(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101168762 B
(45)授权公告日 2011.05.11

(21)申请号 200710156367.2

(22)申请日 2007.10.23

(73)专利权人 浙江大学
地址 310029 浙江省杭州市凯旋路268号浙江大学华家池校区

(72)发明人 王金玲 何国庆 董晓美 陈启和 阮晖 章海峰

(74)专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224
代理人 胡红娟

(51)Int.Cl.
C12P 21/00(2006.01)
C12R 1/10(2006.01)

(56)对比文件

吴炜亮等.ACE 抑制肽的生理功能和研究进展.《现代食品科技》.2006,第22卷(第3期),全文.

閔 英治等.来源于12种食物的短肽的ACE抑制活性.《日本食品科学工学会誌》.1996,第43卷(第7期),全文.

王海燕,张佳程.食品降血压肽的比较与评价方法.《食品与发酵工业》.2001,第27卷(第10期),全文.

审查员 马振莲

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54)发明名称

一种发酵法利用带鱼脊骨制备降血压肽的方法

(57)摘要

本发明提供一种发酵法利用带鱼脊骨制备降血压肽的方法,包括如下步骤:(1)将蔗糖、粉碎后的带鱼脊骨、蛋白胨、K_2HPO_4、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$及水配制成发酵培养基,灭菌后接种地衣芽孢杆菌,经培养得到发酵液;(2)将发酵液离心后取上清液,将上清液过滤,滤液灭酶;(3)灭酶后的滤液离心,离心上清液用活性碳脱色除味,得到脱色除味后的滤液;(4)将脱色除味后的滤液进行超滤,得到透过液,透过液真空浓缩后冷冻干燥,得到具有降血压功能的肽粉。本发明方法采用的原料来源丰富,价格低廉,操作简单,具有较强的工业化实施性。

CN 101168762 B

1. 一种发酵法利用带鱼脊骨制备降血压肽的方法，包括如下步骤：

(1) 按如下配制发酵培养基，其中每升发酵培养基中含：

蔗糖 30-50g；

粉碎后的带鱼脊骨 120-180g；

蛋白胨 4-6g；

K_2HPO_4 0.9-1.1g；

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.09-0.11g；

余量为水；

所述的发酵培养基的 PH 值为 7.0-7.5；发酵培养基灭菌后接种地衣芽孢杆菌，接种后的发酵培养基的培养条件为 37℃，培养 24h，所述的培养基经培养得到发酵液；

(2) 将步骤 (1) 得到的发酵液离心后取上清液，将上清液过滤，滤液灭酶；滤液灭酶的条件为将滤液升温至 90℃，保持 10-15min；

(3) 灭酶后的滤液离心，离心上清液用活性碳脱色除味，得到脱色除味后的滤液；

(4) 将脱色除味后的滤液进行超滤，超滤的条件为：膜截留分子量为 10kDa，工作压力 0.1-0.2MPa；得到透过液，透过液真空浓缩后冷冻干燥，得到具有降血压功能的肽粉。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于：步骤 (1) 中，每升发酵培养基中含：蔗糖 40g；

粉碎后的带鱼脊骨 150g；

蛋白胨 5g；

K_2HPO_4 1g；

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g；

余量为水。

一种发酵法利用带鱼脊骨制备降血压肽的方法

技术领域

[0001]　本发明涉及生物工程领域，尤其涉及一种以发酵法利用带鱼脊骨制备降血压肽的方法。

背景技术

[0002]　血管紧张素转换酶（ACE）在血压调节过程中扮演重要的角色。其可使无活性的血管紧张素十肽前体转化为血管紧张素，从而使血压升高。血管紧张素转换酶（ACE）抑制活性肽是血管紧张素转换酶抑制剂（ACEI）中的一种，通过抑制 ACE 的活性而达到降低血压的作用。目前已经有多种化学合成肽类药物作为 ACE 的抑制剂。这类合成降血压药物的缺点是作用时间不长，血压容易反弹，并且药物经肾脏排出容易造成肾功能的损伤。

[0003]　从天然蛋白质中提取具有营养性和生理活性的功能肽，并将这些功能肽应用到保健食品和强化营养食品当中不但能够全面利用食品及食品加工中优质蛋白质，而且能够有效的提高来源广泛的蛋白质原料的附加值，同时大大提升传统食品的科技含量。

[0004]　食品蛋白质经酶解产生的降血压肽具有食用安全性高、无副作用，特别是其对高血压患者具有降压作用，但对血压正常人无降压作用的优点，近年来受到广泛关注。目前人们已经成功地从磷虾、金枪鱼、沙丁鱼、鲣鱼、玉米、大豆、酒糟、蚕蛹、酪蛋白中获得了 ACE 抑制肽。但上述研究分离方法成本高，规模化生产的成本也较高，并且原料多为人们的生活食物。九十年代后期，国内外关于蛋白酶解肽的研究主要围绕在蛋白质的水解度、分子量大小、游离氨基酸含量、生物酶重复利用以及对苦味的控制和去除等。

[0005]　发酵法与酶法相比，不需要外加酶制剂，因此更为经济，适于工业化生产。其直接利用微生物发酵，分解底物蛋白产生活性肽类物质。目前国内关于微生物发酵法生产降血压肽的研究涉及乳蛋白、大豆、玉米、蛋类、家蚕等，尚属起步阶段。

[0006]　带鱼（Trichiurus japonicus）属鲈形目、带鱼科、带鱼属，俗名刀鱼、裙带鱼、牙带、白带鱼等，带鱼脊骨是带鱼加工后的主要下脚料，俗称带鱼鱼排。目前其主要用于饲料工业，对于利用带鱼脊骨的利用及深度加工尚属空白。

发明内容

[0007]　本发明提供一种以带鱼脊骨为原料制备对血管紧张素转换酶（ACE）具有抑制作用的降血压肽的方法。

[0008]　一种发酵法利用带鱼脊骨制备降血压肽的方法，包括如下步骤：

[0009]　(1) 发酵培养基的制备

[0010]　按如下配制发酵培养基，其中每升发酵培养基中含：

[0011]　蔗糖　30-50g；

[0012]　粉碎后的带鱼脊骨　120-180g；

[0013]　蛋白胨　4-6g；

[0014]　K_2HPO_4　0.9-1.1g；

[0015] $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.09-0.11g；

[0016] 余量为水；

[0017] 发酵培养基灭菌后接种地衣芽孢杆菌，接种后的发酵培养基经培养得到发酵液；接种后的发酵培养基的培养条件为置于旋转摇床上 37℃，200rpm，培养 24h。发酵培养基的 PH 值为 7.0-7.5，一般用稀盐酸或稀氢氧化钠溶液调节；灭菌条件为 121℃灭菌 30min；

[0018] 作为优选，每升发酵培养基中含：

[0019] 蔗糖 40g；

[0020] 粉碎后的带鱼脊骨 150g；

[0021] 蛋白胨 5g；

[0022] K_2HPO_4 1g；

[0023] $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g；

[0024] 余量为水。

[0025] (2) 降血压肽的制备

[0026] 取步骤 (1) 得到的发酵液 3000rpm 离心 30min 后取上清液，将上清液过滤，滤液置于 100℃水浴快速升温至 90℃左右，保持 10-15min 灭酶；

[0027] (3) 灭酶后滤液迅速冷却至室温，3000rpm 离心 15min，取离心上清液加入 25％(重量比)的活性碳，过滤得到脱色除味后的滤液；

[0028] (4) 取步骤 (3) 得到的脱色除味厚的滤液进行超滤，得到透过液，透过液真空浓缩后冷冻干燥，得到具有降血压功能的肽粉。

[0029] 超滤的条件为：膜截留分子量为 30kDa，工作压力 0.1-0.2MPa，工作温度 20-45℃。

[0030] 本发明方法的优点是：

[0031] 1. 本发明所制备的降血压肽是带鱼脊骨经微生物发酵而得，具有抑制 ACE 活性的作用，对高血压患者具有降压作用，安全、无毒副作用，对血压正常者可起到保健作用，对正常血压无影响。

[0032] 2. 本发明所采用的原料来源丰富，价格低廉，经过本发明的技术转化可以有效的提高带鱼脊骨这种水产加工下脚料的经济附加值，对继续促进水产加工业的发展有重要的意义。

[0033] 3. 本发明的产品可以作为药品、保健食品、食品、食品添加剂、药物增效剂等，工艺科学合理，操作简单，具有较强的工业化实施性。

具体实施方式

[0034] 实施例 1

[0035] 地衣芽孢杆菌在接种前的培养条件为：

[0036] 培养基 (g/L)：牛肉膏，4.0；蛋白胨，6.0；酵母膏，2.0；NaCl，5.0；pH，7.5。121℃灭菌 30min。

[0037] 培养条件：250mL 三角瓶装 25mL 种子培养基，接地衣芽孢杆菌(预先在斜面上培养基保存的菌丝体)，置于旋转摇床上 37℃，200rpm，培养 16-18h，得到接种液，此时接种液中菌体生物量(干重)为 0.4-0.5g/L。

[0038] 降血压肽的制备：

[0039] 于250mL三角瓶中称取匀浆后的带鱼脊骨（水分76.22%，蛋白质含量12.17%，浙江省宁波超星海洋生物制品有限公司提供）4.5g，蔗糖1.2g，蛋白胨0.15g，K_2HPO_4，0.03g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.003g，加水25mL，调节pH为7.5。121℃灭菌30min。

[0040] 按体积比加入3%的接种液（接种量一般在3-5%，过高过低均会影响转化效果），于摇床上37℃，200rpm，培养24h后，得到发酵液，将发酵液在J-6M型大容量冷冻离心机(BECKMAN公司）3000r/min的4℃条件下离心30分钟，上清液过滤，得滤液4kg。滤液置于100℃水浴快速升温至90℃左右，保持10-15min，灭酶。然后迅速冷却至室温，3000rpm离心15min，上清液按25%加入活性碳脱色除味，过滤。滤液利用中空纤维聚砜超滤膜（截留分子量10KDa）进行超滤，工作压力0.2MPa，工作温度25℃，得到透过液3.37kg。利用真空浓缩机将透过液浓缩至0.5kg，进行冷冻干燥，得到具有降血压功能的肽粉0.045kg，肽含量为92.43%，产品得率为6%（初始带鱼骨为750g），色泽乳白色细腻，利用体外检测ACE抑制活性的CUSHMAN法，测得其IC_{50}为0.516mg/ml。

[0041] 实施例2 降血压肽的制备

[0042] 于5L发酵罐中称取匀浆后的带鱼脊骨（水分76.22%，蛋白质含量12.17%，浙江省宁波超星海洋生物制品有限公司提供）600g，蔗糖160g，蛋白胨20g，K_2HPO_4，4g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.4g，加水3400mL，调节pH为7.5。121℃灭菌30min。

[0043] 按体积比加入3%的接种液，37℃，搅拌培养24h后，得到发酵液，发酵液在J-6M型大容量冷冻离心机(BECKMAN公司）3000r/min的4℃条件下离心30分钟，上清液过滤，得滤液3.6kg。滤液置于100℃水浴快速升温至90℃左右，保持10-15min，灭酶。然后迅速冷却至室温，3000rpm离心15min，上清液按25%加入活性碳脱色除味，过滤。滤液利用中空纤维聚砜超滤膜（截留分子量10KDa）进行超滤，工作压力0.2MPa，工作温度30℃，得到透过液3.02kg。利用真空浓缩机将透过液浓缩至0.4kg，进行冷冻干燥，得到具有降血压功能的肽粉0.029kg，肽含量为90.88%，产品得率为4.83%，色泽乳白色细腻，利用体外检测ACE抑制活性的CUSHMAN法，测得其IC_{50}为0.639mg/ml。

[0044] 实施例3 降血压肽的制备

[0045] 于5L发酵罐中称取匀浆后的带鱼脊骨（水分76.22%，蛋白质含量12.17%，浙江省宁波超星海洋生物制品有限公司提供）300g，葡萄糖160g，K_2HPO_4，4g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.4g，加水3600mL，调节pH为7.5。121℃灭菌30min。

[0046] 按体积比加入3%的接种液，37℃，搅拌培养24h后，得到发酵液，发酵液在J-6M型大容量冷冻离心机(BECKMAN公司）3000r/min的4℃条件下离心30分钟，上清液过滤，得滤液3.35kg。滤液置于100℃水浴快速升温至90℃左右，保持10-15min，灭酶。然后迅速冷却至室温，3000rpm离心15min，上清液按25%加入活性碳脱色除味，过滤。滤液利用中空纤维聚砜超滤膜（截留分子量10KDa）进行超滤，工作压力0.2MPa，工作温度40℃，得到透过液3.07kg。利用真空浓缩机将透过液浓缩至0.4kg，进行冷冻干燥，得到具有降血压功能的肽粉0.013kg，肽含量为88.45%，产品得率为4.33%，色泽乳白色细腻，利用体外检测ACE抑制活性的CUSHMAN法，测得其IC_{50}为0.834mg/ml。