



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101828713 A

(43) 申请公布日 2010.09.15

(21) 申请号 201010167343.9

(22) 申请日 2004.03.11

(30) 优先权数据

070669/03 2003.03.14 JP

(62) 分案原申请数据

200480012973.1 2004.03.11

(71) 申请人 明治乳业株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 金丸义敬 中村吉孝 高桥毅

永渊真也 山口真 大友英生

中泽贤一

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

A23L 1/30 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 1 页

(54) 发明名称

抗轮状病毒感染的组合物及制备该组合物的方法

(57) 摘要

本发明涉及抗轮状病毒感染的组合物及制备该组合物的方法,更具体地,本发明的发明者发现乳清的微量过滤保留物,和采用离心和/或硫酸铵沉淀处理乳清获得的产物具有抑制轮状病毒感染的活性。

1. 具有预防轮状病毒感染的活性的组合物,其中所说的组合物是如下所述获得的溶液或其脱水产物:在约 30℃ - 约 60℃ 离心乳清,进一步将所获得的乳清奶油离心以获得作为水相的乳清奶油浆液。

2. 权利要求 1 所述的组合物,其中在不高于 50℃ 离心所述乳清,且其中在不低于 50℃ 离心所述乳清奶油。

3. 权利要求 2 的组合物,其中在 30℃ -50℃ 离心所述乳清,且其中在 50℃ -80℃ 离心所述乳清奶油。

4. 权利要求 1 的组合物,其中所述离心在约 40℃ - 约 50℃ 进行。

5. 权利要求 1 或 4 的组合物,其中所述离心在 300xg-30,000xg 进行。

6. 权利要求 5 的组合物,其中所述离心在约 3,000xg 进行。

7. 权利要求 4 的组合物,其中在约 40℃ 离心所述乳清,且其中在约 50℃ 离心所述乳清奶油。

8. 权利要求 1 的组合物,其中在约 40℃、约 3,000xg 离心所述乳清,且其中在约 50℃、约 3,000xg 离心所述乳清奶油。

9. 一种制备具有预防轮状病毒感染的活性的组合物的方法,其包括下列步骤:

a) 将乳清加温到约 30℃ - 约 60℃ ;

b) 将该乳清离心以得到乳清奶油 ;

c) 将该乳清奶油加温到约 30℃ - 约 60℃ ;

d) 将该乳清奶油离心以获得作为水相的乳清奶油浆液。

10. 权利要求 9 的方法,其中在不高于 50℃ 离心所述乳清,且其中在不低于 50℃ 离心所述乳清奶油。

11. 权利要求 10 的方法,其中在 30℃ -50℃ 离心所述乳清,且其中在 50℃ -80℃ 离心所述乳清奶油。

12. 权利要求 9 的方法,其中所述加温在约 40℃ - 约 50℃ 进行。

13. 权利要求 9 或 12 的方法,其中所述离心在 300xg-30,000xg 进行。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述离心在约 3,000xg 进行。

15. 权利要求 12 的方法,其中将所述乳清加温到约 40℃,且其中将所述乳清奶油加温到约 50℃。

16. 权利要求 9 的方法,其中将所述乳清加温到约 40℃ 并在约 3,000xg 离心,且其中将所述乳清奶油加温到 50℃ 并在约 3,000xg 离心。

17. 权利要求 9、12-16 中任一项的方法,还包含下述步骤:

e) 干燥含水级分。

抗轮状病毒感染的组合物及制备该组合物的方法

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 03 月 11 日、申请号为 200480012973.1 (国际申请号为 PCT/JP2004/003185)、发明名称为“抗轮状病毒感染的组合物及制备该组合物的方法”的发明申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及抗轮状病毒感染的组合物,制备该组合物的方法,以及含有有效剂量的抗轮状病毒感染的组合物的抗轮状病毒感染的食物组合物。

背景技术

[0003] 由人类轮状病毒引起的婴儿冬季腹泻是一种会导致发热,呕吐,腹泻以及脱水的严重腹泻性疾病,主要好发于两岁及两岁以下婴儿。在日本,因为大便的浅灰色外观婴儿冬季腹泻有时候被称为白色腹泻;然而,很明显这是人类轮状病毒感染。在美国,每年遭受腹泻折磨的五岁及五岁以下孩子中有 3,500,000 被诊断为轮状病毒感染,在这些孩子中 55,000 被收治入院,20 人死亡。全世界每年大约 600,000 婴幼儿死于这种疾病,这主要发生在发展中国家。发达国家所进行的流行病调查表明仅仅靠提高卫生条件不能够降低轮状病毒感染的流行。轮状病毒疫苗在全世界的研发也因此被提升为一种对抗这种感染的对策。

[0004] 已经发现不论在发达国家还是在发展中国家,恒河猴轮状病毒四价 (RRV-TV) 疫苗在预防轮状病毒感染引起的严重腹泻方面具有较好的效果。1998 年 8 月,美国食品药品监督管理局批准 RRV-TV 疫苗作为全世界的第一个轮状病毒疫苗。然而,美国疾病预防控制中心已经报道 RRV-TV 疫苗有导致肠套叠的副作用,因此已经中止其使用 (例如,参见非专利文献 1)。

[0005] 另一方面,能够预防轮状病毒感染的食物组分或食物组合物已经得到推荐,包括初乳及初乳组合物中的免疫球蛋白 (例如参见专利文献 1),牛 κ -酪蛋白 (例如参见专利文献 2),牛奶黏液素 (参见非专利文献 2),脱脂乳衍生的多肽 (参见非专利文献 3) 等。然而,这些物质的效果没有得到评估。因此,能有效抑制轮状病毒感染的抗轮状病毒感染的新的组合物以及包含上述组合物的食物组合物的到来仍在期盼之中。

[0006] [非专利文献 1]

[0007] Ishida Shinichi et al.,“Rotavirus vaccine”The Journal of Pediatric Practice (Shonika Sinryo) Vol. 63, 2000, p. 1045-1049

[0008] [非专利文献 2]

[0009] Yolken, R. y. et al.,“Human Milk Mucin Inhibits Rotavirus Replication and Prevents Experimental Gastroenteritis”J. Clin. Invest., Vol. 90, 1992, p. 1984-1991

[0010] [非专利文献 3]

[0011] Matsumoto Mitsuharu et al.,“Buttermilk-derived anti-bovine rotavirus polypeptide”Nihon Chikusan Gakkaiho, Vol. 73, 2002, p. 49-56

- [0012] [专利文献 1]
[0013] 特开平 3-72432
[0014] [专利文献 2]
[0015] 特表平 10-505828

发明内容

[0016] 本发明的一个目标是提供能有效预防轮状病毒感染的新的食物组合物。本发明的另外一个目标是提供包含有效剂量这些组合物的食物。本发明更进一步的目标是提供含有有效剂量这些组合物的牲畜饲料。

[0017] 为实现上述目标,发明者通过研究发现,微量过滤(MF: microfiltration)处理乳清所得到的保留物,离心乳清所得到的级分,和/或用硫酸铵沉淀(也称为硫酸铵分离法,硫酸铵盐析法或硫酸铵沉淀法)乳清所得到的级分具有较强的抑制轮状病毒感染的活性。他们还发现,所述保留物或级分即使在加热后,其抑制轮状病毒感染的活性也不丧失。更具体地,本发明包括:

[0018] (1) 具有预防轮状病毒感染的活性的组合物,其中所说的组合物是乳清的微量过滤保留物,通过离心和/或硫酸铵沉淀处理乳清所得到的溶液,或它们的脱水产物;

[0019] (2) (1) 中的组合物,其中微量过滤膜的孔径为 0.004-1.4 μm ;

[0020] (3) (1) 中的组合物,其中离心力范围为 300-30000g;

[0021] (4) (1) 中的组合物,其中硫酸铵沉淀饱和度范围为 30-100%;

[0022] (5) 具有预防轮状病毒感染的活性的食物,包含有效剂量的(1)到(4)中任一种组合物;

[0023] (6) (5) 中的食物,其中食物选自婴儿配方,老人食品,健康食品和病人食品组成的群组;

[0024] (7) 具有预防轮状病毒感染的活性的牲畜饲料,包含有效剂量的(1)到(4)中任一种组合物;

[0025] (8) 使用(1)到(4)中任一种组合物制备(5)或(6)中的食物的用途;和

[0026] (9) 使用(1)到(4)中任一种组合物制备(7)中的饲料的用途。

[0027] 乳清被分为两类:甜乳清和酸乳清。甜乳清是陈年干酪的副产品,pH值为5.9到6.3,甜味。另一方面,酸乳清是在制备非陈年、新鲜干酪的过程中获得的,通常pH值为4.4到4.6,味酸。在生产酪蛋白过程中所获得的乳清也是酸乳清。甜乳清和酸乳清的大致组成见表1(Milk Science Vol. 51, No. 1, 2002)。本发明既包括甜乳清也包括酸乳清。

[0028] 本发明中所使用的乳清通过标准方法制备,使用泌乳母牛的乳汁或乳汁浓缩或脱水产物(在下文中这些总称为乳)作为起始原料。而且在本发明中也可以使用来自除人和奶牛以外的其他哺乳动物的乳。通常在澄清后,采用如高温短时(HTST)(在72℃-75℃加热15秒),超高温(UHT)(在120℃-150℃加热1-3秒)等方法对原料乳进行巴氏消毒。可以采用两种方法制备乳清:一种是制备甜乳清的方法。在这种方法中,各种粗制凝乳酶(来源于动物,微生物和植物)被加入到巴氏消毒乳或脱脂乳中。将巴氏消毒乳加热到约30-60℃,在几百或更多G的离心力下离心,去除奶油(cream)形式的脂肪使其脱脂就得到脱脂乳。换句话说,这是一种在制备硬,半硬或软干酪和粗制凝乳酶酪蛋白时以溶液形式分

离乳清的方法。第二种方法是制备酸乳清。在这种方法中,酸(有机酸,如乙酸和乳酸,或无机酸,如盐酸和硫酸)被加入到采用与上述类似方法所获得的脱脂乳中。更具体地通过使用酸将脱脂乳的 pH 值调节到 4.6,然后进行过滤,离心和类似方法去除等电点沉淀的酪蛋白,可得到酸乳清。除了这些方法之外,将产乳酸细菌单独或与氯化钙和酸一起加入到脱脂乳中,然后通过离心或类似方法去除产生的酪蛋白沉淀后得到的上清也可以作为酸乳清使用。

[0029] 表 1

[0030]

成分	甜乳清	酸乳清
总固体	6.35	6.5
水分	93.7	93.5
脂肪	0.5	0.04
总蛋白	0.8	0.75
乳糖	4.85	4.90
灰分	0.5	0.8
乳酸	0.05	0.4

[0031] (重量%)

[0032] 在甜乳清中,总固体的大约 8%是脂质(表 1)。据说这些脂质破坏乳清蛋白浓缩物(WPC)的风味。而且,乳清脂质与超滤(UF)膜,反渗透(RO)膜和其他这种膜的膜处理效率相关。相应地乳清中残留的脂质越多,膜分离期间的流速就越慢。

[0033] 在本发明中,将乳清离心/纯化,调节 pH 值到大约中性(6.8-7.2),然后进行微量过滤。进而将水加入到保留物中后进行微量过滤,重复这一过程多次(通常三次)。紧接着采用标准方法对保留物进行脱水。

[0034] 在实际应用中微量过滤的进展较慢,因为微量过滤易于堵塞。在 20 世纪 80 年代中期,研究出了一种用于乳的膜灭菌系统“Bactocatch”,已经被 ALFA-LAVAL 过滤系统(现在的 Tetra Pak)使用。

[0035] 使用 MF 膜的方法包括那些使样品流与膜表面平行(切向流过滤或交叉流过滤)的方法和那些使样品垂直于膜表面被挤压的方法(末端闭塞过滤:dead end filtration)。在乳业领域,交叉流过滤被用来处理乳制品,而末端闭塞过滤被用来清除无菌罐空气中的细菌。

[0036] Bactocatch 是一种交叉流 MF(CFMF)系统,其中 MF 膜(Membralox,由 SCT 在法国生产)由氧化铝陶瓷制成,其具有直径为 1.4 μ m 的微孔,可以阻止细菌通过,但允许酪蛋白微团通过。透过流速可被控制,这是 Bactocatch 最显著的特征,它允许在整个膜间压差约为 0.04Mpa(0.1Mpa 相当于大约一个大气压)的均一膜间压差(UTP)下操作。这样能够防止膜堵塞。因此在 50℃可以将脱脂乳渗透流速稳定为 500L/h 达七个小时,同时保持 99.9%或更高的细菌清除效率(Olsen, N. et al.:Milchwissenschaft, 44(8):p. 476, 1989)。使用用 Bactocatch 系统灭菌的乳作为起始原料生产保存期限延长(ESL)的乳已经成为可能。Bactocatch 系统也被用来从干酪原料中去除芽孢(spore)。在本发明中,一种包含

Bactocatch 系统的交叉流过滤设备被用于乳清的微量过滤中。末端闭塞过滤装置也可用于乳清的微量过滤中。另外, MF 膜的形状可以不同, 例如可以是平坦膜类型和中空纤维型, 而且材料也可以不同, 例如可以是树脂膜和陶瓷膜。合适类型的膜都可以使用。

[0037] 通过离心不能够完全去除乳清中的脂肪, 大约有 0.05% 保留在其中。当从这种乳清中生产出蛋白含量为 80% 的 WPC 时, 脂肪含量就达 5% -8% (J. L. Maubois :Bulletin of the IDF 320 :37-40, 1997)。据说这些脂质会破坏 WPC 的功能和风味 (C. V. Morr and E. Y. W. Ha :CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. , 33 :p. 431, 1993 ;J. N. de Wit, G. Klarenbeek and M. Adamse :Neth. Milk Dairy J. , 40, p. 41, 1986 ;M. T. Patel and A. Kilara :J. Dairy Sci. , 73 :p. 2731, 1990)。而且, 乳清脂质与使用超滤 (UF), 反渗透 (RO) 和其他这类方法的膜处理效率相关。因此乳清中残留的脂质越多, 膜分离中的流速就越慢 (J. N. de Wit and R. de Boer :Neth. Milk Dairy J. , 29, p. 198, 1975)。这种脂质的主要组成成分是磷脂。用 0.1um MF 膜处理可以去除这种脂质的大部分 (P. Dejimek and B. Hallstroem :Shokuhin Maku Gijutsu Kondankai, Fifth Quarterly (Spring) Research Meeting, Abstract, p. 36-45, 1993 ;A. Nielsen :Danish Dairy & Food Ind. Worldwide, 10 :72-73, 1996)。

[0038] 通常, 可以用孔径约为 0.2-0.45um 的 MF 膜对透过物进行除菌。细菌和脂肪小球几乎同样大小 (脂肪小球直径范围为 0.1-17um, 平均为 3.4um)。MF 膜的孔径通常为 0.01-12um。虽然本发明中使用的 MF 膜的孔径假定实际上为 0.1-1.4um, 但本领域技术人员使用常规实验就能确定最合适的孔径大小。

[0039] 更简单地, 当从原料乳中分离鲜奶油时, 特别是在大约 30℃ -60℃ 离心甜乳清并进一步离心所获得的乳清奶油可得到一种水相。这样获得的水相可类似地作为 MF 保留物使用。

[0040] 更进一步的, 作为对上述离心法的改良, 采用硫酸铵沉淀和离心相结合的方法处理在 95° 加热处理脱脂乳 30 分钟所获得也被称为“消化蛋白胨 (protease-peptone)”的酸乳清, 这样获得的级分也可类似地作为 MF 保留物使用。

[0041] 乳清的 MF 保留物, 即通过离心乳清所获得的溶液, 和 / 或用硫酸铵沉淀法处理乳清所获得的级分, 或其脱水产物, 具有下述实施例所示的抗轮状病毒感染的活性。而且, 在加热处理后, 这些产物还保留抗轮状病毒感染的活性。MF 保留物和其脱水产物是将 MF 和 UF 组合制备出的乳清蛋白分离物 (WPI) 的副产品。离心乳清所得的溶液和其脱水产物是以乳脂肪 (butter oil) 副产品的形式获得的。磷脂被浓缩在乳清 MF 保留物、离心乳清获得的溶液、及因此而获得的脱水产物中。

[0042] 本发明的组合物可以是热处理过的, 而且将其有效剂量与食物 (特别是婴儿配方食品和小牛饲料) 混合可有效预防或治疗由轮状病毒引起的人类婴儿, 小牛, 小马和其他这种动物的腹泻。虽然本发明组合物的有效剂量被假定为终产物重量的 0.1-50%, 实际上应该通过对人或家畜的测试来确定其有效剂量。

[0043] 轮状病毒在小肠绒毛末端约三分之一处的上皮细胞中增殖。在病毒感染后, 这些微绒毛变矮, 产生微绒毛混乱或丢失的病理变化。因此生理功能降低, 水吸收受到抑制导致腹泻。轮状病毒感染的过程始于病毒黏附靶细胞, 这包括多个步骤如病毒穿透和定居。

[0044] 依据本发明认为, 乳清 MF 保留物, 通过离心乳清所获得的溶液, 和 / 或用硫酸铵沉淀乳清所获得的级分, 及其脱水产物, 具有抗轮状病毒感染的活性是因为, 这些产物能够抑

制轮状病毒黏附到靶细胞。但是,对其作用机制还需要更进一步的解释。

[0045] 检测和评价食物组分抗轮状病毒感染的效应的方法是多样的,没有绝对的检测或评价系统。到目前为止已经报道了多种检测/评价抗轮状病毒感染的活性的方法。除了本发明中所使用的方法外,其他方法还包括将轮状病毒和食物组分给予实验动物(小鼠),记录和评价腹泻发作情况和黏附到胃肠黏膜上的轮状病毒数量的检测/评价系统(Duffy L. C. *Pediatr. Res.* 35 :690-695 (1994))。本发明的发明者通过适当地使用这些系统能更详细地检测组合物抗轮状病毒感染的活性。

[0046] 通过长期的消费使用经历已经确定了本发明中所使用的乳衍生组合物的安全性。相应地,通过人类试验可以确定本发明产品的有效性和有效剂量。

[0047] 作为抗轮状病毒感染的组合物使用时,乳衍生组合物可以以其原本的形式(液体或粉剂)直接使用,或者与其他活性成分或药学活性成分一起使用。剂型包括片剂或包衣片剂,胶囊,溶液,糖浆,乳剂或分散的粉剂。依据受试者的年龄,生理状态等参数的不同,剂量在每天 0.001-10g/kg 体重(优选每天 0.01-2g/kg 体重)的范围内不同。

[0048] 为制备抗轮状病毒感染的食物组合物,可以将有效剂量的乳衍生组合物加入到不具有抗轮状病毒感染的能力的婴儿的配方乳中,或者加入到为抗轮状病毒感染的能力降低的老人准备的食物产品中。术语“婴儿配方”指为新生儿到 12 个月大的婴儿准备的婴儿食品,为 6 到 9 个月或更大些的婴儿和幼儿(直到 3 岁)准备的成长配方(follow-up formula),为出生时体重低于 2,500g 的新生儿(低体重儿)准备的早产儿配方,以及在患牛奶过敏和乳糖不耐受等疾病的孩子的治疗过程中使用的各种配方。而且这些组合物也可用于保健食品和为病人准备的食物产品中。基于国内外趋势保健食品系统已经建立,与为特定健康目的使用的食物传统系统一致。它不仅包括普通食物也包括以片剂,胶囊等形式存在的食物。有两类保健品:用于特定健康要求的食物(个别许可型)和具有营养功能的食物(规格基准型)。还可以将有效剂量的这种组合物加入到牲畜饲料中制备抗轮状病毒感染的组合物。

[0049] 本发明还涉及:

[0050] 1. 具有预防轮状病毒感染的活性的组合物,其中所说的组合物是乳清的微量过滤保留物,通过离心和/或硫酸铵沉淀处理乳清所得到的溶液,或者它们的脱水产物。

[0051] 2. 项 1 中的组合物,其中微量过滤膜的微孔孔径为 0.004-1.4 μm 。

[0052] 3. 项 1 中的组合物,其中离心时离心力范围为 300-30000g。

[0053] 4. 项 1 中的组合物,其中硫酸铵沉淀时饱和度为 30-100%。

[0054] 5. 具有预防轮状病毒感染的活性的食物,其包含有效剂量的项 1 到 4 中任一种组合物。

[0055] 6. 项 5 的食物,其中所述食物是选自由婴儿配方食品,老人食品,保健食品和病人食品组成的群组中的一种食物。

[0056] 7. 具有预防轮状病毒感染的活性的牲畜饲料,其包含有效剂量的项 1 到 4 中任一种组合物。

[0057] 8. 项 1 到 4 所述的任一种组合物制备项 5 或 6 中所述的食物用途。

[0058] 9. 项 1 到 4 所述的任一种组合在制备项 7 中所述饲料的用途。

[0059] 附图简述

[0060] 图 1 描述了使用凝胶过滤柱 (Sephacryl S-500) 分级分离抗轮状病毒感染的组合物中的活性成分。

具体实施方式

[0061] 下面将采用实施例具体描述本发明的效果,但本发明不仅限于这些实施例。

[0062] [实施例 1] 从乳清中制备抗轮状病毒感染的组合物和其热处理产物

[0063] <材料和方法>

[0064] 将挤出的未加热的原料乳 (100kg) 参照标准方法 72℃ 15 秒巴氏消毒制备 Mozzarella 干酪。得到的乳清用 6N NaOH 将 pH 调节到 6.8, 然后离心去除奶油级分和少量酪蛋白颗粒。将去除了奶油级分和酪蛋白的乳清用微量过滤单元 (Nihon Pall Ltd.; MEMBRALOX, 0.1 μ m 微孔孔径, 入口压 3.0kg/cm², 温度 25℃) 处理, 回收保留物。将去离子水加入到所获得的保留物中, 用微量过滤装置再处理一次。重复这一过程三次。用喷雾干燥法将得到的保留物干燥。

[0065] 将上面获得的干粉溶解在蒸馏水中至浓度为 10mg/ml, 将该溶液 80℃ 热处理 30 分钟, 再用标准方法使溶液冻干, 制得热处理产物。

[0066] [实施例 2] 测定常乳来源的组合物中磷脂的含量

[0067] <材料和方法>

[0068] 测定用实施例 1 的方法从乳中制备的乳衍生组合物中的磷脂含量。首先, 将品 (10g) 溶解在 5% NaCl 溶液 (50ml) 中。加入甲醇 (100ml)。接着将氯仿 (100ml) 加入到混合物中, 搅拌后静置。回收氯仿层。再重复这一过程两次。将获得的氯仿层真空干燥, 溶解在 n- 己烷 (30ml) 中。在该溶液中加入 n- 己烷饱和的 1% 甲醇水溶液 (50ml), 搅拌后静置。回收甲醇层。再重复这一过程两次。将获得的甲醇层真空干燥后, 溶解在氯仿: 甲醇 (2 : 1) 中, 得到用于测定磷脂的样品。用 HPLC 测定所得样品中的磷脂酰乙醇胺 (PE), 磷脂酰胆碱 (PC) 和鞘磷脂 (SM) 的浓度, 从而确定其磷脂含量。

[0069] <结果和讨论>

[0070] 磷脂测定的结果 (重量百分比) 是 PE 0.69%, PC 1.36%, SM 0.85%。据报道乳中磷脂的含量为 0.04% -0.05% (Nyu No Kagaku (Science of Milk), Kaminogawa Shuichi, ed., Asakura Shoten, 1996)。因此证实, 乳中的磷脂在乳清 MF 保留物中被浓缩成高浓度。

[0071] [实施例 3] 检测常乳来源的组合物和其热处理产物抑制轮状病毒感染的活性

[0072] <材料和方法>

[0073] 测定用实施例 1 的方法从乳中制备的乳衍生组合物或者其热处理产物抑制轮状病毒感染的活性。

[0074] 用人轮状病毒 MO 株, 按如下方法, 测定常乳来源的组合物和其热处理产物样品抑制感染的活性: 将人轮状病毒 MO 株 (10^6 荧光细胞焦点形成单位 (FCFU)/ml) 0.4ml, 胰蛋白酶 (20 μ g/ml, 0.4ml) 混合, 37℃ 孵育 30 分钟。用包含 10% 胎牛血清的 Eagle's 培养基将检测样品 (已用 0.45 μ m 过滤器过滤除菌) 稀释成多种不同浓度, 每一个浓度取 50ul 分装到 0.5ml 的 Eppendorf 管中。将所制备的病毒溶液 (分别为 50ul) 加入每一管中, 37℃ 孵育 1 小时。

[0075] 使用包含 10% 胎牛血清的 Eagle's 基础培养基 (50 μ l) 代替上述的样品 (50 μ l)

作为对照。来源于恒河猴肾脏的 MA-104 细胞 ($2 \times 10^5/\text{ml}$, 每份 $100 \mu\text{l}$) 加入到每一个包含该培养溶液的 Eppendorf 管中, 混合。将每一种混合物取 $20 \mu\text{l}$ 等份试样转移到相应的玻片上, 37°C 孵育细胞 45 小时。然后用丙酮固定细胞。用能特异性识别轮状病毒 P0-13 株的 VP6 的单克隆抗体作为第一抗体, 用荧光标记的山羊抗兔 IgG 抗体作为第二抗体, 进行间接荧光抗体分析, 来检测被人轮状病毒感染的细胞的数量。

[0076] 评价感染抑制活性, 当从以下等式中获得的值 (抑制率) 低于 50% 或更低时, 判断样品具有感染抑制活性, 将具有感染抑制活性的最低样品浓度作为最低抑制活性。

[0077] $100 \times [1 - (\text{加入样品时感染的细胞数}) / (\text{对照中感染的细胞数})]$

[0078] < 结果和讨论 >

[0079] 常乳来源的组合物和其热处理产物的最小抑制活性分别是 33 和 $35 \mu\text{g}/\text{ml}$ (用牛血清白蛋白作为标准确定的蛋白浓度)。这些结果证明这些组合物具有抑制轮状病毒感染的活性, 而且这种活性几乎不受热处理影响。更进一步地本发明中采用其他起始原料和其他方法所获得的组合物也给出了几乎相同的结果。因此, 这揭示采用微滤膜从牛乳中分离的组合物具有抑制轮状病毒感染的活性, 而且这种抑制轮状病毒感染的活性具有热稳定性。

[0080] 轮状病毒感染的过程开始于病毒黏附靶细胞, 这包括多个步骤如病毒穿透和定居。在这项研究中, 当组合物先与轮状病毒混合再与靶细胞反应可抑制轮状病毒感染, 这表明组合物通过抑制轮状病毒黏附到靶细胞表现出抑制轮状病毒感染的活性。

[0081] [实施例 4]

[0082] 制备由下列成分组成的婴儿配方食品, 其包含 0.5% 的按照实施例 1 的方法从牛乳中制备的乳衍生组合物。

[0083] 表 2

	组成	每100g产品	
[0084]	蛋白质	11.7	g
	脂质	25.0	g
	碳水化合物	58.3	g
	(乳糖)	(51.0)	g
	(可溶性多糖)	(5.0)	g
	(果糖-寡糖)	(2.3)	g
	灰分	2.2	g
	水分	2.8	g
	能量	500	kcal
	本发明的组合物	0.5	g
	维生素A	1,700	IU
	维生素B1	0.30	mg
	维生素B2	0.60	mg
	维生素B6	0.30	mg
	维生素B12	2.0	μg
	维生素C	50	mg
	维生素D	370	IU
	维生素E (作为α-生育酚)	6.0	mg

[0085]	维生素K	25	μg
	泛酸	2.0	mg
	烟酸	6.0	mg
	叶酸	0.1	mg
	β-胡萝卜素	70	μg
	亚油酸	3.5	g
	α-亚麻酸	0.40	g
	花生四烯酸	24	mg
	二十二碳六烯酸	100	mg
	胆固醇	70	mg
	磷脂	200	mg
	胱氨酸	180	mg
	牛磺酸	27	mg
	核酸相关物质	14	mg
	钙	380	mg
	镁	40	mg
	钾	490	mg
	钠	140	mg
	磷	210	mg
	氯	310	mg
	铁	6.0	mg
	铜	320	μg
	锰	30	μg
	硒	7.0	μg
	肉碱	13	mg
	锌	3.0	mg

[0086] [实施例 5] 从乳清中制备抑制轮状病毒感染的组合物和其热处理产物

[0087] 将挤出的未加热的原料乳 (100kg) 参照标准方法 72°C 15 秒巴氏消毒, 制备 Gouda 干酪。得到的乳清用 6N NaOH 将 pH 调节到 6.8。类似地, 用标准方法从经过 HTST 法处理的原料乳 (100kg) 制备 Emmenthal 干酪, 得到的乳清用 6N NaOH 将 pH 调节到 6.8。通过混合并离心去除这些乳清制备物中的奶油级分和少量酪蛋白颗粒。将所获得的乳清用水稀释, 调节固体成分浓度为 1.7%, 然后使用微量过滤装置 (Exekia 陶瓷过滤器, 0.1 μm 孔径, 入口压 7.5kg/cm², 温度 50°C) 处理, 回收包含 8% 固体成分的保留物。得到的保留物进一步真空浓缩, 然后喷雾干燥。

[0088] 将获得的粉末溶解在蒸馏水中至浓度为 1mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, 然后将该溶液 141°C 热处理 5 秒钟, 再用标准方法使溶液冻干, 制得热处理产物。浓度为 10mg/ml 的溶液分别在 100°C 加热 5 分钟和 80°C 加热 30 分钟, 制得另外的热处理产物, 然后采用标准方法冻干。

[0089] [实施例 6] 检测来源于乳清的抗轮状病毒感染组合物和其热处理产物的抑制轮状病毒感染的活性

[0090] <材料和方法>

[0091] 用实施例 3 的方法测定按实施例 5 所述从原料乳中制备的乳衍生组合物或者其热处理产物抑制轮状病毒感染的活性。

[0092] 具体地,将人轮状病毒 MO 株 (10^6 荧光细胞焦点形成单位 (FCFU)/ml) 0.4ml,胰蛋白酶 ($20 \mu\text{g/ml}$, 0.4ml) 混合, 37°C 孵育 30 分钟。用包含 10% 胎牛血清的 Eagle's 基本培养基将检测样品 (每份为 50ul) (已用 $0.45 \mu\text{m}$ 过滤器过滤除菌) 预先稀释成多种不同浓度, 分装到 0.5ml 的 Eppendorf 管中。将前面制备的病毒溶液 (分别为 50ul) 加入到每一管中, 37°C 孵育 1 小时。使用包含 10% 胎牛血清的 Eagle's 培养基 ($50 \mu\text{l}$) 代替上述的检测样品 ($50 \mu\text{l}$) 作为对照。来源于恒河猴肾脏的 MA-104 细胞 ($2 \times 10^5/\text{ml}$, $100 \mu\text{l}$) 加入到每一个包含培养溶液的 Eppendorf 管中, 混合。将每一种混合物取 20ul 等份试样转移到相应的玻片上, 37°C 孵育细胞 45 小时。然后用丙酮固定细胞。通过间接荧光抗体分析 (用能特异性识别轮状病毒 PO-13 株的 VP6 的单克隆抗体作为第一抗体, 用荧光标记的山羊抗兔 IgG 血清作为第二抗体) 来检测被人轮状病毒感染的细胞的数量。与实施例 3 一样, 以最小抑制浓度表示活性。

[0093] <结果和讨论>

[0094] 即使参照制备各种食物的热处理条件对从乳清中制备的抗轮状病毒感染组合物进行加热处理, 其抑制活性几乎不降低, 见表 3。这些结果表明这种活性很可能会保留在终产品中。

[0095] 表 3. 来源于乳清的抗轮状病毒感染组合物和其热处理产物抑制轮状病毒感染的活性

[0096]

样品	最小抑制浓度* ($\mu\text{g/ml}$)
来源于乳清的抗轮状病毒感染组合物	25
这种组合物的热处理产物 (0.1% 溶液 141°C 加热 5 秒钟)	27
这种组合物的热处理产物 (0.5% 溶液 141°C 加热 5 秒钟)	34
这种组合物的热处理产物 (1% 溶液 141°C 加热 5 秒钟)	39
这种组合物的热处理产物 (1% 溶液 100°C 加热 5 分钟)	13
这种组合物的热处理产物 (1% 80°C 加热 30 分钟)	20

[0097]

[0098] * 最小抑制浓度表示为以牛血清白蛋白作为标准而确定的蛋白浓度

[0099] [实施例 7] 使用具有不同微孔孔径的微滤膜从乳清中制备的抗轮状病毒感染的组合物

[0100] 将挤出的未加热原料乳 (100kg) 离心 (8,000xg, 15 分钟, 4℃), 分离奶油, 得到脱脂乳。使脱脂乳保温 (20℃ -25℃), 加入 0.5N HCl 将 pH 值调节为 4.6。保持这种状态 15-30 分钟后离心 (3,000xg, 15 分钟, 4℃), 分离出酪蛋白, 得到酸乳清。加入 0.5N NaOH 将酸乳清 pH 值调节为 6.0, 然后使用不同微孔孔径 (0.1, 0.2, 0.3, 0.45, 0.65, 0.8, 和 1.0 μm) 的微滤膜 (纤维素混合酯型, AdvantecToyo Kaisha, Ltd) 进行微量过滤。这时的处理条件是: 入口压 3.0kg/cm²; 温度 20℃ -25℃。首先, 使用微滤膜将酸乳清浓缩 5 倍。接下来, 将水加入到浓缩溶液中, 同时进行渗滤, 直到透过微滤膜的液体的 Brix 值小于 2% 为止。最后采用标准方法将微滤保留物冻干, 用 γ-射线照射获得检测样品。

[0101] [实施例 8] 使用具有不同微孔孔径的微滤膜从乳清中制备的抗轮状病毒感染的组合物抑制轮状病毒感染的活性的测定

[0102] <材料和方法>

[0103] 用实施例 6 的方法测定按实施例 7 所述从原料乳中制备的抗轮状病毒感染的组合物抑制轮状病毒感染的活性。

[0104] <结果和讨论>

[0105] 每一份样品抗轮状病毒活性的测定结果显示在表 4 中。检测样品的最小抑制浓度表示为以牛血清白蛋白作为标准而确定的蛋白浓度。

[0106] 结果显示, 当 MF 膜的微孔孔径为 0.8μm 或更大时, MF 保留物的抗轮状病毒活性明显降低。因此, 当从乳清中制备抗轮状病毒感染的组合物时, 似乎优选微孔孔径为 0.65μm 或更小的微滤膜。

[0107] 表 4. 使用具有不同微孔孔径的微滤膜从乳清中制备的抗轮状病毒感染的组合物抑制轮状病毒感染的活性

[0108]

样品	最小抑制浓度* (μg/ml)
经过下列微孔孔径后保留的产物:	
0.1 μm 微孔孔径	25
0.2 μm 微孔孔径	81
0.3 μm 微孔孔径	36
0.45 μm 微孔孔径	52
0.65 μm 微孔孔径	61
0.8 μm 微孔孔径	>81
1.0 μm 微孔孔径	>101

[0109] * 最小抑制浓度表示为以牛血清白蛋白作为标准而确定的蛋白浓度

[0110] [实施例 9] 采用离心方法从乳清中制备的抗轮状病毒感染的组合物

[0111] 挤出的未加热原料乳 (100kg) 参照标准方法 63℃ 30 分钟巴氏消毒, 制备

Camembert 干酪。收获的乳清被分离 (pH6.0), 加热, 离心 (3,000x g, 20 分钟, 40℃) 得到乳清奶油。接下来, 将这种乳清奶油再次加热到 50℃, 离心 (3,000x g, 20 分钟, 50℃)。采用标准方法将所获得的水相 (下文简称为乳清奶油浆液) 冻干获得检测样品。

[0112] [实施例 10] 采用离心法从乳清中制备的抗轮状病毒感染的组合物抑制轮状病毒感染的活性的测定

[0113] <材料和方法>

[0114] 用实施例 6 的方法测定按实施例 9 所述从原料乳中制备的抗轮状病毒感染的组合物抑制轮状病毒感染的活性。进一步使用牛乳铁蛋白 (DMV) 作为对照进行比较。

[0115] <结果和讨论>

[0116] 每一份样品的抗轮状病毒活性的测定结果显示在表 5 中。检测样品的最小抑制浓度表示为以牛血清白蛋白作为标准而确定的蛋白浓度。

[0117] 乳清奶油浆液表现出超过牛乳铁蛋白的较强的抗轮状病毒活性。

[0118] 相应地也揭示可以只通过离心法从乳清中制备抗轮状病毒感染的组合物。

[0119] 表 5. 离心法从乳清中制备的抗轮状病毒感染的组合物抑制轮状病毒感染的活性
[0120]

样品	最小抑制浓度* (μg/ml)
乳清奶油浆液	65
牛乳铁蛋白	1787

[0121] * 最小抑制浓度表示为以牛血清白蛋白作为标准而确定的蛋白浓度。

[0122] [实施例 11] 采用硫酸铵沉淀和离心法从 95℃加热 30 分钟的脱脂乳得到的乳清中制备抗轮状病毒感染的组合物。

[0123] 将挤出的未加热原料乳 (10kg) 离心 (8,000xg, 15 分钟, 4℃), 分离出奶油, 得到脱脂乳。将脱脂乳加热 (95℃ 30 分钟), 加入 0.5N HCl 将 pH 调节到 4.6。保持这种状态 15-30 分钟, 然后离心 (5,000xg, 30 分钟, 4℃) 分离出酪蛋白, 得到酸乳清。将硫酸铵加入到酸乳清中直到饱和度为 35%。将溶液离心 (7,000xg, 30 分钟, 4℃) 去除沉淀。将硫酸铵再次加入到去除沉淀的溶液中, 这次直到饱和度为 55%。将溶液再次离心 (7,000xg, 30 分钟, 4℃) 去除沉淀。将硫酸铵又一次加入到所获得的溶液中, 这次直到饱和度为 90%。最后将溶液离心 (7,000xg, 30 分钟, 4℃) 获得沉淀。将从 90%饱和度溶液获得的沉淀溶解在蒸馏水中, 用蒸馏水透析, 采用标准方法冻干获得检测样品。

[0124] [实施例 12] 采用硫酸铵沉淀和离心法从 95℃加热 30 分钟的脱脂乳得到的乳清中制备出的抗轮状病毒感染的组合物抑制轮状病毒感染的活性的测定

[0125] <材料和方法>

[0126] 用实施例 6 的方法测定按实施例 11 所述从原料乳中制备的抗轮状病毒感染的组合物抑制轮状病毒感染的活性。

[0127] <结果和讨论>

[0128] 90%饱和度时所获得沉淀的最小抑制浓度为 50 μg/ml (以牛血清白蛋白作为标准而确定的蛋白浓度)。

[0129] 因此揭示从 95℃加热 30 分钟的脱脂乳得到的乳清 (也称为消化蛋白胨) 的硫酸

铵沉淀级分具有抗轮状病毒活性。

[0130] [实施例 13] 使用凝胶过滤柱和硫酸铵从抗轮状病毒感染的组合物中分离活性成分

[0131] 进一步分离用实施例 5 中所描述的方法从原料乳中得到的乳衍生组合物的活性成分。

[0132] 将通过喷雾干燥实施例 5 中的保留物所获得的粉末溶于蒸馏水中配成 5% 溶液，接下来 95℃ 加热 30 分钟。将溶液的一部分按如下所述的方法用 Tris-HCl 缓冲液透析过夜，得到用于凝胶过滤的样品。

[0133] 用 Milli-Q 水（超纯水）通过倾析方式置换 Sephacryl S-500HR 的溶剂（大约 480ml），反复几次。将凝胶搅拌直至均一，将凝胶轻轻地倒入配有储液槽的柱（2.6x60cm）中，将储液槽装满 Milli-Q 水密封排除空气。柱与 AKTA 探测器 10C（Amersham Pharmacia Biotech）相连。将 Milli-Q 水倒入柱中使凝胶充分沉降，接下来，移走储液槽，接上上流液接头（adapter）。用 0.05M Tris-HCl 缓冲液，pH8.0（0.15M NaCl, 1mM Na₂EDTA, 0.02% NaN₃）平衡柱。将上述的样品（11ml）加入到柱中，以 1.3ml/ 分钟的洗脱速度洗脱。在这一过程中监测洗出液在 280nm 处吸光度的变化，收集大部分通过柱的 C1 级分。将 C1 级分用蒸馏水透析过夜，由此获得的部分采用标准方法冻干作为检测样品。剩余部分进一步如实施例 11 用硫酸铵进行分离。具体是将硫酸铵加入到 C1 级分中直到饱和度为 35%。将溶液离心（7,000xg, 30 分钟, 4℃）去除沉淀。将硫酸铵再次加入到去除沉淀的溶液中，这次直到饱和度为 55%。将溶液再次离心（7,000xg, 30 分钟, 4℃）去除沉淀。将硫酸铵又一次加入到所获得的溶液中，这次直到饱和度为 90%。最后将溶液离心（7,000xg, 30 分钟, 4℃）收集沉淀。将从 90% 饱和度溶液获得的沉淀溶解在蒸馏水中，用蒸馏水透析，采用标准方法冻干获得检测样品。

[0134] [实施例 14] 使用凝胶过滤柱（Sephacryl S-500）和硫酸铵从抗轮状病毒感染的组合物中分离出的组分抑制轮状病毒感染的活性的测定

[0135] < 材料和方法 >

[0136] 用实施例 6 的方法测定按实施例 13 所述从原料乳中制备的组分抑制轮状病毒感染的活性。

[0137] < 结果和讨论 >

[0138] 每一份样品抗轮状病毒活性的测定结果显示在表 6 中。检测样品的最小抑制浓度表示为以牛血清白蛋白作为标准而确定的蛋白浓度。

[0139] 显示在用凝胶过滤柱处理后用硫酸铵盐析浓缩了活性成分。

[0140] 表 6. 使用凝胶过滤柱（Sephacryl S-500）和硫酸铵盐析分离出的组分抑制轮状病毒感染的活性

[0141]

样品	最小抑制浓度* (μg/ml)
C1	52
硫酸铵饱和度达 90% 时盐析出来的级分	11

[0142] * 最小抑制浓度表示为以牛血清白蛋白作为标准而确定的蛋白浓度。

[0143] [实施例 15] 使用离心和超滤从抗轮状病毒感染的组合物中分离活性成分

[0144] 进一步分离用实施例 5 中所描述的方法从原料乳中得到的乳衍生组合物的活性成分。

[0145] 将通过喷雾干燥实施例 5 中的保留物所获得的粉末溶于蒸馏水水中配成 10% 溶液, 加入 0.5N HCl 将 pH 调节到 4.6。保持这种状态 15-30 分钟, 然后离心 (6,000xg, 20 分钟, 4℃) 分离出沉淀和上清级分。将沉淀级分再次分散在蒸馏水中, 采用标准方法冻干, 得到检测样品 A。上清级分使用分离分子量为 10,000 的超滤膜 (Nihon Millipore) 进行超滤。处理温度为 20-25℃。首先, 使用超滤膜将上清级分浓缩至 1/4 体积, 接下来, 加入水将浓缩液稀释 4 倍, 然后采用渗滤再次浓缩至 1/4 体积。最终获得的超滤膜的保留物采用标准方法冻干, 得到检测样品 B。

[0146] [实施例 16] 使用离心和超滤从抗轮状病毒感染的组合物中分离出的组分抑制轮状病毒感染的活性的测定

[0147] < 材料和方法 >

[0148] 用实施例 6 中的方法测定按实施例 15 所述从原料乳中制备的组分抑制轮状病毒感染的活性。使用未经分级分离的样品作为对照进行比较。

[0149] < 结果和讨论 >

[0150] 每一份样品的抗轮状病毒活性的测定结果显示在表 7 中。检测样品的最小抑制浓度表示为以牛血清白蛋白作为标准而确定的蛋白浓度。

[0151] 结果揭示离心和超滤浓缩了活性成分。

[0152] 表 7. 使用离心和超滤分离出的组分抑制轮状病毒感染的活性

[0153]

样品	最小抑制浓度* (µg/ml)
未分离	49
A	19
B	16

[0154] * 最小抑制浓度表示为以牛血清白蛋白作为标准而确定的蛋白浓度

[0155] 工业实用性

[0156] 本发明提供了具有抗轮状病毒感染的活性的新的组合物。有效剂量的这种组合物可组合在婴儿配方食品中。

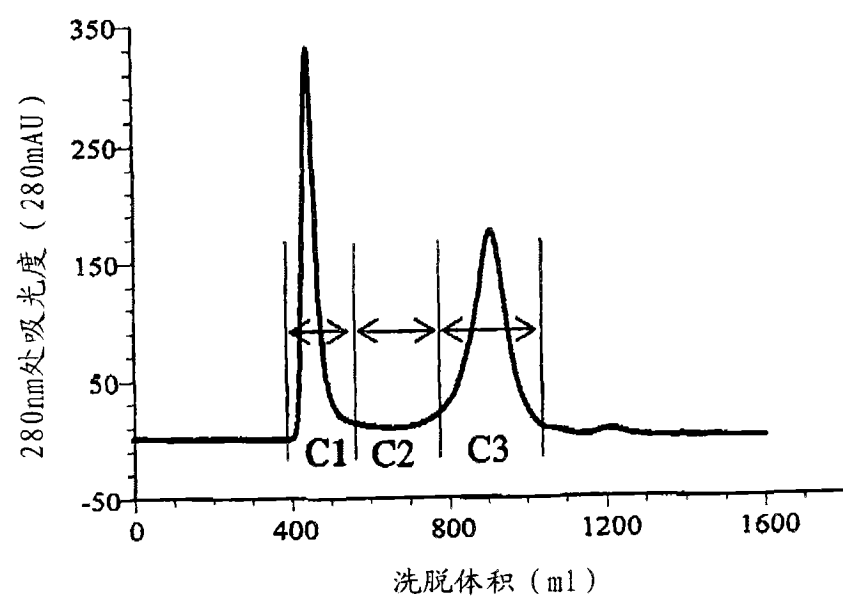


图 1