



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104195205 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201410398311. 8

A23L 1/305(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 08. 13

A61P 39/06(2006. 01)

(66) 本国优先权数据

201410169000. 4 2014. 04. 24 CN

(71) 申请人 吉林省金梓源生物科技有限公司

地址 136400 吉林省四平市双辽市经济开发区辽西工业园区(福耀路和经开大街交汇处)

(72) 发明人 刘爽 庞海 庞玉 邓小霞

(51) Int. Cl.

C12P 21/06(2006. 01)

C07K 14/78(2006. 01)

A61K 38/39(2006. 01)

A61K 8/65(2006. 01)

A61Q 19/02(2006. 01)

A61Q 19/08(2006. 01)

A61Q 19/00(2006. 01)

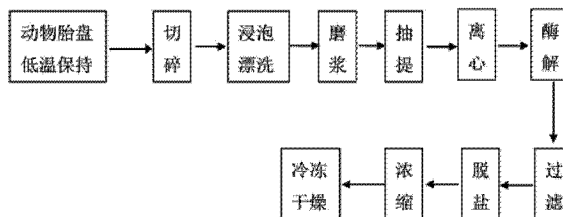
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

从动物胎盘制备高活性胶原蛋白肽的方法与所制备的高活性胶原蛋白肽及其用途

(57) 摘要

本发明公开了一种从牛胎盘制备高活性胶原蛋白肽(Collagen Peptide, CP)的新型方法。所述方法包括如下步骤:哺乳动物胎盘的低温保持,切碎,浸泡漂洗,磨浆,抽提,离心,酶解,过滤,脱盐,浓缩,冷冻干燥步骤。本发明的方法具有抽提效果好,所获得高活性胶原蛋白肽具有纯度高,高活性等特点,通过而且制备含有胶原蛋白产品容易吸收的特点。本发明方法操作简单,生产成本低廉,适用于大规模工业化生产,实现了从牛胎盘中高效制备高活性胶原蛋白肽的目的。



1. 一种从哺乳动物胎盘制备高活性胶原蛋白肽的方法,其特征在于,所述的方法包括以下步骤:哺乳动物胎盘的低温保持,切碎,浸泡漂洗,磨浆,抽提,离心,酶解,过滤,脱盐,浓缩,冷冻干燥步骤。

2. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述的抽提为酸抽提。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述的酸为醋酸。

4. 如权利要求 1-3 所述的方法,其特征在于,所述的方法包括以下具体步骤:

1) 取冷冻牛胎盘,切碎后加入 5-10 倍体积的水,过夜浸泡,冲洗除去血液成分,骨泥磨磨浆后,加入 20-40 倍体积的 2-10%醋酸浸提 6-12 小时,14000 转 / 离心 30-60 分钟,收集沉淀得胶原蛋白粗品;

2) 向胶原蛋白粗品加 3-5 重量体积去离子水,搅拌混匀,调 pH7-9.0,加入胶原蛋白粗品重量的 0.1%胰蛋白酶,水解 6-8 小时,得酶解胶原蛋白肽粗品;

3) 酶解胶原蛋白肽粗品用 0.2 微米的滤膜过滤,过滤液用 400-500 道尔顿的纳滤膜脱盐 3-5 次,再浓缩到含蛋白肽 4-10%,除菌过滤,冷冻干燥制备高活性的牛胎盘胶原蛋白肽冻干粉。

5. 如权利要求 4 所述的方法,其具体步骤为:

1) 冷冻牛胎盘,切碎后加入 5-10 倍体积的水,过夜浸泡除去血液成分,骨泥磨磨浆后,加入 20-40 倍体积的 2-10%醋酸浸提 6-12 小时,14000 转 / 离心 30-60 分钟,收集沉淀得胶原蛋白粗品;

2) 胶原蛋白粗品加 3-5 重量体积去离子水,搅拌,调 pH7-9.0,加入胶原蛋白粗品重量的 0.1%胰蛋白酶,水解 4-8 小时,得酶解胶原蛋白肽粗品;

3) 酶解胶原蛋白肽粗品用 0.2 微米的滤膜过滤,过滤液用 400-500 道尔顿的纳滤膜脱盐 3-5 次,再浓缩到含蛋白肽 4-10%,除菌过滤,冷冻干燥制备高活性的牛胎盘胶原蛋白肽冻干粉。

6. 如权利要求 1-5 所述方法制备的胶原蛋白肽,所述胶原蛋白肽具有大于 20%的 ACE 抑制率和低于 0.65mg/mL  $IC_{50}$ 。

7. 如权利要求 6 所述的胶原蛋白肽,其特征在于,当胶原蛋白肽浓度为 0.5mmol/mL 时,其具有超过 40%以上的 ACE 抑制率;且当胶原蛋白肽浓度为 1mmol/mL 时,其具有超过 60%以上的 ACE 抑制率;和低于 0.55mg/mL  $IC_{50}$ 。

8. 如权利要求 7 所述的胶原蛋白肽,其特征在于,当胶原蛋白肽浓度为 0.5mmol/mL 时,其具有大于 45%的 ACE 抑制率;且当胶原蛋白肽浓度为 1mmol/mL 时,其具有大于 65%的 ACE 抑制率;和低于 0.55mg/mL  $IC_{50}$ 。

9. 如权利要求 6-8 所述的胶原蛋白肽的用途,所述的用途包括将所述的胶原蛋白肽用于制备预防和 / 或防治人类老化的药物、食品、保健品或化妆品中的应用。

10. 如权利要求 8 所述的用途,其特征在于:在本发明的又一个实施方式中,将所述药物、食品、保健品或化妆品制备成口服制剂、外用制剂、吸入制剂、经鼻制剂、经直肠制剂、经皮制剂或注射制剂,优选为外用剂型或注射制剂。

## 从动物胎盘制备高活性胶原蛋白肽的方法与所制备的高活性胶原蛋白肽及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及从牛胎盘中制备高活性胶原蛋白肽的方法,属于蛋白质生物化学工程和医药领域。

### 背景技术

[0002] 以下描述利于读者理解。所提供的信息或引用的参考文献都不能被认为是本发明的现有技术。

[0003] 胎盘 (placenta) 又名“紫河车”为常用中药材料,民间常将其煮烂食之。我国传统中医理论认为:胎盘性甘、咸,归肺、肝、肾经,功能为补气、养血、益精,可用作滋补、养颜、强壮之药。现代生物学及医学研究证明:胎盘除含有多种免疫球蛋白、生物活性肽等之外,还含有丰富的胶原蛋白。

[0004] 胶原蛋白 (Collagen) 又称胶原,是由三条肽链拧成的螺旋形纤维状蛋白质,是细胞外结缔组织最重要的水不溶性纤维蛋白,是构成细胞外基质的骨架,占人体蛋白质总量的 25% -30%,是人体内含量最多的蛋白质。结缔组织除了含 60 ~ 70% 的水分外,胶原蛋白占了约 20 ~ 30%,因为有高含量的胶原蛋白,结缔组织具有了一定的结构与机械力学性质,如张力强度、拉力、弹力等以达到支撑、保护的功能。胶原蛋白在细胞外基质中形成半晶体的纤维,给细胞提供抗张力和弹性,并在细胞的迁移和发育中起重要作用。胶原蛋白在各种动物中都有存在。脊椎动物中腱、软骨和骨中的胶原非常丰富,几乎占了蛋白总重的一半。胶原蛋白的基本结构单位是原胶原 (tropocollagen),原胶原蛋白肽链的一级结构具有 (Gly-x-y)<sub>n</sub> 重复序列,其中 x 常为脯氨酸 (Pro), y 常为羟脯氨酸 (Hypro) 或羟赖氨酸 (Hyllys)。Hyllys 残基可发生糖基化修饰,其糖单位有的是一个半乳糖残基 (Gal),但通常是二糖 (Glu-Gal-),胶原蛋白上的糖所占的量约为胶原蛋白的 10%。原胶原是由三条  $\alpha$ -肽链组成的纤维状蛋白,相互拧成三股螺旋状构型,长 300nm,直径 1.5nm。胶原蛋白,主要存在于人和动物的皮肤、骨骼、眼睛、牙齿、肌腱、内脏(包括心、胃、肠、膀胱、血管、肺、气管、脑等)部位,所有组织脏器都含有不同数量和种类的胶原蛋白,其功能是维持组织器官的形态和结构,也是修复各损伤组织的重要原料物质。人体胶原蛋白有 28 种,不同部位所含的胶原蛋白的类型也各不相同。在人体皮肤成份中,以 I 型、III 型居多,有 70% 是由胶原蛋白所组成目前已发现 20 个左右的基因分别在不同组织中编码不同类型的胶原蛋白;不同类型的胶原蛋白定位于体内的特定组织,也有 2-3 种不同的胶原存在于同一组织中。

[0005] 当胶原蛋白不足时,不仅皮肤及骨骼会出现问题,对内脏器官也会产生不利影响。胶原蛋白是维持身体正常活动所不可缺少的重要成份。同时也是使身体保持年轻、防止老化的物质。另外,服用胶原蛋白还可以预防疾病,改善体质,对美容和健康都很有帮助。

[0006] 不同生产方法制备的胶原蛋白,其品质和功效差异很大。确切地说,用低温、低酸碱度方法生产的胶原蛋白最为理想,完全保持了胶原蛋白的原有构象,生物活性最佳。目前,市面上或进口的胶原蛋白产品品质参差不齐,一些是用明胶(英文学名 Gelatin) 制备

的所谓“胶原蛋白”，其实是明胶蛋白，是一些失去活性的混合蛋白，未经任何提取过程，质量极差。还有一些“酶解胶原蛋白”，事实上也是变性胶原蛋白的一种，因为它们在生产过程中，为了去除脂肪，使用火碱处理，火碱是蛋白质的强变性剂，完全破坏了胶原蛋白的三维结构，丧失了大部分胶原蛋白的生物活性。使用该胶原蛋白的产品在美容和保健品产品中，实际应用过程中效果低。不能满足于世界对胶原蛋白的客观需求。

[0007] 基于解决现有技术方法中长期存在的制备的胶原蛋白变性程度高，急需提供一种能够制备活性高胶原蛋白的方法。本发明的发明人通过大量的科学实验，意外地发现在制备胶原蛋白，即使不使用传统技术的火碱脱脂方法，采用本发明的酸抽提法，经历动物胎盘的低温处理，切碎，浸泡漂洗，磨浆，抽提，离心，酶解，过滤，脱盐，浓缩，冷冻干燥等步骤制备高活性和高纯度的胶原蛋白多肽。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种从动物胎盘制备高活性胶原蛋白肽的方法，其特征在于，所述的方法包括以下步骤：动物胎盘的低温保持，切碎，浸泡漂洗，磨浆，抽提，离心，酶解，过滤，脱盐，浓缩，冷冻干燥步骤。

[0009] 在本发明的又一个方面，利用酸抽提的方法从所述动物胎盘提取胶原蛋白，所述的酸为有机酸或无机酸，优选为醋酸。

[0010] 在本发明的一个具体方面，提供了一种从动物胎盘制备高活性胶原蛋白肽的方法，所述的方法包括以下具体步骤：

[0011] 1) 取冷冻牛胎盘，切碎后加入 5-10 倍体积的水，过夜浸泡除去血液成分，骨泥磨磨浆后，加入 20-40 倍体积的 2-10% 醋酸浸提 6-12 小时，14000 转 / 离心 30-60 分钟，收集沉淀得胶原蛋白粗品；

[0012] 2) 胶原蛋白粗品加 3-5 重量体积去离子水，搅拌，调 pH7.0-9.0，加入胶原蛋白粗品重量的 0.1% 胰蛋白酶，水解 6-8 小时，得酶解胶原蛋白肽粗品。

[0013] 3) 酶解胶原蛋白肽粗品用 0.2 微米的滤膜过滤，过滤液用 400-500 道尔顿的纳滤膜脱盐 3-5 次，再浓缩到含蛋白肽 4-10%，除菌过滤，冷冻干燥制备高活性的牛胎盘胶原蛋白肽冻干粉。

[0014] 在本发明的一个具体方面，提供了一种从动物胎盘制备高活性胶原蛋白肽的方法，所述的方法的具体步骤为：

[0015] 1) 冷冻牛胎盘，切碎后加入 5-10 倍体积的水，过夜浸泡除去血液成分，骨泥磨磨浆后，加入 20-40 倍体积的 2-10% 醋酸浸提 6-12 小时，14000 转 / 离心 30-60 分钟，收集沉淀得胶原蛋白粗品；

[0016] 2) 胶原蛋白粗品加 3-5 重量体积去离子水，搅拌，调 pH7-9.0，加入胶原蛋白粗品重量的 0.1% 胰蛋白酶，水解 4-8 小时，得酶解胶原蛋白肽粗品。

[0017] 3) 酶解胶原蛋白肽粗品用 0.2 微米的滤膜过滤，过滤液用 400-500 道尔顿的纳滤膜脱盐 3-5 次，再浓缩到含蛋白肽 4-10%，除菌过滤，冷冻干燥制备高活性的牛胎盘胶原蛋白肽冻干粉。

[0018] 在本发明的另一个方面，提供了一种胶原蛋白肽，其以对 ACE(血管紧张素转换酶)抑制的百分率和 IC<sub>50</sub> 来表征。如果以对 ACE(血管紧张素转换酶)抑制的百分率作为

活力参数,当使用浓度 0.1mmol/L 本发明所制备的胶原蛋白肽制品时,超过 25% 的 ACE 被抑制,例如大于 27%,大于 30%,甚至大于 35% 的 ACE 被抑制;当使用浓度为 0.5mmol/L 时,超过 45% 以上的 ACE 被抑制,例如大于 48% 以上或者大于 55% 以上的 ACE 被抑制;当使用浓度为 1mmol/L 时,超过 65 以上的 ACE 被抑制,例如大于 70% 以上或者大于 75% 以上的 ACE 被抑制。 $IC_{50}$  是衡量 ACE 抑制剂效果的指标,也是对胶原蛋白的活性衡量指标。利用本发明方法所制备的各种心管胶原蛋白的  $IC_{50}$  均低于 0.60mg/mL,例如低于 0.58mg/mL、0.55mg/mL、0.50mg/mL、0.45mg/mL、0.40mg/mL。

[0019] 在本发明的另一个方面,提供了一种胶原蛋白肽产品,其具有大于 20% 的 ACE 抑制率;优选为大于 25%,例如大于 30%、40%、45,再例如大于 48%,甚至大于 50% 都有可能。并且,  $IC_{50}$  低于 0.65mg/mL,例如低于 0.60mg/mL、0.55mg/mL、0.45mg/mL、0.35mg/mL、0.20mg/mL。

[0020] 在本发明的另一个方面,提供了通过本发明方法制备的胶原蛋白制品的用途,所述的用途包括将所述的胶原蛋白用于预防和/或防治受试者老化的药物、食品、保健品或化妆品中的应用,合适地,所述的受试者为哺乳动物,优选地,所述的受试者为人类。

[0021] 在本发明的另一个方面,将所述药物、食品、保健品或化妆品制备成口服制剂、外用制剂、吸入制剂、经鼻制剂、经直肠制剂、经皮制剂或注射制剂,优选为外用剂型或注射制剂。

[0022] 本发明的优点在于所制备的胶原蛋白活性高,纯度高。本发明的方法操作简单,生产成本低廉,适用于大规模工业化生产,实现了从牛胎盘中高效制备胶原蛋白资源。离心和过滤所得到的滤液由于不含有任何有害物质,不会污染环境。本工艺几乎不产生固形废弃物,没有垃圾,无需专门进行垃圾处理。

## 附图说明

[0023] 图 1、牛胎盘胶原蛋白肽生产工艺流程图。

[0024] 图 2、马尿酸含量测定标准曲线。

[0025] 图 3、不同胶原蛋白的 ACE 活性抑制效果。

[0026] 图 4、不同胶原蛋白的  $IC_{50}$  比较。

## 具体实施方式

[0027] 为了提供对本发明的实质性理解,在下文中以不同的详细程度描述了本发明的某些方面、模式、实施方式、变型和特征。

[0028] 在实施本发明的过程中,使用了生物化学、蛋白质生物化学、蛋白质生物工程、制药工艺学、医学、病理学、动物实验学等很多传统技术。这些技术是熟知的。

[0029] 在本发明的一个实施方式中,本发明提供了一种从哺乳动物胎盘制备高活性胶原蛋白肽的新型方法。所述方法包括如下步骤:包括新鲜哺乳动物低温保持,切碎,浸泡漂洗,磨浆,抽提,离心,酶解,脱盐,浓缩,冷冻干燥步骤。

[0030] 所述哺乳动物可源自于任何种类的动物,包括陆生的或者水生的哺乳动物,本文的陆生哺乳动物包括但不限于人类、猩猩,猴、牛、水牛、野牛、猪、野猪、羊(例如羊羔、绵羊、山羊)、驴、鹿、骆驼、鼠类、马等,本文的水生哺乳动物包括但不限于鲸鱼、河马、海豹等。

因此本文中的哺乳动物是指能够提供胎盘的一切哺乳动物,并且用该胎盘制备胶原蛋白。

[0031] 术语“一”,“一种”和“该”:除非内容清楚指明,否则本说明和所附的权利要求中使用的单数形式“一”,“一种”和“该”包括复数的引用对象。例如,所提及的“一种胎盘”包括单独一种哺乳动物胎盘,两种不同哺乳动物胎盘或更多种哺乳动物胎盘的组合等。

[0032] 在本发明的又一实施方式中,提供了哺乳动物胎盘的低温保持方法。所述胎盘可以整块冷冻保存,也可以成数个大块甚至切碎保存。本发明可以直接使用新鲜的胎盘组织也可以使用低温保持过的胎盘组织。

[0033] 术语“低温保持”包括“冷藏保持”和“冷冻保藏”两种方式。

[0034] 在另一个实施方式中,冷藏保持可在低于约 10°C 的温度下将哺乳动物胎盘温育,例如在 0°C 以上至约 9°C 之间,适合地在约 1°C 至约 8°C,适合地在约 2°C 至约 6°C 之间,优选在约 2°C 至约 4°C 之间温育。

[0035] 在一个实施方式中,可将哺乳动物胎盘冷藏保持几十分钟至 7 天甚至更长时间。有时候出于生产目的需要,如果环境温度比较低,甚至不用专门冷藏保持设备。例如东北的秋季,温度较低时候。如果需要冷藏,有时只需要冷藏保持数十分钟,几个小时,或 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天。但出于微生物腐败和异味等因素考虑,往往不会超过 7 天。

[0036] 在另一个实施方式中,可在低于约 0°C 的温度下将哺乳动物胎盘冷冻保藏,例如在 0°C 以下至约 -180°C (比如液态氮) 之间,适合地在约 -20°C 至约 -180°C。考虑到电力消耗和原材料运营成本等诸多因素,适合地在约 -25°C 至约 -80°C 之间,优选在约 -25°C 至约 -40°C 之间冷冻保藏。

[0037] 在一个实施方式中,适合地,可将哺乳动物胎盘冷冻保藏约 1 天至 35 天甚至更长时间,适合地冷冻保藏约 2 天至 20 天之间,优选冷冻保藏约 5 天至 10 天之间。

[0038] 在另一个实施方式中,可在低于约 -0°C 的温度下将所述肉与所述组合物一起冷冻保藏,例如在 0°C 以下至约 -180°C (比如液态氮) 之间,适合地在约 -20°C 至约 -80°C,适合地在约 -25°C 至约 -80°C 之间,优选在约 -25°C 至约 -40°C 之间冷冻保藏。

[0039] 当将所述胎盘组织在低于约 0°C (比如液态氮) 的温度下将所述肉与所述组合物一起冷冻保藏时,例如在 0°C 以下至约 -180°C 之间,适合地在约 -20°C 至约 -80°C,更适合地在约 -25°C 至约 -80°C 之间,优选在约 -25°C 至约 -40°C 之间冷冻保藏约 5 天至 8 天。

[0040] 在本发明的又一个具体实施方式中,将动物胎盘切成切片、块、丝、条、剁碎成末状和 / 或机械粉碎成糜状,优选为末状或糜状。使其形状更有利于充分如下抽提步骤。

[0041] 低温保持可以采取多阶段方式进行,例如先将动物组织在液氮中速冻数十分钟,然后放入 -80°C 冰箱冷冻保藏过夜,在放置于 -25°C 冰箱中冷冻保藏备用。

[0042] 在本发明的又一个具体实施方式中,对切碎的胎盘进行了浸泡和漂洗。浸泡可以用 1-10 倍或者 10 倍以上的清水来进行,环境温度可以在 0-25°C 直接任意温度进行,通常为浸泡过夜,对于浸泡效果本领域技术人员可以根据实际观察的胎盘组织的状态做出选择。漂洗可以进一步去除胎盘中的漂浮的脂肪和血水,通常漂洗 2 次以上,例如 3 次,4 次,5 次等。

[0043] 在本发明的又一个具体实施方式中,对浸泡漂洗后的胎盘进行了酸抽提。所述的酸包括有机酸或无机酸。

[0044] 本文中的术语“有机酸”是指单独一种有机酸,或将两种以上的有机酸。本文仅为

举例性质,用于本发明的所述有机酸选自甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、乳酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉桂酸、硬脂酸、亚麻酸、油酸、亚油酸、芥酸、肉豆蔻酸、葡萄糖酸、棕榈酸,适合地为乳酸、月桂酸、肉桂酸、花生酸、硬脂酸、亚麻酸、油酸、葡萄糖酸、亚油酸、棕榈酸、苹果酸、琥珀酸、酒石酸、马来酸、甲基马来酸、富马酸、甲基富马酸、草酸、丙二酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸、壬二酸、苹果酸、琥珀酸、酒石酸、马来酸、柠檬酸等。

[0045] 术语“无机酸”包括含有卤素、碳、氮、硼、硅、磷、硫等原子的含有氧或者非含有氧原子的所有无机酸;仅为举例性质例如:碳酸、硫酸、亚硫酸、醋酸、硼酸、硝酸、亚硝酸、焦磷酸、亚磷酸、磷酸、氯酸、次氯酸、重铬酸、溴酸、次溴酸、碘酸、次碘酸等;用于本发明的无机酸可以是一种或两种以上的无机酸,优选地,所述无机酸为醋酸、碳酸、硫酸、亚硫酸、硝酸、亚硝酸、焦磷酸、亚磷酸、磷酸所组成的组的一种或两种以上的;更优选地,所述无机酸为醋酸。

[0046] 上述酸可以为固体或者是液体,如果是固体一般用水溶解后稀释使用。也可以将一种或一种以上的有机酸和无机酸混合使用。

[0047] 按照体积比,用于抽提的胎盘组织沉淀与液体酸的体积比(vol:vol)为1:1-40,优选为1:1-20;更优选为1:1-10,最优选为1:1-5。酸的浓度根据具体酸的性质而定,使用醋酸的情况下,可以是1%-20%,例如1%-15%,1-10%,2-10%。

[0048] 上述抽提的pH为1-6.8,例如pH为6.7、6.6、6.5、6.4、6.2、6.1、6.0、5.9、5.8、5.7、5.6、5.5、5.4、5.3、5.2、5.1有时候低于5都有可能,例如pH低于4.5、4.0、3.5、3.0,甚至低于2.0。

[0049] 抽提的温度可以选择在室温中进行,也可以在低于室温下进行,低于20°C,优选低于10°C,更优选低于6°C,最优选低于4°C。

[0050] 抽提时间依据抽提温度、抽提效果和胶原蛋白性质来决定,例如2-24小时,例如,4-20小时,6-16个小时;即使抽提超过24小时也是可能的。在一些实例中进行了过夜抽提,即抽提在通常在8-12小时。本领域技术人员会根据抽提液的浓度和效果选择合理的抽提时间。

[0051] 整个实施例的温度条件可以控制在1-18°C,例如1-16°C,1-14°C,1-10°C,优选低于8°C,更优选低于6°C,最优选低于4°C。

[0052] 本发明的另一具体实施方式是对抽提后样品采用了离心操作,离心可以采用实验室常用的各种离心设备,例如真空离心机,或非真空离心机。按照转速可以分为低速、高速和超速离心机。按照是否制冷,分为冷冻离心机或者常温离心机。工业化生产常用的离心机,例如高速连续离心机。

[0053] 通常离心力大小以g为单位进行计算转速的设定,离心力可以在100000g以上,也可以在1000g至20000g之间,例如1000g至10000g之间,优选为8000g,更优选为100000g。

[0054] 离心也可以以每分转速来表示,例如,在1000、1500、2000、3000、5000、10000转以上,15000转以上,20000转甚至100000转以上。

[0055] 离心温度可以可以选择在室温中进行,也可以在低于室温下进行,例如低于20°C,或低于15°C,优选为低于10°C,更优选为6°C,或低于4°C。

[0056] 离心时间可以为任何时间,基于不能使离心时间过长导致过多的杂质沉淀而导致收量降低,同时过长时间也容易导致胶原蛋白变性。通常选择1个小时以内,例如40分钟,

30 分钟,或 20 分钟

[0057] 离心后可以有效去除含有杂质的上清液,保留含有胶原蛋白的沉淀粗品。

[0058] 本发明的另一具体实施方式是对上述离心后胶原蛋白的沉淀粗品进行酶水解(利用水解蛋白酶分解胶原蛋白)。本发明使用的水解蛋白酶分解胶原蛋白可以为任何酶,包括但不限于胰蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶中性蛋白酶、酸性蛋白酶等,优选为胰蛋白酶。

[0059] 上述酶水解时间可以在 24 小时以上,也可以在 24 小时以内,但为了水解效水果和避免水解带来的降解,比较合适的水解时间为 12 小时以内,例如 2-12 小时,2-10 个小时,4-8 个小时。优选为 8 小时,更优选为 6 小时,最优选为 4 小时。

[0060] 在本发明的又一个实施方式中,提供了对酶解胶原蛋白肽粗品过滤和纳滤脱盐的方法,过滤采用了利用板框压滤机和纳滤机过滤。常用的板框压滤机有手动板框压滤机、机械板框压滤机和液压板框压滤机,过滤机通常装有过滤膜,膜的大小可以任意调节,例如 5 微米、2 微米、1 微米、0.5 微米、0.2 微米、0.1 微米、0.05 微米等等。同时采用纳滤机进行浓缩脱盐,常用的纳滤机有中空纤维柱式纳滤机和反渗透纳滤机。纳滤机通常装置有纳滤膜,其大小根据所截留蛋白分子大小的目的而设置,本发明采用了分子量为 400-500 道尔顿的纳滤膜进行了纳滤脱盐和浓缩。

[0061] 在本发明的一个具体实施方式中,提供了一种从动物胎盘制备高活性胶原蛋白肽的方法,所述的方法包括以下具体步骤:

[0062] 1) 冷冻牛胎盘,切碎后加入 5-10 倍体积的水,过夜浸泡除去血液成分,骨泥磨磨浆后,加入 20-40 倍体积的 2-10%醋酸浸提 6-12 小时,14000 转 / 离心 30-60 分钟,收集沉淀得胶原蛋白粗品;

[0063] 2) 胶原蛋白粗品加 3-5 重量体积去离子水,搅拌,调 pH7-9.0,加入胶原蛋白粗品重量的 0.1%胰蛋白酶,水解 4-8 小时,得酶解胶原蛋白肽粗品。

[0064] 3) 酶解胶原蛋白肽粗品用 0.2 微米的滤膜过滤,过滤液用 400-500 道尔顿的纳滤滤脱盐 3-5 次,再浓缩到含蛋白肽 4-10%,除菌过滤,冷冻干燥制备高活性的牛胎盘胶原蛋白肽冻干粉。

[0065] 在本发明的又一个具体实施方式,提供了一种从动物胎盘制备高活性胶原蛋白肽的方法,所述的方法的具体步骤为:

[0066] 1) 取冷冻牛胎盘,切碎后加入 5 倍体积的清水,浸泡过夜,次日用清水反复冲洗 3 次,充分去除血水,用胶体磨磨浆,加入 20 倍体积 3%醋酸,搅拌浸提过夜,用 14000 转 / 离心 40 分钟,收集沉淀得胶原蛋白粗品;

[0067] 2) 胶原蛋白粗品加 3 倍重量体积去离子水,搅拌混匀,调 pH8.6,加入胶原蛋白粗品重量的 0.1%胰蛋白酶,42°C 水解 8 小时,得酶解胶原蛋白肽粗品;

[0068] 3) 酶解胶原蛋白肽粗品用 0.2 微米的膜板框过滤机过滤,过滤液用 400-500 道尔顿的纳滤膜脱盐 4 次,搅拌后纳滤浓缩,最后浓缩到含蛋白肽 8%,冷冻干燥得胶原蛋白肽。

[0069] 在本发明的另一个方面,提供了通过本发明方法制备的胶原蛋白制品的用途,所述的用途包括将所述的胶原蛋白用于预防和 / 或防治受试者老化的药物、食品、保健品或化妆品中的应用,合适地,所述的受试者为哺乳动物,优选地,所述的受试者为人类。

[0070] 在本发明的另一个方面,将所述药物、食品、保健品或化妆品制备成口服制剂、外

用制剂、吸入制剂、经鼻制剂、经直肠制剂、经皮制剂或注射制剂,优选为外用剂型或注射制剂。

[0071] 在本发明的又一个实施方式中,提供了通过本发明制备的胶原蛋白制品,如果以对 ACE(血管紧张素转化酶(Angiotensin-Converting Enzyme,ACE))抑制的百分率作为活力参数,ACE的测定方法可以参照可选地所制备的活力大于 20%,例如大于 25%,30%,大于 30%或 45%。在一些实施例中,60%以上的 ACE 都被抑制。

[0072] 在本发明的一些实施方式中对粗品中的胶原蛋白肽的蛋白含量进行测定,可以采用凯氏定氮法或其它蛋白浓度测定法进行测定,含量例如在 0.1% -10%,合适为 2-10%,例如 4-10%等。

[0073] 同时,还对所制备的胶原蛋白肽的纯度进行了测定,可以通过现有技术中的常用蛋白质条带染色强度来衡量纯度,在一些实施例中所制备的纯度在 60%以上,例如均在 80%以上。在本发明的又一些实施例中通过本发明的方法制备高纯度的胶原蛋白肽,例如纯度在 85%,86%,87%,88%,89%,90%,92%,95%,96%以上。

[0074] 同时,对于小分子的胶原蛋白肽的纯度采用了质谱进行分析,在一些实施例中所制备的纯度在 90%以上,例如均在 92%以上。在本发明的又一些实施例中通过本发明的方法制备高纯度的胶原蛋白肽,例如纯度在 93%,94%,95%,95.5%,96%,96.5%,97%,97.5%,98%,98.5%,99%以上。

[0075] 在本发明的一个具体实施方式,提供了一种胶原蛋白肽产品,其具有大于 20%的 ACE 抑制率;优选为大于 25%,例如大于 30%、40%、45,再例如大于 48%,甚至大于 50%都有可能。并且,IC<sub>50</sub> 低于 0.95mg/mL,例如低于 0.80mg/mL、0.75mg/mL、0.70mg/mL、0.65mg/mL、0.60mg/mL、0.55mg/mL、0.45mg/mL、0.35mg/mL、0.20mg/mL。

[0076] 在本发明的又一个实施方式中,提供了一种胶原蛋白肽,其以对 ACE(血管紧张素转换酶)抑制的百分率和 IC<sub>50</sub> 来表征。如果以对 ACE(血管紧张素转换酶)抑制的百分率作为活力参数,当使用浓度 0.1mmol/L 本发明所制备的胶原蛋白肽制品时,超过 25%的 ACE 被抑制,例如大于 27%,大于 30%,甚至大于 35%的 ACE 被抑制;当使用浓度为 0.5mmol/L 时,超过 45%以上的 ACE 被抑制,例如大于 48%以上或者大于 55%以上的 ACE 被抑制;当使用浓度为 1mmol/L 时,超过 65 以上的 ACE 被抑制,例如大于 70%以上或者大于 75%以上的 ACE 被抑制。IC<sub>50</sub> 是衡量 ACE 抑制剂效果的指标,也是对胶原蛋白的活性衡量指标。利用本发明方法所制备的各种心管胶原蛋白的 IC<sub>50</sub> 均低于 0.60mg/mL,例如低于 0.58mg/mL、0.55mg/mL、0.50mg/mL、0.45mg/mL、0.40mg/mL。

[0077] 在本发明的另一个实施方式中,提供了通过本发明方法制备的胶原蛋白肽制品的用途,所述的用途包括将所述的胶原蛋白肽用于预防和 / 或防治受试者老化的药物、食品、保健品或化妆品中的应用。

[0078] 在本发明的又一个实施方式中,将所述药物、食品、保健品或化妆品制备成口服制剂、外用制剂、吸入制剂、经鼻制剂、经直肠制剂、经皮制剂或注射制剂,优选为外用剂型或注射制剂。

[0079] 在本发明的再一个实施方式中,每天对人施用预防和 / 或治疗有效量的含有本发明所制备的胶原蛋白肽,上述有效量可以为任何有效量,例如 0.5ug/kg、1ug/kg 或 10ug/kg 人体重,合适地的有效量包括对人每天施用约 1ug/kg 至约 10000mg/kg 体重的胶原蛋白肽。

[0080] 通过如下实施例记载,更好地理解本发明,但不局限于该实施例。

[0081] 实施例

[0082] 实施例 1

[0083] 奶牛分娩后取冷冻胎盘 10kg,切碎,加 50 升自来水,浸泡过夜,次日用清水反复冲洗 3 次,充分去除血水,用胶体磨磨浆,加入 200 升 3%醋酸,搅拌浸提过夜。用 14000 转/分离心 40 分钟,收集沉淀。沉淀加 30 升去离子水,搅拌混匀,调 pH8.6,加入 30 克胰蛋白酶,42℃保温 8 小时。用 0.2 微米的膜板筐过滤机过滤,穿过液用纳滤机浓缩到 10 升,再加入去离子水到 30 升,搅拌后纳滤浓缩,反复 4 次,最后浓缩到 10 升,冷冻干燥,得胶原蛋白肽 0.3 公斤。

[0084] 实施例 2

[0085] 奶牛分娩后取新鲜冷冻胎盘 100kg,切碎,加 500 升自来水,浸泡过夜,次日用清水反复冲洗 3 次,充分去除血水,用胶体磨磨浆,加入 2000 升 3%醋酸,搅拌浸提过夜。用 14000 转/分离心 50 分钟,收集沉淀。沉淀加 300 升去离子水,搅拌混匀,调 pH8.6,加入 300 克胰蛋白酶,42℃保温 8 小时。用 0.2 微米的膜板筐过滤机过滤,穿过液用纳滤机浓缩到 100 升,再加入去离子水到 30 升,搅拌后纳滤浓缩,反复 4 次,最后浓缩到 100 升,冷冻干燥,得胶原蛋白肽 3.5 公斤。

[0086] 实施例 3

[0087] 奶牛分娩后取新鲜冷冻胎盘 500kg,切碎,加 2500 升自来水,浸泡过夜,次日用清水反复冲洗 3 次,充分去除血水,用胶体磨磨浆,加入 10000 升 3%醋酸,搅拌浸提过夜。用 14000 转/分离心 60 分钟,收集沉淀。沉淀加 1500 升去离子水,搅拌混匀,调 pH8.6,加入 3000 克胰蛋白酶,42℃保温 8 小时。用 0.2 微米的膜板筐过滤机过滤,穿过液用纳滤机浓缩到 2500 升,再加入去离子水到 15000 升,搅拌后纳滤浓缩,反复 4 次,最后浓缩到 400 升,冷冻干燥,得胶原蛋白肽 20 公斤。

[0088] 实施例 4

[0089] 实验为使用本工艺制备的牛胎盘胶原蛋白肽(下文称之为自制胶原蛋白,为实施例 1 获得的胶原蛋白肽)与市售的德国(vikki 胶原蛋白, <http://www.vikkiup.com/>)和法国产胶原蛋白肽(法国罗赛洛(ROUSSELOT)集团, <http://cctv.manager8844.com/flxdtjdbf/>)进行血管紧张素转化酶(Angiotensin-Converting Enzyme, ACE)抑制试验,以此检验我们制备的胶原蛋白肽质量(由于商业上的工艺技术保密问题,我们无法得知德国和法国胶原蛋白肽生产工艺)。分为以下几个步骤:

[0090] (1) 从猪肺中提取血管紧张素转化酶(刘宏,陈兰英.血管紧张素转换酶纯化与性质研究.中国生物化学与分子生物学报,2000,06:788-792;刘淑集,王茵,苏永昌,吴成业.血管紧张素转换酶(ACE)的提取与活性验证,福建水产,2009,02:1-5)将 200g 新鲜猪肺放置冷藏室中 12h 后用预冷的 0.9%的生理盐水清洗,剪成小块,除去脂肪和大血管,加入 600mL 的蒸馏水,断续匀浆 10×20s,加入 15mL 的 10% Triton X-100,慢速搅拌 30min,4 层纱布过滤,滤液 4℃离心(6000g×20min),保留上清液,1.6~2.6mol/L 硫酸铵分级沉淀,收集沉淀溶液。用预冷的 pH8.3、100mmol/L 的磷酸缓冲液(含 0.3mol/L NaCl)溶解。溶解液离心后取上清进行透析以及浓缩,得到 ACE 浓缩液。

[0091] (2) 马尿酸标准曲线的制作:将马尿酸标准样品用磷酸缓冲液溶解配成 1mmol/

L 的标准母液。然后将标准母液稀释成  $5 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $50 \mu\text{mol/L}$ 、 $100 \mu\text{mol/L}$ 、 $150 \mu\text{mol/L}$ 、 $200 \mu\text{mol/L}$  系列浓度。经  $0.45 \mu\text{M}$  滤膜过滤后,在  $228\text{nm}$  下分别测定吸光值。以马尿酸浓度为横坐标,其吸光值为纵坐标,绘制标准曲线(见图 2)。

[0092] (3)ACE 活力测定参考 Cushman 等的 (CUSHMAN D W, CHEUNG H. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20:1637-1648, 和, PRADIPTA B C, SHANTHI. Isolation of novel bioactive regions from bovine Achilles tendon collagen having angiotensin I-converting enzyme-inhibitory properties[J]. Process Biochemistry, 2012, 47:12) 的经典方法并稍作修改:在  $37^\circ\text{C}$ , pH8.3 的条件下,ACE 催化血管紧张素 I 的模拟物 HHL 产生马尿酸。产物马尿酸在波长  $228\text{nm}$  处具有特殊吸收峰。根据马尿酸标准曲线上相对应的值即可进行活性计算。

[0093] (4) 胶原蛋白对 ACE 抑制效果的比较:将以上三种胶原蛋白用磷酸缓冲液溶解配成  $1\text{mg/mL}$  的标准母液。经过稀释之后配成  $0.01\text{mg/mL}$ 、 $0.05\text{mg/mL}$ 、 $0.1\text{mg/mL}$ 、 $0.5\text{mg/mL}$ 、 $1.0\text{mg/mL}$  系列浓度后。分别与提取的适量 ACE 预先混合,将混合物在  $37^\circ\text{C}$  水浴锅中先温浴  $10\text{min}$ 。实验具体操作步骤根据 PRADIPTA 等方法 (PRADIPTA B C, SHANTHI. Isolation of novel bioactive regions from bovine Achilles tendon collagen having angiotensin I-converting enzyme-inhibitory properties[J]. Process Biochemistry, 2012, 47:12), 并稍作修改:测量的总体积为  $350 \mu\text{L}$ , 含  $100\text{mmol/L}$  pH8.3 磷酸缓冲液、 $0.3\text{mol/L}$  NaCl、 $5\text{mmol/L}$  HHL。在  $37^\circ\text{C}$  恒温水浴  $3\text{min}$ , 然后加入温浴  $10\text{min}$  后的混合物启动反应,恒温保持  $40\text{min}$  后,加入  $250 \mu\text{L}$   $1\text{mol/L}$  HCl 中止反应。再加入  $1.5\text{mL}$  乙酸乙酯,用力混合  $15\text{s}$ ,  $3500$  转/min 离心  $15\text{min}$  后取出  $1.0\text{mL}$  酯层转入另一试管中,在  $120^\circ\text{C}$  的烘箱经  $30\text{min}$  蒸干,再将它重新溶于  $1.0\text{mL}$  的磷酸缓冲液中,在  $228\text{nm}$  处测定吸光值。抑制率的计算方法根据 TSAI 等的方法 (TSAI J S, CHEN J L, BONNIE S P. ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (*Meretrix lusoria*). Process Biochemistry, 2008, 43(7):743-747)。如下式计算:①抑制率 (%) =  $(\text{OD}_A - \text{OD}_B) / (\text{OD}_A - \text{OD}_C)$ , (注:  $\text{OD}_A$  为不存在抑制剂时的光密度;  $\text{OD}_B$  为存在抑制剂与酶时的光密度;  $\text{OD}_C$  为抑制剂与酶都不存在时的光密度。对 ACE 抑制率达到  $50\%$  时的抑制剂浓度即为半抑制浓度,记为  $\text{IC}_{50}$ 。  $\text{IC}_{50}$  值越小,说明抑制剂活性越大。

[0094] (5) 测定结果:不同产地的胶原蛋白对 ACE 的抑制率结果见表 1,根据表 1 结果绘制的不同来源不同浓度的胶原蛋白 ACE 活性的抑制曲线见图 3。从图 3 中可以看出当浓度在  $0.01\text{mg/mL} \sim 0.05\text{mg/mL}$  时,三种不同来源的胶原蛋白对 ACE 活性的抑制率几乎处在同一水平上,并没有表现出明显的活性抑制作用。在加入的浓度到达  $0.1\text{mg/mL}$  时,自制胶原蛋白对 ACE 的抑制率就达到了将近  $30\%$ ,而另外两种商品化胶原蛋白的抑制率仅为  $20\%$  左右。继续升高浓度,自制胶原蛋白依然在 ACE 抑制作用上表现出很好的效果,在加入浓度为  $0.5\text{mg/mL}$  时,就已经达到  $48\%$  的 ACE 抑制率。而在同样的浓度下,另外两种商品化胶原蛋白的 ACE 抑制率相比其有一定的差距。而当浓度升至  $1\text{mg/mL}$  时,这种差距进一步被拉大。根据表 1 中  $\text{IC}_{50}$  结果绘制的不同胶原蛋白对 ACE 抑制效果柱状图见图 4。  $\text{IC}_{50}$  是一种公认检验 ACE 抑制剂效果的指标,  $\text{IC}_{50}$  的值越低说明抑制 ACE 作用的效果越好。通过计算得出自制胶原蛋白,德国胶原蛋白以及法国胶原蛋白的  $\text{IC}_{50}$  分别为  $0.5241\text{mg/mL}$ 、 $0.6780\text{mg/mL}$

和 0.9696mg/mL。根据结果绘制不同胶原蛋白 IC<sub>50</sub> 的比较柱状图见图 4,通过分析后发现,自制的胶原蛋白对 ACE 的抑制效果极显著地超越于另外两种商品化的胶原蛋白 (P<0.01),其抑制能力甚至接近法国产胶原蛋白的 2 倍之多。

[0095] 表 1 不同胶原蛋白对 ACE 的抑制效果比较

[0096]

产地	浓度(mmol/L)	抑制率(%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
自制胶原蛋白	0.01	8	0.5241
	0.05	17	
	0.1	27	
	0.5	48	
	1.0	70	
德国产胶原蛋白	0.01	6	0.6780
	0.05	13	
	0.1	19	
	0.5	41	
	1.0	59	
法国产胶原蛋白	0.01	8	0.9696
	0.05	17	
	0.1	20	
	0.5	34	

[0097]

	1.0	51	
--	-----	----	--

[0098] 通过比较发现,本工艺生产的胶原蛋白肽对 ACE 抑制作用明显高于国外进口胶原蛋白商品。这与该胶原蛋白的生产工艺技术有着密切关系,目前商品化的胶原蛋白往往使用强酸、强碱制备工艺,其实质上已经使大部分胶原蛋白变性,失去了天然的结构构象,丧失了它们的生物活性。本工艺生产的胶原蛋白是在低温(18℃)的条件下进行提取,最大限度地保留了胶原蛋白原有三维构象,使之具有很高的生物活性,因而对于 ACE 活性具有很好的抑制效果,对人的高血压治疗意义重大。

[0099] 本发明不局限在本申请中描述的特定实施方式,用作本发明的单独的方面的单一

说明。本领域技术人员将理解,可以不脱离本申请的精神和范围的情况下进行各种修改和改动。根据以上描述,除了本文中列举的以外,本公开的范围内的功能上等同的用途对于本领域的本领域技术人员而言是明显的。这样的改动和修改意欲落在所附权利要求的范围内。本公开仅受所附权利要求以及与这样的权利要求的范围所等同的全部范围限制。应当理解,本公开不局限于特定的方法、试剂、组合物和生物系统,当然,所述方法、试剂、组合物和生物系统可以变化。还可理解,本文中使用的术语仅用于描述特定的实施方式,不用来是限制性的。

[0100] 本文所参考的或引用的所有专利、专利申请、在先申请和出版物通过引用而全文并入本文,使得它们不与本说明书的明确教导相矛盾。在权利要求范围内提出其他的实施方式。

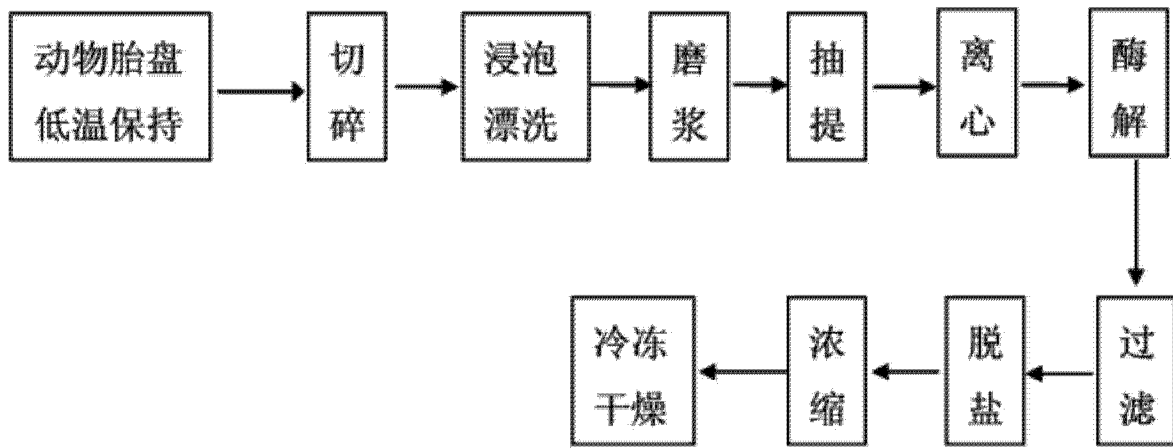


图 1

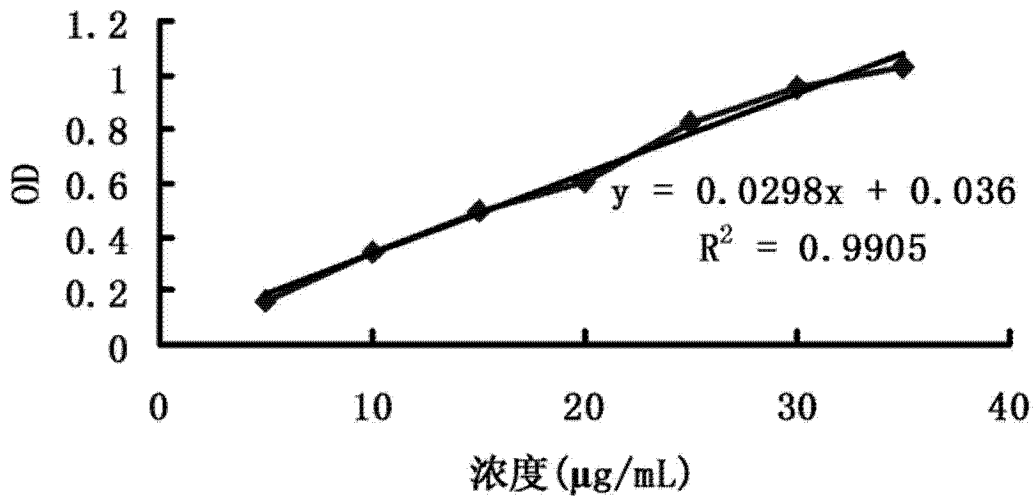


图 2

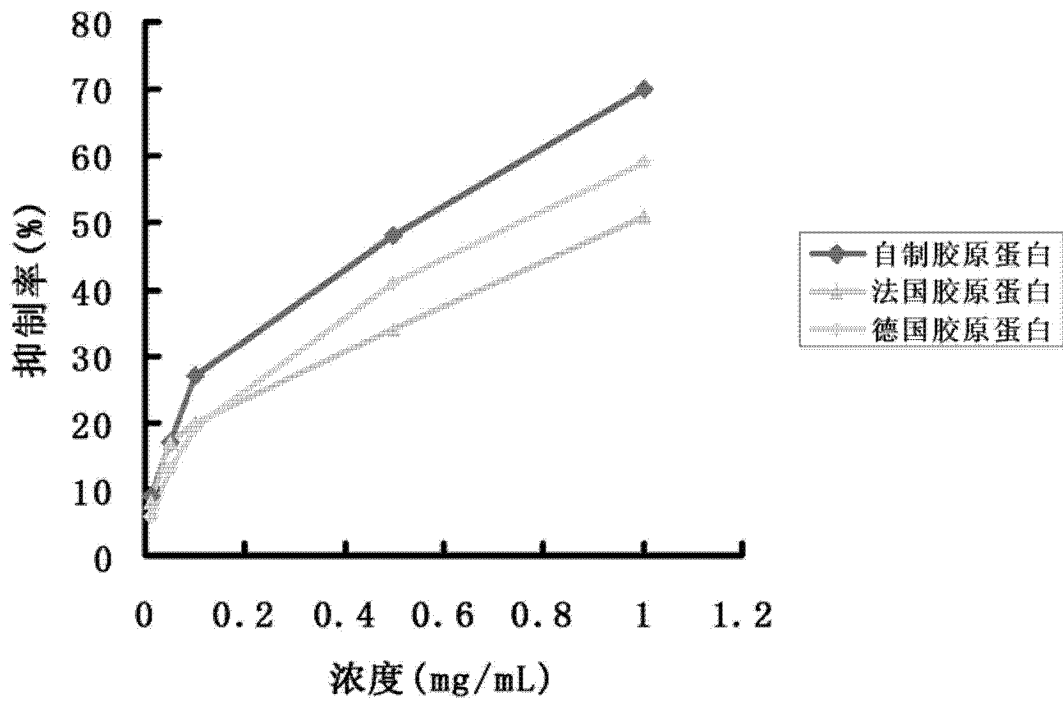


图 3

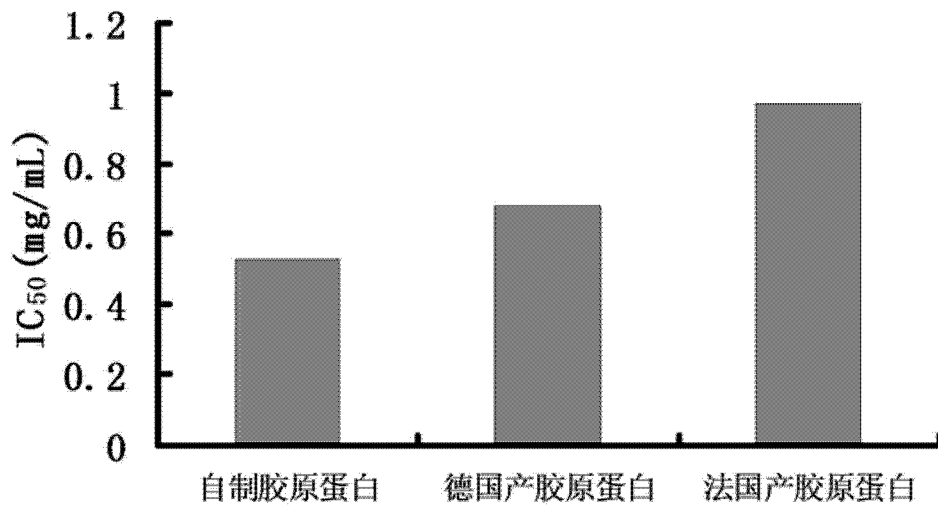


图 4