

Vas-kiegészítő rendszer

KIVONAT

A találmány vas-porteinhidrolizátum komplexre vonatkozik, amely élelmiszerek és italok vassal történő kiegészítésére alkalmazható. A komplexet részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinnel kelátba foglalt vasból képzik. A hidrolizált tojásfehérje-protein molekulatömege mintegy 500-10 000. A komplex kellően stabil ahhoz, hogy sterilizált termékekben, például hőkezelt termékekben legyen alkalmazható. Ezenkívül - annak ellenére, hogy stabil - a komplexben levő vas biológiai hozzáférhetősége megegyezik a vas(II)-szulfátéval.

Reg. sz.

H1

Vas-kiegészítő rendszer

A találmány olyan vas-kiegészítő rendszerre vonatkozik, amely tojásfehérje protein-hidrolizátumon alapszik, és amely élelmiszerekben és italokban alkalmazható. A találmány tárgya továbbá eljárás a rendszer előállítására, valamint élelmiszerek és italok vassal történő kiegészítésére.

A vas esszenciális nyomelem az ember és az emlősök táplálkozásában. A hemoglobinban levő hem, valamint a mioglobin, a citokrómok és különböző enzimek komponense. A vas fő szerepe abban áll, hogy részt vesz az oxigén szállításának, tárolásának és hasznosításának folyamatában. A vérszegénység gyakori előfordulásának egyik közvetlen oka - különösen gyerekek, idősök és nők körében - a nem kellő mennyiségű vas jelenléte a szervezetben. A megfelelő mennyiségű vas bevitelének szükséglete fennáll az ember teljes élete során.

A szervezet nem termel vasat, és így teljes mértékben függ a külső vas-források, azaz a táplálék vagy a táplálék-kiegészítők által biztosított vas mennyiségétől. Az ajánlott napi vasbevitel általában körülbelül 10 mg, a szükséges mennyiség azonban függ a kortól és a nemtől. Gyermekeknek, valamint nőknek a menopausa beálltáig, tovább várandós és szoptató anyáknak magasabb a vas-szükségletük.

Ezért a vashiány egy olyan lényeges táplálkozási probléma, amely nem csak a fejlődő országokban általános. A probléma egyszerűen kezelhető olyan élelmiszerek fogyasztásával, amelyek természetes módon juttatnak kellő mennyiségű vasat a szervezetbe, ez azonban nem mindig lehetséges hátrányos helyzetű társadalmi környezetben. Ezenkívül a fejlett országokban



normálisan fogyasztott élelmiszerek közül sok szintén kevés vasat tartalmaz.

Vas-forrás biztosítására sok élelmiszert és italt vassal egészítenek ki. A kiegészítőként alkalmazott szokásos vasforrás az oldható vassók, így például a vas(II)-szulfát, vas(II)-laktát, vas(II)-glükonát, vas(II)-fumarát, vas(III)-citrát, vas(III)-kolin-citrát és vas(III)-ammónium-citrát. A vas(II)-szulfát különösen általánosan alkalmazott vas-forrás, mivel jó a biológiai hasznosulása. A vas-kiegészítésnek, és különösen a vas(II)-szulfáttal való kiegészítésnek azonban káros hatásai vannak, nevezetesen a vas gyakran okoz szín- és zamatvesztést, mivel kölcsönhatásba lép a polifenolokkal és a lipidekkel, és elősegíti a káros szabadgyökös reakciókat. Ez különösen magas hőmérsékleten és oxigén, valamint fény jelenlétében fordul elő.

Így például, ha tejes csokoládéital-porhoz oldható vasforrást adunk, az ital vízzel vagy tejjel elkészítve sötétszürke lesz. Feltételezhező, hogy ez a vas és a vasra érzékeny komponensek, pl. polifenolok közötti kölcsönhatás következménye. Ezenkívül, ha tejhez, gabonafélékhez, más zsiradéktartalmú termékekhez, többnyire nagyobb telítetlen zsírsavtartalmú termékekhez oldható vas-forrást adunk, zamatváltozás lép fel a lipidek oxidálódása következtében. A lipidek oxidálódása az élelmiszerek és italok esetén nem csak az organoleptikus tulajdonságokat befolyásolja, hanem károsan hat e termékek tápértékére is. Ezek a kölcsönhatások a hőkezelés, például pasztörözés vagy sterilizálás során felgyorsulhatnak. Ezenkívül némelyik vassó-rendszer pH-ja esetleg nem kompatibilis a többi komponensével vagy befolyásolhatja a zamatot. Technikai szem-



pontból az oldható vassók korróziót okozhatnak a feldolgozó berendezésekben.

A nem-oldható vagy gyengén oldódó vas-források, például az elemi vas, vas(III)-pirofoszfát stb. biológiailag nem elégé hozzáférhető. Ezért ezek - miközben nem vagy csak csekély mértékben okoznak szín- és zamatvesztést - gyengén szívódnak fel a szervezetben.

Az említett problémák kezelése céljából próbálkozások történtek az oldható vas-források kapszulázására vagy komplex-be vitelére olyan módon, ami csökkenti reaktivitásukat, azonban fenntartja biológiai hozzáférhetőségüket. Ezek a lépések azonban nem voltak teljesen sikeresek.

A vas-források kapszulázását ismerteti például az US-3 992 555 számú irat, mely szerint a vasat olyan metabolizálható étkezési zsiradékkal vonják be, amelynek olvadáspontja körülbelül 38 °C és körülbelül 121 °C közötti. A célra megfelelőnek találták a hidrogénezett és finomított növényi olajokat, különösen a teljesen hidrogénezett gyapotmag-olajból származó desztillált monoglicerideket. Bár a vas ilyen kapszulázása a biológiai hozzáférhetőség és hasznosulás mintegy 20%-os csökkenését okozza, a szerzők állítása szerint ez elfogadható, feltéve, hogy az alkalmazott vas-forrás biológiai hozzáférhetősége jó. Az elsődleges probléma azonban az, hogy ha az élelmiszereknek bármilyen goromba feldolgozási folyamaton kell keresztülmenniük, a kapszula elroncsolódik. Következésképpen a vas kapszulázása nem alkalmazható olyan termékek esetén, amelyek hőkezelésen vagy más goromba kezelés alkalmazásával végzett feldolgozási műveleten mennek keresztül.

A vas-komplexek egy korai példáját ismerteti az US-

505 986 számú irat. Ez a komplex egy vas-albumin készítmény. Az albumin nem-módosított, de koagulált formában van. A komplexet csapadék formájában nyerik ki. Ha azonban az ilyen vas-albumin komplexeket italokban alkalmazzák, színvesztés és oxidálódás következik be. Így például a vas-albumin komplexekkel kiegészített csokoládéitalok szürkévé válnak.

Újabb vas-komplexeket ismertetnek az US-3 969 540 számú iratban, mely szerint a vasat vas(III)-formában hidrolizált kazeinnel vagy hidrolizált máj-porral viszik komplexbe. Lehetséges ligandumokként különböző további hidrolizált proteineket említene. A komplexeket oldhatatlan csapadék formájában gyűjtik össze. A komplexbe vitt vas azonban hasolóképpen nem rendelkezik elfogadható biológiai hozzáférhetőséggel.

A vas-komplexek egy másik példáját ismerteti a WO 98/48648 számú irat. Ez az irat vas(II)-vegyületek aminosavakkal vagy 2-4 aminosavat tartalmazó oligopeptidekkel kialakított kelátjait ismerteti.

Vas-komplexek további példáit ismerteti az US-4 172 072 számú irat, mely szerint a vasat lényegében teljesen hidrolizált kollagénnel viszik komplexbe. Lehetséges ligandumokként különböző további teljesen hidrolizált proteineket említene. Azt állítják azonban, hogy a komplexek savas körülmények között stabilak, mivel azonban a belekben szintén savas körülmények uralkodnak, a komplexbe vitt vas szintén nem rendelkezik elfogadható biológiai hozzáférhetőséggel. A komplexek nem eléggé erősek ahhoz, hogy megakadályozzák a színvesztést és a lipid-oxidálódást.

További példákat ismertetnek az US-4 216 144 számú iratban, ahol a vasat vas(II)-formában hidrolizált proteinnel, kü-

lönösen szójabroteinnel viszik komplexbe. A komplexben levő vas biológiai hozzáférhetőségét és hasznosulását jobbnak nevezik, mint a vas(II)-szulfátét. Ha azonban a vas-szójahidrolizátum komplexet italokban alkalmazzák, színvesztés és oxidálódás következik be. Így például a vas-szójahidrolizátum komplexszel kiegészített csokoládéital szürke lesz.

További vas-komplexeket ismertetnek a JP-2-083333 és a JP-2-083400 számú iratokban. Ezek szerint vas(II)-kazeinát komplexet alkalmaznak vérszegénység kezelésére. A komplexek azonban nem alkalmasak élelmiszerek vassal történő kiegészítésére, mivel nem eléggé stabilak. Ezek a komplexek koagulátumok formájában vannak és nehezen diszpergálhatók.

A találmány célja tehát olyan vas-kiegészítő rendszer biztosítása, amely viszonylag stabil, ugyanakkor a benne levő a vas biológia hozzáférhetősége és hasznosulása viszonylag jó.

A találmány tehát egyrészt olyan vas-proteinhidrolizátum komplexre vonatkozik, amely a vas(II)-ionokat részlegesen hidrolizált, körülbelül 500-10 000 molekulatömegű tojásfehérje-proteinnel képzett kelát formájában tartalmazza.

Meglepő módon felismertük, hogy a vas(II)-ion formájában levő vasból és a részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinnel képzett komplexek nagyon stabilak. Ezek a komplexek kellően stabilak ahhoz, hogy olyan, lipideket és polifenolokat tartalmazó termékekben alkalmazzuk, amelyek hőkezelésen mennek keresztül. A komplexekben levő vas azonban - a komplexek stabilitása ellenére - ugyanolyan mértékben hasznosul biológiailag, mint a vas(II)-szulfát, ami igen jó.

A részlegesen hidrolizált tojásfehérje-protein molekula-tömege előnyösen mintegy 2000-6000.

A találmány továbbá olyan vas-proteinhidrolizátum komplexekre vonatkozik, amelyek vas(II)-ionokat tartalmaznak, mikrobiális proteázzal részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinnel képzett kelát formájában.

Mikrobiális eredetű proteázként előnyösen gomba eredetű proteázt, közelebbről *Aspergillus oryzae*-ből nyert proteázt alkalmazunk, amely mind endo-peptidázt, mind exo-peptidázt tartalmaz.

A találmány továbbá olyan vas-proteinhidrolizátum komplexekre vonatkozik, amelyek vas(II)-ionokat tartalmaznak, részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinnel képzett kelát formájában, és a komplexek mintegy 1-2 tömeg%, vagy pedig mintegy 4,5-10 tömeg% vas(II)-iont tartalmaznak, a szárazanyagtartalomra vonatkoztatva.

A komplexek semleges pH-nál stabilak, azonban pH=3 alatt disszociálnak.

A találmány továbbá olyan sterilizált folyékony italra vonatkozik, amely lipidet és stabil vas-kiegészítő rendszert tartakaz, ahol a vas-kiegészítő rendszer vas(II)-ionokat tartalmaz, részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinnel képzett kelát formájában. Az ital lehet egy csokoládétartalmú ital.

A találmány továbbá olyan sterilizált folyékony italra vonatkozik, amely lipidet és stabil vas-kiegészítő rendszert tartakaz, ahol a vas-kiegészítő rendszer vas(II)-ionokat tartalmaz, részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinnel képzett kelát formájában. Az ital lehet tea.

Az italok sterilizálását végezhetjük hőkezeléssel vagy ultramagas hőmérsékleten végzett pasztörözéssel.

A találmány továbbá olyan italporra vonatkozik, amely lipidet és stabil vas-kiegészítő rendszert tartakaz, ahol a vas-kiegészítő rendszer vas(II)-ionokat tartalmaz, részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinnel képzett kelát formájában. Az italpor tartalmazhat csokoládét.

A találmány tárgya továbbá eljárás vas-kiegészítő rendszer előállítására, amelynek során

tojásfehérje-proteint savas körülmények között microbiális eredetű, előnyösen gomba eredetű proteázzal enzimatikusan hidrolizálunk, így részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteint kapunk,

a részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinhez savas körülmények között valamely vas(II)-forrást adunk, és

a vas-kiegészítő rendszerként képződött vas(II)-hidrolizált tojásfehérje-protein komplex pH-ját 6,5 és 7,5 érték közé emeljük.

A részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteint további hidrolizáló lépéseknek vethetjük alá, mielőtt a vas(II)-forrást adagoljuk. Gomba eredetű proteázként előnyösen *Aspergillus oryzae*-ből nyert enzimet alkalmazunk, amely mind endopeptidázt, mind exopeptidázt tartalmaz.

Az eljárás magában foglalhat egy további lépést, amelyben a vas(II)-hidrolizált tojásfehérje-protein komplexet szárítjuk, így egy port kapunk.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmányt.

A találmány alapja az a felismerés, hogy a részlegesen hidrolizált tojásfehérje-protein képes erősen komplexbe fogni a vas(II)-ionokat, ugyanakkor a vasat biológiailag hozzáférhető formában biztosítja. A képződő vas-komplexek csökkent mér-

tékben okoznak kedvezőtlen hatást, például a lipidek oxidálódását, színcsökkenést és a C-vitamin bomlását. Ez ideálissá teszi a vas-komplexeiket arra, hogy élelmiszerek és italok vassal történő kiegészítésére alkalmazzuk, különösen az olyan élelmiszerek és italok esetén, amelyeket a táplálék összetételének javítására alkalmazunk.

A vas-komplexeikben alkalmazható vas-forrás lehet bármilyen élelmiszer-minőségű vas(II)-só, így például vas(II)-szulfát, vas(II)-klorid, vas(II)-nitrát, vas(II)-citrát, vas(II)-laktát vagy vas(II)-fumarát vagy ezek keveréke. Előnyös vas-forrás a vas(II)-szulfát. A vas-forrást előnyösen vas(II)-oldat formájában alkalmazzuk.

A vas-komplexeiket úgy állítjuk elő, hogy részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteint készítünk, savas körülmények között vas-forrást adunk hozzá, majd semlegesítjük.

Részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinként körülbelül 550-10 000 molekulatömegű, előnyösen körülbelül 2000-6000 molekulatömegű proteinfrakciót tartalmazó proteint alkalmazunk. Úgy találtuk, hogy az olyan vas-komplexeik, amelyek érintetlen tojásfehérje-proteint vagy nagymértékben hidrolizált tojásfehérje-proteint tartalmaznak, nem eléggé erősek. A részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinből készült vas-komplexeik különlegesen stabilak.

A tojásfehérje-protein hidrolizálását - szokásos módon - egy vagy több lépésben végezzük. A legjobb eredményeket azonban úgy érjük el, ha a hidrolízis eljárása magában foglal egy enzimátikus hidrolízis-lépést, amelyben savas közegben egy savas proteázt alkalmazunk. Az alkalmas savas proteázok kereskedelembe kaphatók. Különösen alkalmas savas proteázokat nyer-

hetünk oly módon, hogy gombákat, így például *Aspergillus oryzae*t kontrollált körülmények között fermentálunk. Ezek a proteázok mind endo-peptidázokat, mind exo-peptidázokat tartalmaznak. Ilyen savas enzim például a VALIDASE FP-60 (Valley Research, Inc., South Bend, Indiana).

A közeget alkalmas, élelmiszer-minőségű szervesetlen vagy szerves savval tehetjük savassá. Alkalmazható savak például a foszforsav, sósav, kénsav, tejsav, almasav, fumársav, glükonsav, borostyánkősav, aszkorbinsav, citromsav. Legelőnyösebb a foszforsav. A pH-t úgy választjuk meg, hogy az enzim optimális működését biztosítsuk. A választott pH olyan, amely megfelelő az enzim optimális működéséhez. Ehhez információt kaphatunk az enzim forgalmazójától, vagy pedig egyszerű kísérletsorozatból.

A savas proteázzal végzett hidrolízis után kapott hidrolizált proteint alkalmazhatjuk ebben a formában. A hidrolizált proteint azonban kívánt esetben tovább hidrolizálhatjuk. A kívánt esetben végzett bármilyen további enzimatiszus hidrolízis-lépéshez bármilyen alkalmas enzim alkalmazható. Ilyenek például - de nem kizárólag - az ALCALASE, a FLAVORZYME és a NEUTRASE (NovoNordisk A/S, Novo Alle, Dánia), a PROZYME és a PANCREATIN (Amano International Enzyme Co., Inc., Troy, VA). Az enzimek lehetnek savas proteázok, alkálikus proteázok és semleges proteázok. E célra különösen alkalmasak az alkálikus proteázok.

Mielőtt a vas-forrást a részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinhez adagoljuk, a részlegesen hidrolizált tojásfehérje-protein pH-ját körülbelül, 3,0-5,5 értékre kell állítani. Szükség esetén a pH-t alkalmas, fent ismertetett élelmiszer-minőségű szervesetlen vagy szerves savval állíthatjuk be. A

legalkalmasabb sav a foszforsav.

Ezután a vas(II)-oldatot és a részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteint kombináljuk. Ezt előnyösen úgy végezzük, hogy a vas(II)-oldatot keverés közben - előnyösen lassan - a részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinhez adjuk. Az adagolt vas(II)-oldat mennyiségét úgy választjuk meg, hogy a kívánt mennyiségű vas(II)-iont juttassuk a készítménybe. Meglepő módon azonban úgy találtuk, hogy a vas(II)-ionok kötődése kapcsolatban van a megkötött vas(II)-ionok mennyiségével. Optimális kötődést érünk el, ha a komplex mintegy 1-2 tömeg% vagy mintegy 4,5-10 tömeg% vasat tartalmaz a szárazanyagtartalomra vonatkoztatva. Természetesen 10 tömeg%-nál több vas(II)-iont is alkalmazhatunk, azonban a kötődés és így a komplex stabilitása kissé gyengébb lesz.

Miután a vas-forrást a részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinhez adtuk, az oldatot semlegesítjük, hogy elősegítsük a vas(II)-komplex képződését. Az elegyet azonban nem szabad bázikussá tenni, hogy a kicsapódást és hidroxilionok képződését megakadályozzuk. Előnyös, ha a pH a körülbelül 6,5-7,5 tartományban van.

Szükség esetén az elegyhez lúgot adhatunk a pH semlegesítésére. A semlegesítéshez bármilyen, élelmiszer-minőségű lúgot alkalmazhatunk, így például - de nem kizárólag - nátrium-hidroxidot, kálium-hidroxidot, ammónium-hidroxidot, magnézium-hidroxidot, nátrium-karbonátot, nátrium-hidrogénkarbonátot, kálium-karbonátot, kálium-hidrogénkarbonátot. Előnyös az ammónium-hidroxid.

A lépések mindegyikét előnyösen keverés közben végezzük.

A kapott komplexeket alkalmazhatjuk folyékony formában,

ahogyan előállítottuk. Előnyösebb azonban, ha a komplexeket porrá szárítjuk. Szárításként végezhetünk fagyasztva szárítást vagy permetezve szárítást. A komplexek porrá történő permetezve vagy fagyasztva szárításához bármilyen alkalmas módszert alkalmazhatunk. Az alkalmas módszerek a technika állása szerint ismertek.

Felhasználáskor a komplexeket a kívánt élelmiszer vagy ital összetevőiként alkalmazott komponensekben juttatjuk a kérdéses élelmiszerbe vagy italba, és a komponenseket normális úton dolgozzuk fel. Bár a vas biológiai hozzáférhetősége kissé alacsonyabb, mint a vas(II)-szulfáté, úgy találtuk, hogy jóval az elfogadható határértéken belül van. A biológiai hozzáférhetőségben jelentkező statisztikai különbség a legtöbb esetben nem szignifikáns. Ezenkívül úgy találtuk, hogy a komplexek nagyon stabilak, és élelmiszerekben és italokban alkalmazva nem okoznak szín- és zamatvesztést. Úgy találtuk továbbá, hogy a komplexek nem okoznak műszaki feldolgozási problémákat, így például dugulást.

A komplexek különösen jól megfelelnek ahhoz, hogy élelmiszerekben és italokban, például gyermektápszer-koncentrátumokban és fogyasztásra kész italokban, például csokoládéitalokban és malátás tejes italokban folyékony formában alkalmazzuk. Ezek az élelmiszerek és italok a feldolgozás során hőkezelésen vagy más sterilizáló műveleten mennek keresztül, így a komplexek azon tulajdonsága, hogy ellenállnak a gőroomba kezelésnek, jelentős technológiai javítást jelent. A komplexek azonban másfajta élelmiszerekben és italokban is alkalmazhatók, így például porított italokban, gyermektápszerekben és gyermekeknek szánt gabonakészítményekben.

A komplexeket ezenkívül hobbiállatoknak szánt olyan tápokban is alkalmazhatjuk, amelyek rendszerint lipideket és vitamnokat tartalmaznak.

A komplexeket tartalmazó készítmények hasonló organoleptikus tulajdonságokkal és színnel rendelkezik, mint a ki nem egészített termékek. Ez azt az előnyt biztosítja, hogy a termékek kiegészíthetők anélkül, hogy észrevehető olyan változások következnenek be, amelyek a fogyasztók részéről az elfogadhatóságot károsan befolyásolnák. Úgy találtuk továbbá, hogy a komplexek nem bontják el a C-vitamint. Így a komplexek alkalmazhatók olyan termékekben, amelyeket kiegyensúlyozott tápértékkel kívánunk elkészíteni.

A találmány szerinti megoldást a következő példákkal szemléltetjük, a korlátozás szándéka nélkül.

1. példa

1000 g fagyasztott tojásfehérjét bemérünk egy fermentorba (Biostat^(R) M), és hagyjuk szobahőmérsékletre felmelegedni. A pH-t 85 térf.%-os H₃PO₄ adagolásával keverés közben lassan 3,0 értékre állítjuk. Az oldatot ezután 42 °C-ra melegítjük. 2,5 g savas proteázt (VALIDASE FP60 Valley Research, Inc. vagy Sout Bend, Indiana termékét) adagolunk, és az oldatot 3,0-3,3 pH-értéknél, lassú/közepes keverés közben, 16 óra hosszat hagyjuk reagálni. A savas proteáz *Aspergillus oryzae*ből származik, és mind endo-peptidázt, mind exo-peptidázt tartalmaz.

16 óra hosszat végzett reagáltatás után a pH 7,4 értékre történő emeléséhez ammónium-hidroxidot (28 térf.%-os) adagolunk. Az elegyhez 2,5 g alkális proteázt (ALCALASE 2.41, Novo Nordisk A/S) adagolunk, és az oldat hőmérsékletét keverés közben 50 °C-ra emeljük. Ez a proteáz egy *Bacillus licheni-*

formis törzsből származik, és főleg endo-peptidázt tartalmaz. Miután az oldatot 3 óra hosszat lassú/közepes keverés közben reagáltattuk, szobahőmérsékletre lehűtjük. Keverés közben 43,5 g 85 térf.%-os H_3PO_4 -t, majd 5,0 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 ml vízzel készült oldatát adagoljuk. Ezután a pH-t 28 térf.%-os ammónium-hidroxiddal keverés közben 6,7 értékre állítjuk. Az oldatot ezután 10 percig 90 °C-on hevítjük, majd szobahőmérsékletre lehűtjük.

A folyékony vas-komplexet összegyűjtjük.

2. példa

Az 1. példa szerinti módon járunk el, majd a kapott folyékony vas-komplexhez keverés közben 90 g maltodextrin M.D.5 jelű anyagot adunk. Az elegyet forgótányéros atomizálóval felszerelt permetezve szárító berendezésben szárítjuk ($T_{be}=145$ °C, $T_{ki}=80$ °C). A kapott porított vas-komplexet összegyűjtjük.

3. példa

1000 g fagyasztott tojásfehérjét bemérünk egy Biostat^(R) M fermentorba, és hagyjuk szobahőmérsékletre felmelegedni. A pH értékét 85 térf.%-os H_3PO_4 segítségével keverés közben 3,0 értékre állítjuk, majd az oldatot 42 °C-ra melegítjük. Hozzáadunk 2,5 g savas proteázt (VALIDASEFP60, Valley Research, Inc., South Bend, Indiana), és az oldatot lassú/közepes sebességű keverés közben, 3,0-3,3 pH- értékken hagyjuk 4 óra hosszat reagálni.

A reagáltatás befejezése után az oldatot szobahőmérsékletre lehűtjük, és keverés közben hozzáadjuk 5,0 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 ml vízzel készült oldatát. A pH-t ezután keverés közben 28 térf.%-os NH_4OH -val 6,7 értékre állítjuk. Az oldatot ezután 10 percig 60 °C melegítjük, majd szobahőmérsékletre lehűtjük.



Az oldathoz keverés közben hozzáadunk 90 g maltorextrin M.D.5 jelű anyagot, majd forgótányéros permetezve szárító berendezésben szárítjuk ($T_{be}=145\text{ °C}$, $T_{ki}=80\text{ °C}$). A kapott porított vas-komplexet összegyűjtjük.

4. példa

Az 1. példa szerinti módon járunk el, azzal a különbséggel, hogy tojásfehérjét hidrolizálunk 6 óra hosszat. A kapott porított vas-komplexet összegyűjtjük.

5. példa

Négy tejes csokoládéitalt készítünk tejes csokoládéitalporból (QUIK Nestlé USA, Inc.), a koncentrációt 8,5 tömeg%-ra állítjuk be. Az italok 12,5 ppm hozzáadott vasat tartalmaznak, az 1-4. példa szerinti különböző vas-komplexekből.

Az italokat 125 ml-es üvegedényekbe helyezzük, lezárjuk, és autoklávban 121 °C-on 5 percig hevítjük, majd szobahőmérsékletre lehűtjük, és 6 hónapig tároljuk.

Az italokat 1, 2, 3, 4, 5 és 6 hónap elteltével fizikai stabilitás, szín és zamat alapján kiértékeljük. A zamatot 10 személyből álló panel ítéli meg.

Az italok mindegyikéről megállapítható, hogy színük nem változik, nincs ülepedés vagy koagulálás, és a zamat jó.

6. példa

Négy tejes csokoládéitalt készítünk tejes csokoládéitalporból (QUIK Nestlé USA, Inc.), a koncentrációt 8,5 tömeg%-ra állítjuk be. Az italok 12,5 ppm hozzáadott vasat tartalmaznak, az 1-4. példa szerinti különböző vas-komplexekből.

Az italokat kb. 80 °C-ra előmelegítjük, gőzinjektálással 5 másodpercig 140 °C-on tartjuk, majd 80 °C-ra lehűtjük. Az italokat ezután körülbelül 17/3,5 Mpa nyomáson homogenizáljuk,



kb. 16 °C-ra lehűtjük, és 250 ml-es Tetra Brik Aseptic^(R) dobozokba (Tetra Pak Inc., Chicago IL) töltjük.

Az italokat 1 nap, 2 hét, majd 1 és 2 hónap elteltével fizikai stabilitás, szín és zamat alapján kiértékeljük. Az zamatot 10 személyből álló panel ítéli meg.

Az italok mindegyikéről megállapítható, hogy színük nem változik, nincs ülepedés vagy koagulálás, és a zamat jó.

7. példa

Négy tejes csokoládéitalt készítünk tejes csokoládéitalporból (QUIK Nestlé USA, Inc.), a koncentrációt 8,5 tömeg%-ra állítjuk be. Az italok 12,5 ppm hozzáadott vasat tartalmaznak, az 1-4. példa szerinti különböző vas-komplexekből.

Az italokat kb. 80 °C-ra előmelegítjük, gőzinjektálással 5 másodpercig 148 °C-on tartjuk, majd 80 °C-ra lehűtjük. Az italokat ezután körülbelül 17/3,5 Mpa nyomáson homogenizáljuk, kb. 16 °C-ra lehűtjük, és 250 ml-es Tetra Brik Aseptic^(R) dobozokba (Tetra Pak Inc., Chicago IL) töltjük.

Az italokat 1, 2, 3, 4, 5 és 6 hónap elteltével fizikai stabilitás, szín és zamat alapján kiértékeljük. Az zamatot 10 személyből álló panel ítéli meg.

Az italok mindegyikéről megállapítható, hogy színük nem változik, nincs ülepedés vagy koagulálás, és a zamat jó.

8. példa

Hat italt készítünk; hármát tejes csokoládéitalporból (QUIK Nestlé USA, Inc.), hármát pedig malátaitalporból (MILO Nestlé Austria Ltd.). Az italokag 22,0 g porból és 180 ml forróvízből készítjük. A 2-4. példa szerinti vas-komplexeke adagoljuk mind a csokládéitalokhoz, mind a malátaitalokhoz. A csokoládéitalok végső vas-koncentrációja 15,0 ppm, a maláta-



italoké 25,0 ppm.

Az italokat rövi ideig keverjük, majd szobahőmérsékleten 15 percig állni hagyjuk. 15 perc után az italokat 10 személyből álló panel zamat szempontjából elbírálja. A vasat nem tartalmazó kontroll-mintákkal összehasonlítva színváltozás és zamateltérés nem észlelhető.

9. példa

Gyermek-gabonatápszer adagokat készítünk 55 g, banánt tartalmazó szárított gyermek-gabonatápszer (Nestlé USA, Inc.) 180 ml forróvízzel történő rekonstituálásával. A 2-4. példa szerinti vas-komplexet adagoljuk, 100 g gabonaporra számítva 7,5 mg vas mennyiségben.

A gabonatápszer adagokat rövi ideig keverjük, majd 15 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk. 15 perc után a tápszer-adagokat 10 személyből álló panel zamat szempontjából elbírálja. A vasat nem tartalmazó kontroll-mintákkal összehasonlítva színváltozás és zamateltérés nem észlelhető.

10. példa

A komplexek biológiai hozzáférhetőségét a következőképpen határozzuk meg:

Állat: 3 hetes elválasztott hím Sprague-Dawley patkányokat (IFFA-CREDO, L'Arbresle, Franciaország) alkalmazunk.

Diéta: Kontrollképpen az ICN Low-iron (Soccochim SA, Lausanne, Svájc) diétát alkalmazzuk, amelynek vastartalma 3 mg/kg. Ez a diéta kazein-alapú, és a növésben levő patkányok tápanyagszükségletét biztosítja, kivéve a vasat.

Kísérleti diéták:

A diéta: kontroll-diéta 10 mg/kg vastartalomra $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -val kiegészítve.



B diéta: kontroll-diéta 20 mg/kg vastartalomra $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -val kiegészítve.

1. diéta: kontroll-diéta 10 mg/kg vastartalomra a 4. példa szerinti vas-komplexszel kiegészítve.

2. diéta: kontroll-diéta 20 mg/kg vastartalomra a 4. példa szerinti vas-komplexszel kiegészítve.

3. diéta: kontrol-diéta 10 mg/kg vastartalomra a 2. példa szerinti vas-komplexszel kiegészítve.

4. diéta: kontrol-diéta 20 mg/kg vastartalomra a 4. példa szerinti vas-komplexszel kiegészítve.

Elemzési módszerek

1) Hemoglobin-elemzést végzünk oly módon, hogy a patkányokat isoflurane-val érzéstelenítjük, és 200 μl vérmintát veszünk a szemhéj véna érhálózatából. A minta vér-hemoglobin tartalmát cián-methemoglobin módszerrel határozzuk meg (Hb kit MPR 3, Boehringer Mannheim GmbH, Németország), automata berendezés alkalmazásával (Hemocue, Baumann-Medical SA, Wetzikon, Svájc). Minden hemoglobin-meghatározáshoz kereskedelmi, hemoglobin-tartományt átfogó minőség-kontroll vérmintákat alkalmazunk (Dia-HT Kontrollblut, Dia MED, Cressier, Svájc).

2) A vas biológiai hozzáférhetőségét vas(II)-szulfát-heptahidrát-hoz viszonyítva határozzuk meg, a hemoglobinszintek alapján ferde-arány számítással. A többszörös regressziós egyenlet alapján a hozzáadott vas és a hemoglobinszint összefüggését nézzük. Az egyenlet minden diétához egy egyenest ad, amely zéró-dózisnál metszi az ordinátát. A vas-forrás biológiai hozzáférhetőségét a vas(II)-szulfát-heptahidrát-hoz viszonyítva a két ferde arányából számítjuk. Az arány 100-zal szorozva adja a relatív biológiai hozzáférhetőségi értéket.

Eljárás

A patkányokat egyenként, rozsdamentes acélráccsal ellátott polikarbonát ketrecekben tartjuk. Az állatok szabadon kapnak desztillált vizet. Az állatok anémiássá tételére a patkányok 24 napig kívánság szerint kapnak kontroll diétát. Friss takarmányt kapnak naponta.

24 nap múlva meghatározzuk a hemoglobintartalmat és a testtömeget. Hetven, 4,5-5,8 mg/dl hemoglobin-szinttel rendelkező patkányt véletlenszerűen 10 csoportba osztunk, ahol a csoportok átlagos hemoglobin-szintje körülbelül egyforma. Az egyes csoportokat 14 napig a kísérleti diéták valamelyikével takarmányozzuk. A patkányok a diétát kívánság szerint kapják, a 0. napon 20 g/nap mennyiséggel kezdve. A patkányok szabadon kapnak desztillált vizet. Az egyes takarmányfogyasztásokat naponta mérjük. 14 nap múlva meghatározzuk a patkányok testtömegét és hemoglobinszintjét.

Eredmények

Az átlagos takarmányfogyasztást és vasfelvételt nem befolyásolja a vas-forrás típusa. A hozzáadott vasat nem kapó patkányok azonban kevesebbet esznek, mint azok, amelyek vasat kapnak. A 20 mg/kg vasat kapó patkányok kissé többet esznek, mint azok, amelyek 10 mg/kg vasat kapnak.

A patkányok testtömegét nem befolyásolja a vas-forrás típusa. A hozzáadott vasat nem kapó patkányok testtömege azonban kevésbé növekszik, mint azoké, amelyek vasat kapnak. A 20 mg/kg vasat kapó patkányok testtömege kissé jobban növekszik, mint azoké, amelyek 10 mg/kg vasat kapnak.

A vér kísérlet kezdetén és végén mért hemoglobintartalmát az alábbi táblázatban foglaljuk össze.

Átlagos hemoglobintartalom (standard eltérés)

Diéta	Hozzáadott Fe (mg/kg)	Kezdeti hemoglobin (g/dl)	Végső hemoglobin (g/dl)	Különbség (g/dl)
Kontroll	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)

A relatív biológiai hozzáférhetőség a következő:

Diéta	Relatív biológiai hozzáférhetőség
1, 2	90
3, 4	98
A, B	100

A vas-protein komplexek biológiai hozzáférhetősége hasonló a vas(II)-szulfáéhoz. A 91 %-nál kisebb relatív biológiai hozzáférhetőséget tekintjük a referenciánál szignifikánsan kisebbnek. Statisztikai szempontból tehát a 2. példa szerinti vas-komplex relatív biológiai hozzáférhetősége hasonló a vas(II)-szulfátéhoz. Gyakorlati szempontból azonban a komplexek biológiai hozzáférhetősége nagyon jó.

Szabadalmi igénypontok

1. Vas-proteinhidrolizátum komplex, amely vas(II)-ionokat tartalmaz, kelátba kötve részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinnek, amelynek molekulatömege mintegy 2000-6000.

2. Az 1. igénypont szerinti komplex, amely mikrobiális eredetű proteázzal részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteint tartalmaz.

3. A 2. igénypont szerinti komplex, amely *Aspergillus oryzae*ből származó, mind endo-peptidázt, mind exo-peptidázt tartalmazó proteázzal részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteint tartalmaz.

4. Az 1. igénypont szerinti komplex, amely mikrobiális eredetű proteázzal részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteint tartalmaz, amely tojásfehérje-proteinnek *Aspergillus oryzae*ből származó, mind endo-peptidázt, mind exo-peptidázt tartalmazó proteázzal és *Bacillus licheniformis*ből származó, endo-proteinázt tartalmazó proteinázzal végzett hidrolízissel kapott hidrolizátuma.

5. Az 1. igénypont szerinti komplex, amely mintegy 1-2 tömeg%, vagy pedig mintegy 4,5-10 tömeg% vas(II)-iont tartalmaz a szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva.

6. Az 1. igénypont szerinti komplex, amely semleges pH-nál stabil, míg pH=3 érték alatt disszociál.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti komplex, amely mintegy 1-2 tömeg%, vagy pedig mintegy 4,5-10 tömeg% vas(II)-iont tartalmaz a szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva.

8. Sterilizált folyékony italkészítmény, amely lipidet és stabil vas-kiegészítő rendszert tartalmaz, amelyben a vas-

kiegészítő rendszer valamely az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vas-proteinhidrolizátum komplexet tartalmazza.

9. Sterilizált folyékony italkészítmény, amely polifenolokat és stabil vas-kiegészítő rendszert tartalmaz, amelyben a vas-kiegészítő rendszer valamely az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vas-proteinhidrolizátum komplexet tartalmazza.

10. A 9. igénypont szerinti italkészítmény, amely tea-ital.

11. Italpor, amely lipidet és stabil vas-kiegészítő rendszert tartalmaz, amelyben a vas-kiegészítő rendszer valamely az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vas-proteinhidrolizátum komplexet tartalmazza.

12. A 11. igénypont szerinti italpor, amely kakaót tartalmaz.

13. Eljárás vas-kiegészítő rendszer előállítására, amely valamely az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vas-proteinhidrolizátum komplexet tartalmazza, *azzal jellemezve, hogy*

tojásfehérje proteint mikrobiális eredetű proteázzal enzimatikusan hidrolizálunk, így részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteint kapunk,

a részlegesen hidrolizált tojásfehérje-proteinhez savas körülmények között vas(II)-forrást adunk, és

a pH értékét 6,5 és 7,5 közé emeljük, így vas-kiegészítő rendszerként vas(II)-hidrolizált tojásfehérje-protein komplexet kapunk.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft

Dr. Gárdonyi Zoltánné

~~szabadalmi ügyvivő~~

