



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101978841 A

(43) 申请公布日 2011.02.23

(21) 申请号 201010272101.6

(22) 申请日 2010.08.31

(71) 申请人 浙江贝因美科工贸股份有限公司

地址 310053 浙江省杭州市滨江区南环路
3758 号

(72) 发明人 何光华 尤玉如 储小军 肖功年
华家才 刘士旺

(74) 专利代理机构 杭州九洲专利事务所有限公
司 33101

代理人 陈继亮

(51) Int. Cl.

A23C 21/06 (2006.01)

A23C 21/08 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

一种抗蛋白过敏及营养婴儿配方奶粉

(57) 摘要

本发明涉及一种抗蛋白过敏及营养婴儿配方奶粉，是由下述吨重量份的原料制成的：鲜牛奶 1000(折干物质 115)、脱盐乳清粉 500、精炼植物油 235、乳糖 45、分子量小于 10000 道尔顿乳清小肽 50、低聚果糖 20、花生四烯酸 (ARA) 6、二十二碳六烯酸 (DHA) 5、核苷酸 0.42、牛磺酸 0.45、胆碱 0.42、L-肉碱 0.06、β-胡萝卜素 0.012、复合维生素 2.5、氨基酸类常微量元素螯合物 3.5、富硒酵母粉 1.5。本发明有益的效果是：本发明含有分子量小于 10000 道尔顿乳清小肽，具有调节免疫和抗蛋白过敏的功效；具有水溶性好，吸收率高，不刺激胃肠等特点，能同时满足人体对补微量元素和补氨基酸的需要。

1. 一种抗蛋白过敏及营养婴儿配方奶粉,其特征在于:是由下述吨重量份的原料制成的:鲜牛奶 1000(折干物质 115)、脱盐乳清粉 500、精炼植物油 235、乳糖 45、分子量小于 10000 道尔顿乳清小肽 50、低聚果糖 20、花生四烯酸 (ARA) 6、二十二碳六烯酸 (DHA) 5、核苷酸 0.42、牛磺酸 0.45、胆碱 0.42、L-肉碱 0.06、 β -胡萝卜素 0.012、复合维生素 2.5、氨基酸类常微量元素螯合物 3.5、富硒酵母粉 1.5。

2. 根据权利要求 1 所述的抗蛋白过敏及营养婴儿配方奶粉,其特征是:所述氨基酸类常微量元素螯合物是指甘氨酸钙或者天冬氨酸钙或者蛋氨酸钙或者苏氨酸钙或者赖氨酸钙中的一种或者几种。

3. 根据权利要求 1 所述的抗蛋白过敏及营养婴儿配方奶粉,其特征是:所述氨基酸类常微量元素螯合物是指甘氨酸锌或者蛋氨酸锌或者天冬氨酸锌或者苏氨酸锌或者赖氨酸锌中的一种或者几种。

4. 根据权利要求 1 所述的抗蛋白过敏及营养婴儿配方奶粉,其特征是:所述氨基酸类常微量元素螯合物是指甘氨酸铜或者天冬氨酸铜或者蛋氨酸铜或者苏氨酸铜或者赖氨酸铜中的一种或者几种。

5. 根据权利要求 1 所述的抗蛋白过敏及营养婴儿配方奶粉,其特征是:所述富硒酵母粉中硒含量 1000 ~ 2500mg/kg。

一种抗蛋白过敏及营养婴儿配方奶粉

技术领域

[0001] 本发明属于乳制品加工技术领域,尤其是一种抗蛋白过敏及营养婴儿配方奶粉。

背景技术

[0002] 牛乳是优质的营养食品,同时又是较易引起过敏的食物之一。尤其是对以牛乳为主要食物的婴幼儿来说,乳蛋白过敏严重地影响了婴幼儿对乳蛋白的吸收。近年来的研究又发现蛋白质经消化道酶促降解后,在人体小肠内主要是以小肽类的形式吸收,且比完全游离氨基酸的吸收更易、更快。某些小肽不仅能提供人体生长、发育所需的营养物质,而且具有抗过敏性、降低胆固醇、降低血压,调节免疫、促进生长等生物学功能。

[0003] 常微量元素作为营养强化剂在婴幼儿配方奶粉中应用经历了第一代无机盐和第二代简单的有机化合物。而氨基酸类常微量元素螯合物、多糖类常微量元素络合物、生物富集常微量元素物等第三代常微量元素,对婴幼儿有非常显著的营养、消化和代谢效果,把第三代微量元素发展和生产推上了新的台阶,被称为婴幼儿配方奶粉加微量元素的第三代产品。与前两代产品比较,有着十分明显的优势。

[0004] 目前国内在奶制品领域的专利主要侧重于奶粉的配伍方面和包装袋的外观设计,而且专利较少。发明专利 CN1439276 根据母乳营养成分的特点,针对出生到 6 个月婴儿专门设计,能为宝宝提供全面均衡的营养。发明中除添加了婴儿成长所必需的多种维生素和微量元素,还添加了 L- 肉碱、牛磺酸、 β -胡萝卜素、核苷酸、乳铁蛋白等,使其营养成分更为合理。其中复合微量元素包括乳酸亚铁、乳酸锌、硫酸铜、碘酸钾、碳酸钙、硫酸锰中的一种和几种。发明专利 CN1107656 一种以鲜牛奶、脱盐乳清粉、精炼大豆油、贻糖、麦芽糊精、奶油、复合维生素、复合维量元素、异构化乳糖、肌醇及肉毒碱等原料制成母乳化婴儿奶粉。产品侧重于营养配方,婴儿需要的营养成分齐全,易消化吸收,能使婴儿健康成长。发明专利 CN1300549 一种乳铁蛋白婴儿奶粉的配方,其制作工艺是首先将原料乳净乳,然后预热、均质、杀菌、浓缩、喷粉即成为半成品,加入乳铁蛋白混合均匀即为成品,发明侧重于制作工艺。发明专利 CN1459235 发明利用生物工程技术将牛乳中的 α -酪蛋白和 β 乳球蛋白用复合蛋白酶分解,使难以消化和有致敏性的蛋白质改性,消除了其影响。发明成功地解决了鲜奶因酶解所带来的产品风味不好的难题,是乳制品中的创新品种。

[0005] 综上所述,在背景技术方面婴幼儿制品方面的专利发明内容主要集中在配方和营养方面上,在权利要求上主要是营养搭配,而且均未涉及到抗蛋白过敏和第三代常微量元素等。

发明内容

[0006] 本发明要解决上述现有技术的缺点,提供一种抗蛋白过敏及营养婴儿配方奶粉,可降低婴幼儿蛋白过敏的配方以及改变了常微量元素的化合物,利用氨基酸类常微量元素螯合物取代了第二代常微量元素,并确定了合理的搭配,有非常显著的营养,通过添加富硒酵母粉,消化和代谢效果增强,特别适合于早产婴儿、0 ~ 12 个月婴幼儿等。

[0007] 本发明解决了婴幼儿蛋白过敏以及第一代、第二代常微量元素吸收等难题,为模拟母乳成分提供了一种新的方法。

[0008] 本发明解决其技术问题采用的技术方案:这种抗蛋白过敏及营养婴儿配方奶粉,是由下述吨重量份的原料制成的:鲜牛奶 1000(折干物质 115)、脱盐乳清粉 500、精炼植物油 235、乳糖 45、分子量小于 10000 道尔顿乳清小肽 50、低聚果糖 20、花生四烯酸(ARA)6、二十二碳六烯酸(DHA)5、核苷酸 0.42、牛磺酸 0.45、胆碱 0.42、L-肉碱 0.06、β-胡萝卜素 0.012、复合维生素 2.5、氨基酸类常微量元素螯合物(复合常微量元素)3.5、富硒酵母粉 1.5。

[0009] 所述氨基酸类常微量元素螯合物是指甘氨酸钙或者天冬氨酸钙或者蛋氨酸钙或者苏氨酸钙或者赖氨酸钙中的一种或者几种。

[0010] 所述氨基酸类常微量元素螯合物是指甘氨酸锌或者蛋氨酸锌或者天冬氨酸锌或者苏氨酸锌或者赖氨酸锌中的一种或者几种。

[0011] 所述氨基酸类常微量元素螯合物是指甘氨酸铜或者天冬氨酸铜或者蛋氨酸铜或者苏氨酸铜或者赖氨酸铜中的一种或者几种。

[0012] 所述富硒酵母粉中硒含量 1000 ~ 2500mg/kg。

[0013] 本发明有益的效果是:

[0014] 与传统婴儿配方奶粉相比,本发明含有分子量小于 10000 道尔顿乳清小肽,具有调节免疫和抗蛋白过敏的功效;

[0015] 与传统婴儿配方奶粉相比,本发明含有甘氨酸钙或者天冬氨酸钙或者蛋氨酸钙或者苏氨酸钙或者赖氨酸钙中的一种或者几种,含有甘氨酸铜或者天冬氨酸铜或者蛋氨酸铜或者苏氨酸铜或者赖氨酸铜中的一种或者几种,具有水溶性好,吸收率高,不刺激胃肠等特点,能同时满足人体对补微量元素和补氨基酸的需要;

[0016] 与传统婴儿配方奶粉相比,本发明含有富硒酵母粉,富含免疫多糖、甘露寡糖和几丁质,可有选择性地被肠道中有益细菌作为能源,促进其繁衍,从而抑制或者杀死沙门氏菌等有害细菌,具有化学益生作用,促进微量元素消化吸收,提高其生物学利用率,改善肠胃环境,刺激免疫反应,提高婴儿免疫力;

[0017] 综合而论,与背景技术相比,本发明利用分子量小于 10000 道尔顿乳清小肽、氨基酸类常微量元素螯合物和生物富集常微量元素酵母类物质取代了第二代常微量元素,并确定了合理的搭配,有非常显著的营养、消化和代谢效果。

具体实施方式

[0018] 下面结合实施例对本发明作进一步说明:

[0019] 实施例 1:这种抗蛋白过敏及营养婴儿配方奶粉,是由下述吨重量份的原料制成的:鲜牛奶 1000(折干物质 115)、脱盐乳清粉 500、精炼植物油 235、乳糖 45、分子量小于 10000 道尔顿乳清小肽 50、低聚果糖 20、花生四烯酸(ARA)6、二十二碳六烯酸(DHA)5、核苷酸 0.42、牛磺酸 0.45、胆碱 0.42、L-肉碱 0.06、β-胡萝卜素 0.012、复合维生素 2.5、氨基酸类常微量元素螯合物 3.5、富硒酵母粉 1.5;所述富硒酵母粉中硒含量 1000 ~ 2500mg/kg,奶粉中含有富硒酵母粉,具有增强消化功能。所述氨基酸类常微量元素螯合物是指甘氨酸钙或者天冬氨酸钙或者蛋氨酸钙或者苏氨酸钙或者赖氨酸钙中的一种或者几种。

[0020] 配方奶粉中含有分子量小于 10000 道尔顿乳清小肽, 具有调节免疫以及抗蛋白过敏的功效; 分子量小于 10000 道尔顿乳清小肽的制备方法: 乳清蛋白粉 ----- 加酶水解 ----- 蒸发浓缩 ----- 喷雾干燥 ----- 乳清小肽粉 (蛋白质 80%, 水解度 15-20%, 乳糖 ≤ 5%, 脂肪 ≤ 7%)。

[0021] 实施例 2: 与实施例 1 不同之处在于: 所述氨基酸类常微量元素螯合物是指甘氨酸锌或者蛋氨酸锌或者天冬氨酸锌或者苏氨酸锌或者赖氨酸锌中的一种或者几种。

[0022] 实施例 3: 与实施例 1 不同之处在于: 所述氨基酸类常微量元素螯合物是指甘氨酸铜或者天冬氨酸铜或者蛋氨酸铜或者苏氨酸铜或者赖氨酸铜中的一种或者几种。

[0023] 免疫调节作用及抗过敏功效初步实验: 用 18-22g 的 ICR 小鼠进行碳粒廓清试验和血清溶血素测定, 用 18-22g 的 BALB/c 小鼠进行淋巴细胞增殖反应试验和 NK(自然杀伤) 细胞活性试验, 用 180-220g 的 SD 大鼠进行被动皮肤过敏试验 (PCA)。观察乳清小肽对小鼠碳粒吞噬指数、小鼠血清半数溶血值的影响, 观察乳清小肽对小鼠淋巴细胞增殖反应的刺激指数和 NK 细胞活性的影响, 观察乳清小肽对被动皮肤过敏大鼠的蓝斑面积、蓝斑光密度 (OD) 值的影响。

[0024] 1. 试验原理及目的

[0025] 观察乳清小肽对动物机体免疫功能和被动皮肤过敏反应的影响, 说明乳清小肽对小鼠的非特异性免疫功能作用。研究乳清小肽对小鼠体内碳粒廓清功能的影响, 在一定范围内, 碳颗粒的清除速率与其剂量呈指函数关系, 即吞噬速度与血碳浓度成正比, 而与已吞噬的碳粒量成反比。用 SRBC 免疫动物后, 产生抗 SRBC 抗体 (溶血素), 利用其凝集 SRBC 的程度来检测溶血素的水平, 获得乳清小肽对 SRBC 致小鼠溶血素抗体生成的影响, 分析抑制特异性体液免疫功能的作用。研究乳清小肽对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响, 当 T 淋巴细胞受 ConA 刺激后发生母细胞转化, 活细胞特别是增殖细胞通过线粒体水解酶将 MTT (一种淡黄色的唑氮盐) 分解为兰紫色结晶而显色, 其光密度值能反映细胞的增殖情况来反映对小鼠的特异性细胞免疫功能。研究乳清小肽对小鼠 NK 细胞活性的影响, 活细胞的胞浆内含有乳酸脱氢酶 (LDH)。正常情况下, LDH 不通透过细胞膜, 当细胞受到 NK 细胞的杀伤后, LDH 释放到细胞外。LDH 可使乳酸脱氢, 进而使烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 还原成 NADH, 后者再经递氢体吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS) 还原碘硝基氯化四氮唑 (INT), INT 接受 H⁺ 被还原成紫红色甲月赞类化合物。在酶标仪上用 490nm 比色测定。研究乳清小肽对大鼠同种被动皮肤过敏反应 (PCA) 的影响, 被动皮肤过敏试验是将受试物致敏动物的血清 (含丰富的 IgE 抗体) 给正常动物皮内注射, IgE 的 Fc 端与皮肤的肥大细胞表面的特异受体结合, 形成 IgE 的复合物, 使肥大细胞致敏。当抗原攻击时, 抗原与肥大细胞表面上 IgE 的 Fab 端结合, 导致 IgE 分子结构的改变, 引起肥大细胞脱颗粒, 释放过敏介质如组胺、慢反应物质等, 使皮肤局部血管的通透性增加, 使静脉注射抗原的同时注入的伊文思蓝染料在该皮肤处渗出着色。根据局部皮肤蓝染范围或程度, 可判定血管通透性变化的大小, 继而判定皮肤过敏反应的程度。

[0026] 本试验以蒸馏水作为对照, 研究婴儿营养配方乳粉、不同剂量乳清小肽对小鼠体内碳粒廓清功能的影响、对 SRBC 致小鼠溶血素抗体生成的影响、对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响、对小鼠 NK 细胞活性的影响、对大鼠同种被动皮肤过敏反应 (PCA) 的影响等, 以期获得婴儿营养配方乳粉、乳清小肽在调节免疫、抗蛋白过敏等的功效。

[0027] 2. 受试药物

[0028] 2.1 乳清小肽,白色粉末,水解度15-20%,分子量10000D以下,经酶解、包埋、喷雾干燥等制成,收样日期:20091207,提供单位:浙江科技学院生物与化学工程院自制,贮存方法:避光、干燥、常温(25℃以下)保存,配制方法:临用前在无菌条件下用蒸馏水溶解至所需浓度;

[0029] 2.2 婴儿营养配方乳粉:白色粉末,规格:385g/罐,无乳糖蔗糖型,贮存方法:避光、干燥、常温(25℃以下)保存,配制方法:临用前在无菌条件下用蒸馏水溶解至所需浓度。

[0030] 3. 试验动物

[0031] 3.1 大鼠:SD大鼠、SPF级,体重180-220g,上海西普尔-必凯实验动物有限公司[生产许可证:SCXK(沪)2008-0016];

[0032] 3.2 小鼠:封闭群ICR小鼠,近交系BALB/c,SPF级,体重18-22g,上海西普尔-必凯实验动物有限公司[生产许可证:SCXK(沪)2008-0016];

[0033] 3.3 豚鼠:普通级,体重250-300g,雌雄兼用,湖州城区西风洋特种经济动物养殖场[SCXK(浙)2008-0037]。

[0034] 4. 实验条件

[0035] 动物实验条件:SPF级屏障系统大、小鼠饲养实验室、普通级豚鼠饲养室,温度:22±1℃,湿度:50-70%,光照:150-200Lx,12小时明暗交替,噪音<50dB。

[0036] 饮水:自来水过滤灭菌,置于高压灭菌的饮水瓶中自由饮用。

[0037] 饲料: Co^{60} 辐照无菌大、小鼠全价营养颗粒饲料。

[0038] 喂养方式:大鼠、小鼠、豚鼠自由采食。

[0039] 5. 剂量组别(剂量设置与委托方要求制定)

[0040] 5.1 小鼠用剂量:

[0041] 正常对照组:蒸馏水20ml/kg;

[0042] 模型对照组:蒸馏水20ml/kg;

[0043] 乳清小肽高剂量组:乳清小肽0.4g/kg(20mg/ml);

[0044] 乳清小肽低剂量组:乳清小肽0.2g/kg(10mg/ml);

[0045] 婴儿营养配方乳粉+10%乳清小肽:4.0g/kg含10%的乳清小肽的配方乳粉;

[0046] 婴儿营养配方乳粉+5%乳清小肽:4.0g/kg含5%的乳清小肽的配方乳粉;

[0047] 婴儿营养配方乳粉组:婴儿营养配方乳粉4.0g/kg。

[0048] 5.2 大鼠用剂量:

[0049] 正常对照组:溶剂10ml/kg;

[0050] 模型对照组:溶剂10ml/kg;

[0051] 乳清小肽高剂量组:乳清小肽0.2g/kg;

[0052] 乳清小肽低剂量组:乳清小肽0.1mg/kg;

[0053] 婴儿营养配方乳粉+10%乳清小肽:2.0g/kg含10%的乳清小肽的配方奶粉;

[0054] 婴儿营养配方乳粉+5%乳清小肽:2.0g/kg含5%的乳清小肽的配方奶粉;

[0055] 婴儿营养配方乳粉组:婴儿营养配方乳粉2.0g/kg。

[0056] 5.3 给药途径与容量

- [0057] 给口灌胃,小鼠 20ml/kg(0.2ml/10g),大鼠 10ml/kg(1ml/100g)。
- [0058] 6. 主要仪器与试剂 \ 材料
- [0059] 6.1 主要仪器
- [0060] Micro- 自动生化分析仪,荷兰 Merck Vitalab Micro ;
- [0061] HH-4 型数控恒温水浴锅,国美电器有限公司 ;
- [0062] DL-5-B 型离心机,上海安亭科学仪器厂 ;
- [0063] 一次性自控式微量吸管,椒江市医用仪器设备厂 ;
- [0064] TG-16 型高速冷冻离心机上海安亭科技仪器公司 ;
- [0065] 725 型 -86℃ 低温冰箱,美国 FORMA ;
- [0066] AG204- 电子分析天平 :瑞士 METTLER ;
- [0067] 烘箱 :国美电器 ;
- [0068] HH-4 型数控恒温水浴锅 :国美电器 ;
- [0069] 128C-340 型酶标仪 :奥地利 CliniBio ;
- [0070] CB-150 型 CO₂ 培养箱 :德国 Binder 公司 ;
- [0071] YXQ-SG41-280 电热手提压力热汽消毒器 :上海医用核子仪器厂 ;
- [0072] ZEISS AXIOVERT 200 倒置显微镜 :德国 ZEISS。
- [0073] 6.2 主要试剂与材料
- [0074] 印度墨汁,北京中西远大科技有限公司,080321,取一定墨汁,1000rpm/min,离心 10min,用生理盐水 3 倍 (V/V) 稀释 ;
- [0075] 碳酸钠 :上海虹光化工厂, AR 级, 500g/ 瓶, 051109, 使用时配成 0.1% 碳酸钠溶液 ;
- [0076] 保存液 (Alsever) :葡萄糖 2.05g, 氯化钠 0.42g ;柠檬酸钠 0.8g, 蒸馏水 100mL :无菌过滤后备用 ;
- [0077] 绵羊红细胞悬液 (SRBC) :在无菌条件下,自健康成年绵羊外颈静脉取血,置血液于有玻璃珠的三角烧瓶中轻摇 10min 以除去纤维蛋白,加入 2 倍量的保存液,置 4℃ 冰箱备用。临用时用生理盐水洗涤 3 次,经 2000rpm 离心 10min 得压积红细胞,再稀释成所需浓度。
- [0078] 豚鼠心脏采血分离血清,冻存备用 ;血红蛋白转化液 (氰化高铁血红蛋白法) :宁波慈城生化试剂厂,批号 :031114, 本试剂为 100 倍浓缩液,含碳酸氢钠 10%、高铁氰化钾 2%、氰化钾 0.5% ;
- [0079] 柠檬酸钠 :AR 级, 上海试剂一厂, 批号 : 试 -2000-07-01, 规格 : 500g ;
- [0080] 刀豆素 (ConA) :sigma 公司, 20071001 ;
- [0081] 脂多糖 (LPS) :sigma 公司, 024K4067 ;
- [0082] RPMI1640 培养液 (含 10% 小牛血清) :取 RPMI1640 培养基干粉 10.4g (规格为 1L), 加入 1000mL 超纯水溶解, 再加入 2.1g 碳酸氢钠, 4.77g 羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) , 溶解后混匀, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 4℃ 保存。量取经过 56℃ 、30 分钟灭活的胎牛血清 10mL, 加入 RPMI1640 培养液 90mL, 4℃ 保存。
- [0083] Hank' s 液 :取氯化钠 80g 、磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄ • 12H₂O) 0.6g 、氯化钾 4.0g 、磷酸二氢钾 0.6g 、硫酸镁 (MgSO₄ • 7H₂O) 2.0g 、葡萄糖 10g 、无水氯化钙 1.4g, 加水至 1000mL 为原液。配制时取原液 100mL, 加水 896mL, 加 0.5% 酚红 4mL, 混匀, 经 121℃ 、15 分钟高压灭菌,

4℃保存。临用前,加无菌 7% 碳酸氢钠溶液调 pH7.2;

[0084] 噻唑蓝 (MTT) 溶液 :sigma 公司, 27196EJ, 称取 0.5g MTT 溶于 100mL 磷酸盐缓冲液 (PBS), 使浓度为 5mg/mL, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 4℃避光保存;

[0085] 二甲基亚砜 :无锡海硕生物有限公司, 批号 :20060607, 每瓶 500mL;

[0086] K562 细胞; 乳酸锂; 硝基氯化四氮唑 (INT)、吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS)、NAD、0.2mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.2)、1% NP40 或 2.5% Triton。

[0087] 伊文思兰, 10g/ 瓶, Fluka 进口, 82-11-02。

[0088] 吸附百日咳、白喉、破伤风联合疫苗, 2ml/ 支 (4 人用剂量), 上海生物制品研究所, 2008120101, 2-8℃避光保存。

[0089] 卵清白蛋白, 白色粉末, 10g/ 瓶, 9006-59-1, sigma 产品, 杭州昊天生物技术有限公司进口分装, 密闭、置 4℃贮存。

[0090] 7. 实验方法

[0091] 7.1 乳清小肽对小鼠体内碳粒廓清功能的影响

[0092] 取体重为 18-22g 的雄性 ICR 小鼠 70 只, 按体重随机分为 7 组, 即正常对照组、模型对照组、乳清小肽高剂量组、乳清小肽低剂量组、婴儿营养配方乳粉 +10% 乳清小肽组、婴儿营养配方乳粉 +5% 乳清小肽组和婴儿营养配方乳粉对照组, 每组 10 只, 各组分别给予相应浓度的相应药物和溶剂, 每日一次, 连续给药 30 天。末次给药 24h 后, 除正常对照组尾静脉注射生理盐水, 其余各组注射印度墨汁, 称小鼠体重后, 小鼠尾巴用 75% 酒精擦拭, 从尾静脉注入稀释 4 倍的印度墨汁, 按每 10g 体重 0.1mL 计算。待墨汁注入, 立即计时。注入墨汁后 2、10min, 分别从内眦静脉丛取血 10uL, 并立即将其加到 1mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中。用 722 分光光度计在 600nm 波长处测光密度值 (OD), 以 Na₂CO₃ 溶液作空白对照。将小鼠处死, 取肝脏和脾脏, 用滤纸吸干脏器表面血污, 称重。

[0093] (以下分别用 OD₂ 和 OD₁₀ 来表示 2min 和 10min 所取血样的光密度), 按下式计算廓清指数 K 值。

[0094]

$$\text{廓清指数 } K = \frac{\text{Log}OD_2 - \text{log}OD_{10}}{T_{10} - t_2} = \frac{\log OD_2 / OD_{10}}{9}$$

[0095] K 值经体重及肝脾重换算后, 得吞噬指数 α 值:

[0096]

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times K^{1/3}$$

[0097] 7.2 乳清小肽对 SRBC 致小鼠溶血素抗体生成的影响

[0098] 7.2.1 SRBC 绵羊颈静脉取血, 将羊血放入有玻璃珠的灭菌锥形瓶中朝一个方向摇动, 以脱纤维, 放入 4℃冰箱保存备用, 可保存 2 周。

[0099] 7.2.2 制备补体采集豚鼠血, 分离出血清 (8 只豚鼠的混合血清), 将 1mL 压积 SRBC 加入到 5mL 豚鼠血清中, 放 4℃冰箱 30min, 不断振荡, 离心取上清, 分装, -70℃保存。用时以 SA 液按 1 : 8 稀释。

[0100] 7.2.3 分组给药取体重为 18-22g 的雄性 ICR 小鼠 50 只, 按体重随机分为 7 组, 即正常对照组、模型对照组、乳清小肽高剂量组、乳清小肽低剂量组、婴儿营养配方乳粉 +10% 乳清小肽组、婴儿营养配方乳粉 +5% 乳清小肽组和婴儿营养配方乳粉对照组, 每组 10 只,

各组分别给予相应浓度的相应药物和溶剂,每日一次,连续给药 30 天后免疫。

[0101] 7.2.4 免疫动物及血清分离取羊血,用生理盐水洗涤 3 次,每次离心 (2000r/min) 10min。将压积 SRBC 用生理盐水配成 20% (v/v) 的细胞悬液,每只鼠腹腔注射 0.2mL 进行免疫。4d 后,摘除眼球取血于离心管内,放置约 1h,使血清充分析出,3000r/min 离心 10min,收集血清。

[0102] 7.2.5 溶血反应取血清用 SA 缓冲液稀释 500 倍。将稀释后的血清 1mL 置试管内,依次加入 10% (v/v) SRBC 0.5mL, 补体 1mL(用 SA 液按 1 : 8 稀释)。另设不加血清的对照管(以 SA 液代替)。置 37℃ 恒温水浴中保温 15~30min 后,冰浴终止反应。2000r/min 离心 10min。取上清液 1mL, 加都氏试剂 3mL, 同时取 10% (v/v) SRBC 0.25mL 加都氏试剂至 4mL, 充分混匀, 放置 10min, 于 540nm 处以对照管作空白, 分别测定各管光密度值, 计算样品管半数溶血值 HC₅₀。

[0103]

$$\text{每只鼠的血清 HC}_{50} = \frac{\text{样品的吸光度值}}{\text{SRBC 半数溶血时的吸光度值}} \times \text{稀释倍数}$$

[0104] 7.3 乳清小肽对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

[0105] 取体重为 18~22g 的雄性 BALB/c 小鼠 60 只,按体重随机分为 6 组,即空白对照组、乳清小肽高剂量组、乳清小肽低剂量组、婴儿营养配方乳粉 +10% 乳清小肽组、婴儿营养配方乳粉 +5% 乳清小肽组和婴儿营养配方乳粉对照组,每组 10 只,各组分别给予相应浓度的相应药物或溶剂,每日一次,连续给药 30 天。进行 T、B 淋巴细胞增殖刺激指数测定,小鼠摘眼球放血致死,无菌取脾于培养基中,捣碎,用注射器抽吸吹打,使细胞分散均匀,过滤,离心,去上清,培养液洗涤 2 次。检查活细胞的百分率:脾细胞制成 (5~10) × 10⁶ 个 / mL,另取少量脾细胞悬液与等量 0.5% 锥虫蓝混匀,静置数分钟,计数核被染色的死细胞的百分数,从总细胞数中将死细胞数扣除。布板:96 孔板每孔加细胞 200 μ L,每一样重复 4 孔,同时设立空白对照。样品孔加 ConA 2.5 μ g/mL 或 LPS 5.0 μ g/mL, 对照孔不加, 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 72h。加入 MTT 10 μ L, 继续培养 4h, 弃上清液, 加入二甲基亚砜 150 μ L, 充分振荡, 于 570nm 测 OD 值。计算刺激指数:刺激指数 = 加 ConA 或 LPS 细胞孔的平均 OD 值 ÷ 对照孔的平均 OD 值。

[0106] 7.4 乳清小肽对小鼠 NK 细胞活性的影响

[0107] 取体重为 18~22g 的雄性 BALB/c 小鼠 60 只,按体重随机分为 6 组,即空白对照组、乳清小肽高剂量组、乳清小肽低剂量组、婴儿营养配方乳粉 +10% 乳清小肽组、婴儿营养配方乳粉 +5% 乳清小肽组和婴儿营养配方乳粉组,每组 10 只,各组分别给予相应浓度的相应药物或溶剂,每日一次,连续给药 30 天。进行 NK 细胞活性检测。

[0108] NK 细胞活性检测:取靶细胞 (K562 细胞 1×10⁵ cell/mL) 和效应细胞 (脾细胞 1×10⁷ cell/mL) 各 100μL (效靶比 100 : 1), 加入 96 孔培养板中;靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 100μL, 靶细胞最大释放孔加靶细胞和 1% NP40 各 100μL;上述各项均设三个复孔,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4h, 然后将 96 孔培养板以 1500r/min 离心 5min, 每孔吸取上清 100μL 置平底 96 孔培养板中, 同时加入 LDH 基质液 100μL, 反应 3min, 每孔加入 1mol/L 的 HCl 30μL, 在酶标仪 490nm 处测定光密度值 (OD)。

[0109] 按下式计算 NK 细胞活性 (NK cell activity, %) = (OD_T - (OD_S - OD_E)) / OD_T × 100%, OD_T:靶细胞空白光密度值, OD_S:样品光密度值, OD_E:效应细胞空白光密度值。

[0110] 7.5 乳清小肽对大鼠同种被动皮肤过敏反应 (PCA) 的影响

[0111] 原理 : 被动皮肤过敏试验是将受试物致敏动物的血清 (含丰富的 IgE 抗体) 给正常动物皮内注射, IgE 的 Fc 端与皮肤的肥大细胞表面的特异受体结合, 形成 IgE 的复合物, 使肥大细胞致敏。当抗原攻击时, 抗原与肥大细胞表面上 IgE 的 Fab 端结合, 导致 IgE 分子结构的改变, 引起肥大细胞脱颗粒, 释放过敏介质如组胺、慢反应物质等, 使皮肤局部血管的通透性增加, 使静脉注射抗原的同时注入的伊文思蓝染料在该皮肤处渗出着色。根据局部皮肤蓝染范围或程度, 可判定血管通透性变化的大小。

[0112] 7.5.1 制备抗血清 :

[0113] SD 大鼠, 8 只, 对每只大鼠足跖注射卵蛋白 (20mg/mL), 每个足跖注射 0.1mL, 共 0.4mL, 同时腹腔注射吸附百日咳、白喉、破伤风联合疫苗 0.5mL。隔日致敏一次, 共三次, 于末次致敏 10 天后, 从腹主动脉取血, 离心 (3000rpm, 10min), 制得抗血清。-20℃ 保存两周内备用。7.5.2 给药与被动皮肤致敏 :

[0114] 取 SD 大鼠 70 只, 随机分为 7 组, 正常对照组、模型对照组、乳清小肽高剂量组、乳清小肽低剂量组、婴儿营养配方奶粉 +10% 乳清小肽组、婴儿营养配方奶粉 +5% 乳清小肽组和婴儿营养配方奶粉对照组, 每组 10 只。各组分别给予相应浓度的相应药物或溶剂, 每日一次, 连续给药 30d, 给药第 28d, 背部脱毛, 每侧取 2 个点, 每点间隔 1.5~2.0cm, 每只大鼠背部皮内注射 1 : 5、1 : 10 稀释的抗血清, 每一稀释度注射 0.1mL。

[0115] 7.5.3 抗原攻击 :

[0116] 注射 48h 后进行抗原攻击, 各组大鼠静脉注射卵蛋白 20mg/kg, 卵蛋白用 0.5% 伊文斯蓝溶液配成 2mg/mL。每 100g 体重注射伊文斯蓝溶液 1mL。30min 后处死大鼠, 翻转背部皮肤, 测量蓝斑直径后, 用直径 8mm 的打孔器分别打下蓝斑皮片, 剪碎, 加入丙酮生理盐水 (7 : 3) 混合液 5mL, 浸泡, 在 37℃ 恒温水浴锅中放置过夜, 离心 (3000rpm, 10min), 取上清液, 分光光度计 610nm 处测定吸光度 (OD) 值。

[0117] 8. 观察指标

[0118] 8.1 碳粒吞噬指数。

[0119] 8.2 血清半数溶血值 (HC_{50})。

[0120] 8.3 淋巴细胞增殖反应的刺激指数 (SI)。

[0121] 8.4NK 细胞活性。

[0122] 8.5 蓝斑面积、蓝斑 OD 值。

[0123] 9. 统计学分析

[0124] 用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示, 计量资料应用 t 检验评价试验结果。

[0125] 10. 结果

[0126] 10.1 乳清小肽对小鼠体内碳粒廓清功能的影响

[0127] 由表 1 显示, 与正常对照组比较, 模型对照组小鼠静脉注射印度墨汁后吞噬指数明显升高 ($P < 0.01$) ; 与模型对照组比较, 给予 $0.2g \cdot kg^{-1}$ 和 $0.4g \cdot kg^{-1}$ 乳清小肽后, 小鼠碳粒吞噬指数有升高的趋势 ($P > 0.05$), 给予 $4.0g \cdot kg^{-1}$ 的婴儿营养配方奶粉、含 5% 或 10% 乳清小肽的婴儿营养配方奶粉后, 小鼠碳粒吞噬指数均明显升高 ($P < 0.05$)。

[0128] 表 1 乳清小肽对小鼠体内碳粒廓清功能的影响 ($\bar{X} \pm S$)

组别	给药剂量	吞噬指数
[0129]	正常对照组	蒸馏水 $20\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}$
	模型对照组	蒸馏水 $20\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}$
	乳清小肽低剂量组	乳清小肽 $0.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
	乳清小肽高剂量组	乳清小肽 $0.4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
	5%乳清小肽婴儿营养配方乳粉组	含5%乳清小肽的婴儿营养配方乳粉 $4.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
	10%乳清小肽婴儿营养配方乳粉组	含10%乳清小肽的婴儿营养配方乳粉 $4.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
	婴儿营养配方乳粉组	婴儿营养配方乳粉 $4.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

[0130] 注：与正常对照组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta \Delta P < 0.01$ ；与模型对照组比较， $^*P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$ ；与婴儿营养配方乳粉组比较， $aP < 0.05$ ， $aaP < 0.01$ 。

[0131] 10.2 乳清小肽对 SRBC 致小鼠溶血素抗体生成影响

[0132] 由表 2 显示，与正常对照组比较，模型对照组小鼠 SRBC 致敏后半数溶血值明显升高 ($P < 0.01$)；与模型对照组比较，给予 $0.4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 乳清小肽后，小鼠半数溶血值明显降低 ($P < 0.05$)，给予的 $4.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 婴儿营养配方乳粉后，小鼠半数溶血值明显升高 ($P < 0.01$)；与婴儿营养配方乳粉组比较，给予 $4.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 含 5% 或 10% 乳清小肽的婴儿营养配方乳粉后，小鼠半数溶血值明显降低 ($P < 0.05$ ， $P < 0.01$)。

[0133] 表 2 乳清小肽对 SRBC 致小鼠溶血素抗体生成影响($\bar{X}\pm S$)

组别	给药剂量	半数溶血值 (HC_{50})
[0134]	正常对照组	蒸馏水 $20\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}$
	模型对照组	蒸馏水 $20\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}$
	乳清小肽低剂量组	乳清小肽 $0.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
	乳清小肽高剂量组	乳清小肽 $0.4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
	5%乳清小肽婴儿营养配方乳粉组	含5%乳清小肽的婴儿营养配方乳粉 $4.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
	10%乳清小肽婴儿营养配方乳粉组	含10%乳清小肽的婴儿营养配方乳粉 $4.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
	婴儿营养配方乳粉组	婴儿营养配方乳粉 $4.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

[0136] 注：与正常对照组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta \Delta P < 0.01$ ；与模型对照组比较， *P

< 0.05 , $^{**}P < 0.01$; 与婴儿营养配方乳粉组比较, $aP < 0.05$, $aaP < 0.01$ 。

[0137] 10.3 乳清小肽对小鼠脾淋巴细胞增殖反应影响

[0138] 由表 3 显示, 与空白对照组比较, 给予 $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乳清小肽和 $4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 含 10% 乳清小肽的婴儿营养配方乳粉后, 小鼠 T 淋巴细胞 SI 值明显降低 ($P < 0.05$), 而小鼠 B 淋巴细胞 SI 值无明显变化; 与婴儿营养配方乳粉组比较, 给予 $4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 含 10% 乳清小肽的婴儿营养配方乳粉后, 小鼠 T 淋巴细胞 SI 值明显降低 ($P < 0.05$), 而小鼠 B 淋巴细胞 SI 值无明显变化。

[0139] 表 3 乳清小肽对小鼠脾淋巴细胞增殖反应影响($\bar{X} \pm S$)

[0140]

组别	给药剂量	T淋巴细胞SI值	B淋巴细胞SI值
空白对照组	蒸馏水 $20 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$	2.971 ± 0.627	1.640 ± 0.280
乳清小肽低剂量组	乳清小肽 $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	2.569 ± 0.514	1.592 ± 0.219
乳清小肽高剂量组	乳清小肽 $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$2.273 \pm 0.436^*$	1.510 ± 0.226
5%乳清小肽婴儿营养配方乳粉组	含 5% 乳清小肽的婴儿营养配方乳粉 $4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	2.444 ± 0.559	1.603 ± 0.183
10%乳清小肽婴儿营养配方乳粉组	含 10% 乳清小肽的婴儿营养配方乳粉 $4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$2.297 \pm 0.557^{*,a}$	1.515 ± 0.184
婴儿营养配方乳粉组	婴儿营养配方乳粉 $4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	3.051 ± 0.656	1.697 ± 0.520

[0141] 注: 与空白对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与婴儿营养配方乳粉组比较, $aP < 0.05$, $aaP < 0.01$ 。

[0142] 10.4 乳清小肽对小鼠 NK 细胞活性的影响

[0143] 由表 4 显示, 与空白对照组比较, 给予 $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乳清小肽后, 小鼠 NK 细胞活性无明显变化 ($P > 0.05$), 给予 $4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的婴儿营养配方乳粉、含 5% 或 10% 乳清小肽的婴儿营养配方乳粉后, 小鼠 NK 细胞活性均明显升高 ($P < 0.01$)。

[0144] 表 4 乳清小肽对小鼠 NK 细胞活性的影响($\bar{X} \pm S$)

组别	给药剂量	NK细胞活性 (%)
空白对照组	蒸馏水20ml·kg ⁻¹	68.96±8.01
乳清小肽低剂量组	乳清小肽0.2g·kg ⁻¹	67.42±5.54
[0145] 乳清小肽高剂量组	乳清小肽0.4g·kg ⁻¹	64.07±9.01
5%乳清小肽婴儿营养配方乳粉组	含5%乳清小肽的婴儿营养配方乳粉4.0g·kg ⁻¹	84.25±7.55 ^{**}
10%乳清小肽婴儿营养配方乳粉组	含10%乳清小肽的婴儿营养配方乳粉4.0g·kg ⁻¹	84.64±8.76 ^{**}
婴儿营养配方乳粉组	婴儿营养配方乳粉4.0g·kg ⁻¹	85.82±10.03 ^{**}

[0146] 注：与正常对照组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta \Delta P < 0.01$ ；与模型对照组比较， $^*P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$ ；与婴儿营养配方乳粉组比较， $aP < 0.05$ ， $aaP < 0.01$ 。

[0147] 10.5 乳清小肽对大鼠同种被动皮肤过敏反应 (PCA) 的影响

[0148] 由表 5 显示，与正常对照组比较，模型对照组大鼠卵蛋白致敏后蓝斑 OD 值和面积显著升高 ($P < 0.01$)；与模型对照组比较，给予 $0.2 g \cdot kg^{-1}$ 、 $0.4 g \cdot kg^{-1}$ 乳清小肽和 $4.0 g \cdot kg^{-1}$ 含 10% 乳清小肽婴儿营养配方乳粉后，大鼠蓝斑 OD 值和面积显著降低 ($P < 0.01$)；与婴儿营养配方乳粉组比较，给予 $4.0 g \cdot kg^{-1}$ 含 10% 乳清小肽的婴儿营养配方乳粉后，小鼠蓝斑 OD 值和面积显著降低 ($P < 0.01$)，给予 $4.0 g \cdot kg^{-1}$ 含 5% 乳清小肽的婴儿营养配方乳粉后，小鼠蓝斑 OD 值和蓝斑面积 (1 : 5) 显著降低 ($P < 0.05$)。

[0149] 表 5 乳清小肽对大鼠同种被动皮肤过敏反应 (PCA) 的影响 ($\bar{X} \pm S$)

[0150]

组别	给药剂量	蓝斑OD值		蓝斑面积 (cm ²)	
		1:5	1:10	1:5	1:10
正常对照组	蒸馏水20ml·kg ⁻¹	0.076±0.008	0.073±0.011	0.00±0.00	0.00±0.00
模型对照组	蒸馏水20ml·kg ⁻¹	1.125±0.259 ^{ΔΔ}	0.937±0.284 ^{ΔΔ}	12.80±1.52 ^{ΔΔ}	10.90±1.67 ^{ΔΔ}
乳清小肽低剂量组	乳清小肽0.2g·kg ⁻¹	0.777±0.247 ^{**}	0.632±0.141 ^{**}	10.64±1.73 ^{**}	8.16±1.43 ^{**}
乳清小肽高剂量组	乳清小肽0.4g·kg ⁻¹	0.736±0.235 ^{**}	0.610±0.133 ^{**}	9.09±1.20 ^{**}	7.13±0.86 ^{**}
 [0151]					
5%乳清小肽婴儿营养配方乳粉组	含5%乳清小肽的婴儿营养配方乳粉 $2.0 g \cdot kg^{-1}$	1.007±0.146 ^a	0.912±0.117 ^a	11.48±1.46 ^a	9.56±0.88
10%乳清小肽婴儿营养配方乳粉组	含10%乳清小肽的婴儿营养配方乳粉 $2.0 g \cdot kg^{-1}$	0.801±0.189 ^{** aa}	0.650±0.142 ^{** aa}	10.92±1.25 ^{** aa}	7.46±1.12 ^{** aa}
婴儿营养配方乳粉组	婴儿营养配方乳粉 $2.0 g \cdot kg^{-1}$	1.262±0.244	1.058±0.183	12.88±1.47	10.34±1.86

[0152] 注 :与正常对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; 与模型对照组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与婴儿营养配方乳粉组比较, $aP < 0.05$, $aaP < 0.01$ 。

[0153] 结论 :以上试验结果表明, 乳清小肽具有调节免疫作用, 能略微增强小鼠单核巨噬细胞系统的功能, 具有轻微的增强小鼠的非特异性免疫功能的作用; 乳清小肽可抑制 SRBC 免疫小鼠的溶血素抗体的产生, 抑制小鼠的特异性体液免疫功能; 并能抑制小鼠淋巴细胞的增殖反应, 抑制小鼠的特异性细胞免疫功能; 能抑制大鼠被动皮肤过敏反应的作用。婴儿营养配方乳粉对小鼠的 NK 细胞免疫功能有一定的增强作用以及对小鼠的非特异性免疫功能有增强作用。

[0154] 除上述实施例外, 本发明还可以有其他实施方式。凡采用等同替换或等效变换形成的技术方案, 均落在本发明要求的保护范围。