

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810240344.4

[51] Int. Cl.

C07K 4/12 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

A61K 38/03 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 7 月 15 日

[11] 公开号 CN 101481404A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 9/50 (2006.01)

A61P 3/02 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

[22] 申请日 2008.12.17

[21] 申请号 200810240344.4

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路 17 号

[72] 发明人 毛学英 许成才 王 磊 徐世平
任发政

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

代理人 王朋飞

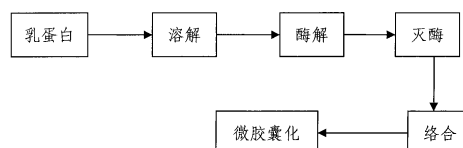
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种酶解乳蛋白亚铁络合物，该络合物的微胶囊补铁剂及它们的制备方法。本发明将亚铁盐与乳蛋白酶解产物络合，可以提高铁盐在肠道微碱性条件下的溶解性，提高铁的吸收利用率，制备过程安全、无污染；本发明还采用适当壁材将酶解乳蛋白亚铁络合物进行微胶囊化，制得酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂，该补铁剂能够掩盖亚铁盐自身的异味，防止亚铁的氧化，并能够在肠道的微碱性条件下逐渐释放 Fe^{2+} ， Fe^{2+} 的生物吸收利用率高，无毒副作用；而且由于酶解乳蛋白的存在，不仅可以预防和治疗缺铁性贫血，还具有抗氧化、调节免疫、降血压等生理功能。



1、一种酶解乳蛋白亚铁络合物，其特征在于，是乳蛋白酶解产物：生物活性肽与亚铁化合物的络合物。

2、如权利要求1所述的络合物，其特征在于，所述生物活性肽与所述亚铁化合物，以Fe计，质量比为4:1~1:4。

3、一种如权利要求1所述的酶解乳蛋白亚铁络合物的制备方法，包括：

1) 预溶解：将乳蛋白溶解配制3%~10%的溶液，所述浓度为重量体积浓度；

2) 酶解：按每克蛋白添加碱性蛋白酶500~4000IU进行酶解，酶解温度20~60℃，酶解时间3~9h，pH值7.0~9.0；

3) 灭酶：酶解结束后，60~90℃灭酶5~30min，得到乳蛋白酶解产物：生物活性肽；

4) 络合：生物活性肽与以Fe计的亚铁化合物质量比为4:1~1:4、反应pH值为3.0~9.0、反应温度为35~60℃、络合时间为10~60min进行络合，制备乳蛋白生物活性肽亚铁盐络合物。

4、如权利要求3所述的方法，其特征在于，在步骤3)之后，步骤4)之前，还包括采用包括超滤和层析的纯化技术精制乳蛋白生物活性肽；或进一步包括将精制得到的生物活性肽干燥。

5、一种酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂，包括壁材和芯材，所述壁材为乳蛋白和多糖的混合物，所述芯材为酶解乳蛋白亚铁络合物。

6、如权利要求5所述的补铁剂，其特征在于，所述壁材中乳蛋白和多糖的质量比为2:1~20:1；所述芯材和壁材的质量比为1:3~1:15；所述酶解乳蛋白亚铁络合物是乳蛋白酶解产物：生物活性肽与亚铁化合物的络合物，其中生物活性肽与所述亚铁化合物，以Fe计，质量比为1:4~4:1。

7、如权利要求 5 或 6 所述的补铁剂，其特征在于，所述多糖为海藻酸钠、环糊精、壳聚糖、改性淀粉中的一种或多种。

8、一种如权利要求 5 所述的酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂的制备方法，包括：

- 1) 预溶解：将乳蛋白溶解配制溶液；
- 2) 酶解：按每克蛋白添加碱性蛋白酶500 ~ 4000IU进行酶解，酶解温度20 ~ 60℃，酶解时间3 ~ 9h，pH值7.0 ~ 9.0；
- 3) 灭酶：酶解结束后，60 ~ 90℃灭酶5 ~ 30min，得乳蛋白酶解产物：生物活性肽；
- 4) 络合：生物活性肽与以Fe计的亚铁化合物质量比为4:1 ~ 1:4、反应pH值为3.0 ~ 9.0、反应温度为35 ~ 60℃、络合时间为10 ~ 60min进行络合，制备乳蛋白生物活性肽亚铁盐络合物；
- 5) 微胶囊化处理：以乳蛋白和多糖的混合物作为壁材，对酶解乳蛋白亚铁络合物进行微胶囊化包被处理。

9、如权利要求 8 所述的制备方法，所述步骤 5) 壁材中乳蛋白和多糖的质量比为 2:1 ~ 20:1，反应体系的 pH 值为 3.0 ~ 8.0，芯壁材的质量之比为 1:3 ~ 1:15、包埋温度为 20 ~ 60℃，包埋时间为 5 ~ 35 min。

10、如权利要求9所述的方法，其特征在于，步骤5)中所述微胶囊化包被处理，其壁材乳蛋白和多糖的质量比为12:1，反应体系的pH值为6.0，芯壁材的质量之比为1:5、包埋温度为50℃，包埋时间为15 min。

一种酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂及其制备方法

技术领域

本发明涉及生物技术领域，特别涉及一种乳蛋白生物活性肽亚铁络合物，其微胶囊及它们的制备方法，以及生物学用途。

背景技术

铁是人体的必需微量营养元素之一，在机体代谢中具有重要作用。目前，营养性铁缺乏是发展中国家普遍存在的营养问题，特别是儿童和孕妇容易缺乏。食物中的铁主要以三价铁形式存在，而人体利用的铁主要是二价铁，因此食物中的铁吸收利用率较低。

另外，铁的吸收与铁的存在状态、溶解性以及食品中存在的其它成分等也有关系，例如含有大量的磷酸盐或草酸盐的食物干扰铁的吸收，而Vc、半胱氨酸等还原性物质有利于铁的吸收。

我国目前使用的补铁剂存在吸收利用率低、有一定毒副作用等缺陷，有必要寻找促进铁吸收的物质，提高铁的利用率，给消费者提供一种口感好、安全无毒副作用的补铁剂。

天然蛋白质经水解后生成的肽与微量元素结合形成的络合物可通过小肠直接吸收。因此蛋白酶解产物的铁结合能力和促进铁吸收方面的研究受到普遍关注。

发明内容

本发明的目的是提供一种酶解乳蛋白亚铁络合物及其制备方法。

本发明的另一目的是提供上述亚铁络合物的生物学用途，即将其微胶囊化处理后得到的一种酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂，并提供其制备方法。

本发明所述的酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂是将酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊化制得的。对于人体吸收来说， Fe^{2+} 是比较理

想的补铁剂，但 Fe^{2+} 极不稳定，易氧化变色、且有异味，本发明利用酶解技术制备乳蛋白生物活性肽，提供一种乳蛋白生物活性肽亚铁络合物的制备方法，为了保护亚铁离子稳定，再将络合亚铁盐进行微胶囊化包被处理，提供一种乳蛋白生物活性肽亚铁络合物微胶囊补铁剂，使铁盐在肠道中仍为可溶性状态，保护 Fe^{2+} 的活性，缓释 Fe^{2+} ，提高亚铁的吸收利用率，以克服传统补铁产品的副作用及吸收利用率低的缺陷，从而开发出天然、安全、高效的生物补铁剂。

本发明所述的酶解乳蛋白亚铁络合物是乳蛋白酶解产物：生物活性肽与亚铁化合物的络合物。其中，生物活性肽与 Fe^{2+} 的质量比为4:1 ~ 1:4。所述乳蛋白可以是各种动物乳蛋白中的一种或多种，如酪蛋白和乳清蛋白，可来自干酪素，也可以直接用粗制干酪。所述的亚铁化合物是各种适于生物体补铁的含亚铁的化合物，包括硫酸亚铁，氯化亚铁，柠檬酸亚铁，乳酸亚铁等等。

本发明同时提供酶解乳蛋白亚铁络合物的制备方法：将乳蛋白溶解后酶解，酶解产物生物活性肽与亚铁化合物在一定条件下进行络合反应，具体步骤如下：

1) 预溶解：溶解乳蛋白，配制溶液；

2) 酶解：按每克蛋白添加碱性蛋白酶500 ~ 4000IU进行酶解，酶解温度20 ~ 60℃，酶解时间3 ~ 9h，pH值7.0 ~ 9.0；

3) 灭酶：酶解结束后，60 ~ 90℃灭酶5 ~ 30min，得乳蛋白酶解产物：生物活性肽；

4) 络合：将溶液（乳蛋白酶解液或用干燥生物活性肽粉末配制的溶液）中的生物活性肽，按生物活性肽与 Fe^{2+} 的质量比为4:1 ~ 1:4，与 Fe^{2+} 化合物反应，反应pH值为3.0 ~ 9.0，反应温度为35 ~ 60℃，络合时间为10 ~ 60min，获得乳蛋白生物活性肽亚铁络合物。

所述生物活性肽是由上述酶解过程（步骤2）制得的，一般其分子量在3000kDa以下，含有3 ~ 20个氨基酸残基。

步骤1) 中乳蛋白的溶液浓度优选3% ~ 10% (w/v, 重量体积浓度);

在步骤3) 之后, 步骤4) 之前, 还可以包括精制: 采用超滤和凝胶过滤层析、离子交换层析等纯化技术, 得到较高纯度的乳蛋白生物活性肽; 或进一步包括将精制得到的生物活性肽干燥。

所述乳蛋白可以是各种动物乳蛋白中的一种或多种, 如酪蛋白和乳清蛋白, 可来自干酪素, 也可以直接用粗制干酪。

所述的亚铁化合物是各种适于生物体补铁的含亚铁的化合物, 包括硫酸亚铁, 氯化亚铁, 柠檬酸亚铁, 乳酸亚铁等等。

本发明还提供一种酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂, 该补铁剂包括壁材和芯材, 所述壁材为乳蛋白和多糖的混合物, 所述芯材为酶解乳蛋白亚铁络合物, 它是将乳蛋白酶解产物生物活性肽, 与亚铁化合物在一定条件下进行络合反应制得。

其中所述壁材中乳蛋白和多糖的质量比为 2:1 ~ 20:1; 所述芯材和壁材的质量之比为 1:3 ~ 1:15; 所述酶解乳蛋白亚铁络合物中, 生物活性肽与 Fe^{2+} 的质量比为 1:4 ~ 4:1;

本发明使用的乳蛋白可以是各种动物乳蛋白中的一种或多种, 如酪蛋白和乳清蛋白, 可来自干酪素, 也可以直接用粗制干酪。

所述的亚铁化合物是各种适于生物体补铁的含亚铁的化合物, 包括硫酸亚铁, 氯化铁, 柠檬酸亚铁, 乳酸亚铁等等。

所述多糖为海藻酸钠、环糊精、壳聚糖、改性淀粉等多糖中的一种或多种。

本发明所述的酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂的制备方法如下:

- 1) 预溶解: 溶解乳蛋白, 配制溶液;
- 2) 酶解: 按每克蛋白添加碱性蛋白酶500 ~ 4000IU进行酶解, 酶解温度20 ~ 60℃, 酶解时间3 ~ 9h, pH值7.0 ~ 9.0;

3) 灭酶: 酶解结束后, 60 ~ 90℃灭酶5 ~ 30min, 得乳蛋白酶解产物: 生物活性肽;

4) 络合: 将溶液(乳蛋白酶解液或用干燥生物活性肽粉末配制的溶液)中的生物活性肽, 按生物活性肽与 Fe^{2+} 的质量比为4:1 ~ 1:4, 与 Fe^{2+} 化合物反应、反应pH值为3.0 ~ 9.0、反应温度为35 ~ 60℃、络合时间为10 ~ 60min, 获得乳蛋白生物活性肽亚铁络合物;

5) 微胶囊化处理: 以乳蛋白和多糖的混合物作为壁材, 对酶解乳蛋白亚铁络合物进行微胶囊化包被处理。

其中: 步骤1) 中乳蛋白的溶液浓度优选3% ~ 10% (w/v, 重量体积浓度);

在步骤3) 之后, 步骤4) 之前, 还可以包括精制: 采用超滤和凝胶过滤层析、离子交换层析等纯化技术, 得到较纯的乳蛋白生物活性肽; 或进一步包括将精制得到的生物活性肽干燥;

步骤5) 如下进行: 将作为壁材的蛋白质和多糖分别溶解, 再加入作为芯材的酶解乳蛋白亚铁络合物, 借助分子间作用力壁材和芯材相互结合, 制备pH敏感水凝胶, 或经喷雾干燥、冷冻干燥等方法成型, 得到酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂, 其中, 所述壁材中乳蛋白和多糖的质量比为2:1 ~ 20:1, 反应体系的pH值为3.0 ~ 8.0, 芯壁材的质量之比为1:3 ~ 1:15、包埋温度为20 ~ 60℃, 包埋时间为5 ~ 35 min。

研究发现, 影响包埋效果各因素的顺序为: pH值>芯壁材比>壁材比>包埋温度>包埋时间; 当两种壁材(乳蛋白和海藻酸钠等多糖)的质量比为12:1, 反应体系的pH值为6.0, 芯壁材的质量之比为1:5、包埋温度为50℃, 包埋时间为15 min 时, 效果较好, 能够获得较为稳定的微胶囊产物。

本发明将亚铁盐与乳蛋白酶解产物络合, 并将其微胶囊化, 防止亚铁盐氧化失去活性, 缓慢释放亚铁盐, 有效提高 Fe^{2+} 的吸收利用

率；还可以掩盖补铁产品自身的异味，使产品在保持营养的同时呈现较好的感官效果，提供了一种优质补铁剂，并提供了切实可行的乳蛋白生物活性肽亚铁盐络合物微胶囊的制法，制备过程安全、无污染。

本发明提供的补铁剂在胃中溶解度较低，在肠道的微碱性条件下逐渐溶解，使亚铁盐处于可溶状态， Fe^{2+} 生物吸收利用率高，无毒副作用；而且因为有生物活性肽的存在，不仅可以预防和治疗缺铁性贫血，而且具有抗氧化、调节免疫、降血压等生理功能。

另外，本发明选用粗制干酪为原料，利用现代改性技术和分离技术制备乳蛋白源肽亚铁补铁剂也是乳制品精加工的需要，符合乳品工业的发展趋势，还可以充分利用我国甘肃、新疆等地食用价值和经济价值都很低的粗制干酪资源，符合我国西部大开发的战略要求，具有重要的社会经济意义。

附图说明

图1为酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂的制备流程图。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例1

干酪素来自西北生物技术公司；碱性蛋白酶购于诺维信生物有限公司；海藻酸钠购自北京奥博星生物技术有限公司。乳清蛋白购自北京银河路公司。

取干酪素0.6kg，配成6%（w/v）的蛋白溶液，添加碱性蛋白酶0.6克，调整酶解温度42℃，酶解时间7h，pH值8.0进行酶解，酶解结束后，90℃灭酶10min，用超滤设备（截留分子量为10kDa的共混超滤膜）进行超滤，得到较高纯度的乳蛋白酶解产物，冷却至室温备用。

用蒸馏水将乳蛋白酶解产物溶解，按生物活性肽与 FeSO_4 （以Fe计算）的质量比为2:1、反应pH值为6.5、反应温度为40℃、络合时间为30min进行络合反应，为防止 Fe^{2+} 氧化，使络合反应在惰性气体（氮

气)保护的条件下进行。络合反应结束后将溶液真空冷冻干燥(60℃), 制得乳蛋白生物活性肽亚铁络合物。

将乳清蛋白和海藻酸钠分别配成6%的溶液, 分别取1.2L 6%的乳清蛋白溶液和0.1L 6%的海藻酸钠溶液在常温条件下混合, 搅拌均匀, 调整pH值为6.0, 升温至50℃; 然后取130g上述乳蛋白生物活性肽亚铁络合物干粉配成溶液, 在搅拌条件下缓慢加入上述混合液体中, 使酶解乳蛋白亚铁络合物与壁材(乳清蛋白和海藻酸钠)的质量比为1:5, 然后搅拌15min; 将溶液真空喷雾干燥, 得到酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂。

实施例2

粗制干酪来自新疆; 碱性蛋白酶购于北京房山酶制剂厂; 壳聚糖购自北京奥博星生物技术有限公司; 乳清蛋白购自北京银河路公司。

取粗制干酪0.6kg, 乳清蛋白0.1kg, 配成3% (w/v) 的蛋白溶液, 添加碱性蛋白酶0.25克, 调整酶解温度55℃, 酶解时间9h, pH值7.0进行酶解, 酶解结束后, 60℃灭酶30min, 冷却至室温备用。

取乳蛋白酶解产物溶液, 按生物活性肽与乳酸亚铁(以Fe计算)的质量比为4:1、反应pH值为4.0、反应温度为40℃、络合时间为55min进行络合反应, 制得含乳蛋白生物活性肽亚铁络合物的溶液。络合反应在惰性气体(氮气)保护的条件下进行。

将乳清蛋白和壳聚糖分别配成20%的溶液, 分别取3.0L 20%的乳清蛋白溶液和1.0L 8%的壳聚糖溶液在常温条件下混合, 搅拌均匀, 调整pH值为4.0, 在30℃保温; 然后取上述乳蛋白生物活性肽亚铁络合物溶液, 在搅拌条件下缓慢加入上述混合液体中, 使酶解乳蛋白亚铁络合物与壁材(乳清蛋白和壳聚糖)的质量比为1:3, 然后搅拌10min; 将溶液真空冷冻干燥, 得到酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂。

实施例3

干酪素：来自西北生物技术公司；碱性蛋白酶购于诺维信生物有限公司；改性淀粉购自国民淀粉公司；乳清蛋白购自北京银河路公司。

取干酪素0.6kg，配成9% (w/v) 的蛋白溶液，添加碱性蛋白酶1.42克，调整酶解温度25℃，酶解时间4h，pH值9.0进行酶解，酶解结束后，75℃灭酶15min，冷却至室温，备用。

用超滤设备（截留分子量为10kDa的陶瓷超滤膜）进行超滤，采用葡聚糖凝胶Sephadex G-25进行凝胶过滤层析得到较高纯度的乳蛋白酶解产物的溶液，冷却至室温备用。

取上述酶解乳蛋白溶液（灭酶后）溶解，按生物活性肽与柠檬酸亚铁（以Fe计算）的质量比为1:3、反应pH值为8.0、反应温度为50℃、络合时间为10min进行络合反应，将溶液低温喷雾干燥（80℃），制得乳蛋白生物活性肽亚铁络合物粉末。

将乳清蛋白和改性淀粉分别配成溶液，分别取2.0L15%的乳清蛋白溶液和0.1L4%的改性淀粉溶液在常温条件下混合，搅拌均匀，调整pH值为7.5，升温至50℃；然后取70g上述乳蛋白生物活性肽亚铁络合物干粉配成溶液，在搅拌条件下缓慢加入上述混合液体中，使酶解乳蛋白亚铁络合物与壁材（乳清蛋白和改性淀粉）的质量比为1:15，然后搅拌35min；制备pH敏感水凝胶，得到酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂。

实施例4

取实施例1，2，3制备的酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊，在38~40℃、相对湿度75%~80%的条件下保存3个月，酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊的保存率为90.08~90.20%。

取实施例1，2，3制备的酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊，分别在室温、40、60、80、100℃不同温度下水浴保温3h，除经100℃处理后亚铁离子保存率下降为85.14%外，其余处理亚铁离子保存率均在90%以上。酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂充氮包装或抽真空包装

保存6个月后，亚铁离子保存率接近100%。

以上结果表明：本发明所述的酶解乳蛋白亚铁络合物微胶囊补铁剂的光、热稳定性及贮藏稳定性较好。

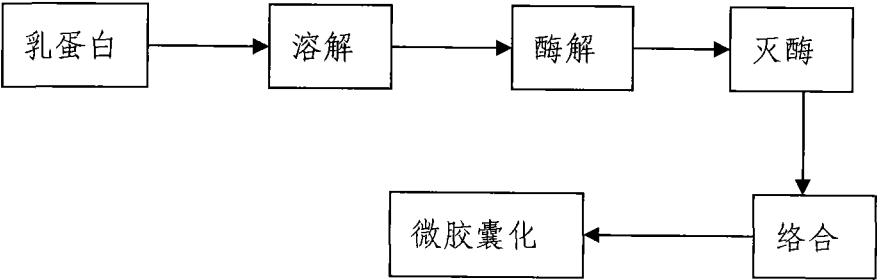


图 1