机喂所述的食物。允许这些大鼠自由喝蒸馏水。每天测定个体食物消耗量。14 天后, 把大鼠称重并测定血红蛋白。

结果

平均食物消耗和铁吸收并不受铁源类型的影响。不过，接受未加铁食物的大鼠比接受加铁食物的大鼠吃得较少。摄食 20 mg/kg 加铁食物的大鼠比接受 10 mg/kg 铁食物的大鼠，消耗略为较多的食物。

- 5 大鼠的体重增加并不受铁源类型的影响。不过，接受未加铁食物的大鼠比接受加铁食物的大鼠，体重较轻。摄食 20 mg/kg 加铁食物的大鼠比接受 10 mg/kg 铁食物的大鼠，体重略为增加。

实验期开始和结束时的血液血红蛋白水平，在下表显示。

10

平均血红蛋白值；（标准差）

食物	加铁量 (mg/kg)	初始血红蛋白 (g/dl)	最终血红蛋白 (g/dl)	差值 (g/dl)
对照	0	5.12 (0.42)	4.88 (0.43)	-0.24 (0.20)
A	10	5.12 (0.41)	8.66 (0.81)	3.54 (0.65)
B	20	5.12 (0.40)	11.53 (0.86)	6.41 (0.82)
1	10	5.12 (0.40)	7.90 (0.54)	2.78 (0.41)
2	20	5.13 (0.39)	11.15 (0.57)	5.92 (0.54)
3	10	5.13 (0.37)	8.36 (0.47)	3.23 (0.34)
4	20	5.12 (0.38)	11.51 (0.79)	6.39 (0.65)

15

相对生物利用度见如下:

食物	相对生物 利用度
1, 2	90
3, 4	98
A, B	100

5 所有铁-蛋白复合物的生物利用度, 与硫酸亚铁的生物利用度值相似。相对生物利用度值低于 91% 被认为明显低于参照组。因此, 根据统计学的观点, 实施例 2 铁复合物的相对生物利用度值, 与硫酸亚铁的生物利用度值相似。不过, 从实用观点考虑, 所有复合物均具有非常良好的生物利用度。