



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106282287 A

(43)申请公布日 2017.01.04

(21)申请号 201610896602.9

(22)申请日 2016.10.13

(71)申请人 徐州银杏源生物工程有限公司

地址 221331 江苏省徐州市邳州市铁富镇
工业园

(72)发明人 范文杰 孙俊松

(74)专利代理机构 西安铭泽知识产权代理事务
所(普通合伙) 61223

代理人 俞晓明

(51)Int.Cl.

C12P 21/06(2006.01)

C07K 1/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种提取白果生物活性多肽的方法

(57)摘要

本发明公开了一种提取白果生物活性多肽的方法,包括以下步骤:粉碎:获得白果粉;酶解:将白果粉用水溶解,搅拌混匀调节pH值,在搅拌的同时加入破壁酶、果胶酶、纤维素酶和蛋白酶,酶解,得到酶解液,然后经高温灭酶,得到灭酶溶液;经两步提取:调整灭酶溶液为3-5°C,保持1-3h,水解、分离获得第一次上清液和第一次残渣;将第一次残渣再次水提和分离,收集第二次上清液;浓缩:合并第一、二次上清液,浓缩,获得浓缩液;干燥:将浓缩液进行干燥,得到白果生物活性多肽。本发明提取白果生物活性多肽的方法,既保证了活性多肽的结构不被破坏,还有效提高了提取率,小分子活性多肽分子量多在1000Da(道尔顿)以下,更有利于人体吸收。

1. 一种提取白果生物活性多肽的方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1,粉碎:将白果仁于沸水中煮沸3-5min,干燥后进行粉碎过筛,获得白果粉;

步骤2,酶解:将步骤1中的白果粉用水溶解,其中白果粉与水的固液比为1g:10-30mL,搅拌混匀,调节pH至5.5-7.0,在搅拌的同时加入破壁酶、果胶酶、纤维素酶和蛋白酶,在55-60℃下酶解1-4h,得到酶解液,然后将酶解液经高温灭酶,得到灭酶溶液;

其中,破壁酶的添加量占白果粉质量的0.1-1.0%,果胶酶的添加量占白果粉质量的0.1-1.0%,纤维素酶的添加量占白果粉质量的0.1-1.0%,蛋白酶的添加量占白果粉质量的0.5-3.0%;

所述破壁酶由蜗牛酶、溶菌酶按7:1的质量比例混合而成;所述蛋白酶为酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰酶、风味蛋白酶、菠萝蛋白酶中的一种或多种;

步骤3,两步提取:将灭酶溶液的温度调整至3-5℃,保持1-3h,经抽滤分离或离心分离,获得第一次水解液和第一次残渣;将第一次水解液升温至55-60℃,保持1-2h,然后经离心分离,收集第一次上清液;

再将得到的第一次残渣溶于0.1-0.3mol/L的NaCl溶液或者0.01-0.1mol/L的NaH₂PO₄溶液中,于60-80℃保持1-2h,然后再进行抽滤分离或离心分离,收集第二次上清液,其中第一次残渣与NaCl溶液或者NaH₂PO₄溶液的固液比为1g:10-25mL;

步骤4,浓缩:合并第一次上清液和第二次上清液,浓缩去除部分水分,获得浓缩液;

步骤5,干燥:将步骤4中所得浓缩液进行干燥,得到白果生物活性多肽。

2. 根据权利要求1所述的提取白果生物活性多肽的方法,其特征在于,步骤1中,过筛的目数为100-2000目。

3. 根据权利要求1所述的提取白果生物活性多肽的方法,其特征在于,步骤2中,白果粉与水的固液比为1g:30mL。

4. 根据权利要求1所述的提取白果生物活性多肽的方法,其特征在于,步骤2中,高温灭酶的方法为:将酶解液于95-100℃保温5-7min。

5. 根据权利要求1所述的提取白果生物活性多肽的方法,其特征在于,步骤3中,抽滤分离时添加助滤剂硅藻土。

6. 根据权利要求1所述的提取白果生物活性多肽的方法,其特征在于,步骤4中,浓缩时,采用真空浓缩或者旋转蒸发浓缩。

7. 根据权利要求1所述的提取白果生物活性多肽的方法,其特征在于,步骤5中,干燥时采用真空干燥,且真空干燥的温度为50℃。

一种提取白果生物活性多肽的方法

技术领域

[0001] 本发明属于白果产品加工技术领域,具体涉及一种提取白果生物活性多肽的方法。

背景技术

[0002] 生物活性多肽是最近研究发现对细胞功能或生命有机体的代谢活动具有优化功能的短肽类化合分子。与完整长度的蛋白质相比,生物活性多肽优异的理化性能,如良好的溶解性、亲水性、低粘度、低发泡性等,均使得活性多肽的生物利用率更高,甚至比氨基酸更容易吸收,具有调节人体生理机能的功效,其具有一些原蛋白质或其组份氨基酸所不具备的生物活性。生物活性肽的生物学功能包括免疫调节、抗高血压、抑菌、抗癌、抗氧化、改善元素吸收、调节食品风味、口味和硬度等,因此,生物活性多肽被广泛应用于食品、保健品和化妆品中。

[0003] 生物活性多肽的分类可按原料来源和保健功能来划分。按照原料来划分的有:乳肽、大豆肽、玉米肽、鱼贝类蛋白、胶原蛋白多肽等;按照功能来分有免疫活性肽、神经活性肽、降血压肽和抗菌多肽等。这些多肽已作为保健食品和药物实现了工业化生产,并取得巨大的经济效益。但是我国对活性肽的研究起步较晚,产品种类少,市场开发不足。近些年来随着人们保健美容意识及消费能力的提高,具有良好生物活性的多肽类产品已经走入平常百姓生活中,具有非常广泛的市场和应用前景。此外,我国生物物种丰富,蛋白质资源充足,利用生物技术开发多肽活性物质是提升经济作物的重要途径。

[0004] 白果仁中的最大成份为淀粉,其次为蛋白质、脂肪及多糖,还含有维生素C、核黄素、胡萝卜素、银杏酸、白果酚、多种有益人体健康的微量元素以及五碳多糖,因此具有良好的医用效果和食疗作用。随着蛋白多肽生理功能和消费市场的扩大,进行白果生物活性多肽的制备是提高白果仁消费面及经济利益的重要途径之一。

[0005] 传统的生物多肽的制备可以由化学法完成,即利用酸或碱进行蛋白质的消化处理,该方法速度快,成本低,但是会对多肽造成一定的损伤,多肽结构的控制不太容易,不仅破坏多肽的生理活性,产生毒副产品,而且会产生酸碱等化学污染。因此,有必要开发一种可以有效提取白果生物活性多肽的方法,应用于功能性食品或药品的研究与开发。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种提取白果生物活性多肽的方法,解决了化学提取法对多肽造成的损伤,导致的多肽结构不稳定,破坏多肽生理活性,产生毒副产品,产生酸碱等化学污染的问题。

[0007] 本发明提供的一种提取白果生物活性多肽的方法,包括以下步骤:

[0008] 步骤1,粉碎:将白果仁于沸水中煮沸3-5min,干燥后进行粉碎过筛,获得白果粉;

[0009] 步骤2,酶解:将步骤1中的白果粉用水溶解,其中白果粉与水的固液比为1g:10-30mL,搅拌混匀,调节pH至5.5-7.0,在搅拌的同时加入破壁酶、果胶酶、纤维素酶和蛋白酶,

在55-60℃下酶解1-4h,得到酶解液,然后将酶解液经高温灭酶,得到灭酶溶液;

[0010] 其中,破壁酶的添加量占白果粉质量的0.1-1.0%,果胶酶的添加量占白果粉质量的0.1-1.0%,纤维素酶的添加量占白果粉质量的0.1-1.0%,蛋白酶的添加量占白果粉质量的0.5-3.0%;

[0011] 所述破壁酶由蜗牛酶、溶菌酶按7:1的质量比例混合而成;所述蛋白酶为酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰酶、风味蛋白酶、菠萝蛋白酶中的一种或多种;

[0012] 步骤3,两步提取:将灭酶溶液的温度调整至3-5℃,保持1-3h,经抽滤分离或离心分离,获得第一次水解液和第一次残渣;将第一次水解液升温至55-60℃,保持1-2h,然后经离心分离,收集第一次上清液;

[0013] 再将得到的第一次残渣溶于0.1-0.3mol/L的NaCl溶液或者0.01-0.1mol/L的NaH₂PO₄溶液中,于60-80℃保持1-2h,然后再进行抽滤分离或离心分离,收集第二次上清液,其中第一次残渣与NaCl溶液或者NaH₂PO₄溶液的固液比为1g:10-25mL;

[0014] 步骤4,浓缩:合并第一次上清液和第二次上清液,浓缩去除部分水分,获得浓缩液;

[0015] 步骤5,干燥:将步骤4中所得浓缩液进行干燥,得到白果生物活性多肽。

[0016] 优选的,步骤1中,过筛的目数为100-2000目。

[0017] 优选的,步骤2中,白果粉与水的固液比为1g:30mL。

[0018] 优选的,步骤2,高温灭酶的方法为:将酶解液于95-100℃保温5-7min。

[0019] 优选的,步骤3中,抽滤分离时添加助滤剂硅藻土。

[0020] 优选的,步骤4中,浓缩时,采用真空浓缩或者旋转蒸发浓缩。

[0021] 优选的,步骤5中,干燥时采用真空干燥,且真空干燥的温度为50℃。

[0022] 本发明提取白果生物活性多肽的方法,通过多种酶制剂对生物样品进行处理,可以在温和条件下将蛋白质从植物组织中进行分离,由于提取过程中并没有添加化学试剂,不仅保证了蛋白质的活性结构不被破坏,还可以有效提高蛋白的提取率,经酶解后获得的小分子活性多肽分子量多在1000Da(道尔顿)以下,且分布均匀,更有利于人体吸收。可用于修复肌肤、增加皮肤营养,使用于食疗时可以对病人迅速增加蛋白质营养。

[0023] 与传统的两步提取法相比,生物活性多肽产量高,小分子肽活性组份的比例大,无污染排放。例如同样使用1000目的白果粉原材料,酶法提取白果多肽的得率为55%以上;1000Da左右的小肽活性组份的比例在80%以上,而传统方法得到的活性小肽组份的比例不超过60%。

具体实施方式

[0024] 下面对发明的具体实施方式进行详细描述,但应当理解本发明的保护范围并不受具体实施方式的限制。下列实施例中未注明具体条件的试验方法,通常按照常规条件,或者按照各制造商所建议的条件。

[0025] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本

发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0026] 此外,本发明及下列实施例中采用的各种酶均为市售。

[0027] 优选的,本发明一种提取白果生物活性多肽的方法,包括以下实施例。

[0028] 实施例1

[0029] 一种提取白果生物活性多肽的方法,包括以下步骤:

[0030] 步骤1,粉碎:将白果仁于沸水中煮沸5min,干燥后粉碎时采用中草药粉碎机进行粉碎,过200目筛,获得200目的白果粉;

[0031] 步骤2,酶解:将步骤1中的白果粉用水溶解,其中白果粉与水的固液比为1g:20mL,搅拌混匀,调节pH至5.5,在搅拌的同时加入破壁酶、果胶酶、纤维素酶和蛋白酶,在55℃下酶解4h,得到酶解液,然后将酶解液经高温灭酶,得到灭酶溶液;

[0032] 其中,高温灭酶的方法为:将酶解液于100℃保温5min;

[0033] 其中,所述破壁酶由蜗牛酶、溶菌酶按7:1的质量比例混合而成;所述蛋白酶由酸性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰酶、风味蛋白酶组成;

[0034] 其中,破壁酶的添加量占白果粉质量的0.4%,果胶酶的添加量占白果粉质量的0.2%,纤维素酶的添加量占白果粉质量的0.2%,酸性蛋白酶的添加量占白果粉质量的0.5%,中性蛋白酶的添加量占白果粉质量的0.2%,木瓜蛋白酶的添加量占白果粉质量的0.5%,胰酶的添加量占白果粉质量的0.3%,风味蛋白酶的添加量占白果粉质量的1.0%;

[0035] 步骤3,两步提取:将灭酶溶液的温度调整至4℃,保持1h,经3500r/min离心10min,获得第一次水解液和第一次残渣;将第一次水解液升温至60℃,保持1h,然后经12000r/min离心10min,收集第一次上清液;

[0036] 再将得到的第一次残渣溶于0.1mol/L的NaCl溶液中,于80℃保持2h,然后再以12000r/min离心15min,收集第二次上清液,其中第一次残渣与NaCl溶液的固液比为1g:25mL;

[0037] 步骤4,浓缩:合并第一次上清液和第二次上清液,利用旋转蒸发仪将上清液浓缩至原体积的1/10,获得浓缩液;

[0038] 步骤5,干燥:将步骤4中所得浓缩液进行50℃真空干燥,得到白果生物活性多肽。

[0039] 经分析,白果生物活性多肽中,分子量在1000Da左右的生物活性小肽占多肽总量的85%左右,生物活性多肽的总提取率大约为60.02%。

[0040] 实施例2

[0041] 一种提取白果生物活性多肽的方法,包括以下步骤:

[0042] 步骤1,粉碎:将白果仁于沸水中煮沸4min,干燥后粉碎时采用超微粉碎机进行粉碎,过500目筛,获得500目的白果粉;

[0043] 步骤2,酶解:将步骤1中的白果粉用水溶解,其中白果粉与水的固液比为1g:25mL,搅拌混匀,调节pH至6,在搅拌的同时加入破壁酶、果胶酶、纤维素酶和蛋白酶,在55℃下酶解3h,得到酶解液,然后将酶解液经高温灭酶,得到灭酶溶液;

[0044] 其中,高温灭酶的方法为:将酶解液于95℃保温5min;

[0045] 其中,所述破壁酶由蜗牛酶、溶菌酶按7:1的质量比例混合而成;所述蛋白酶由酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰酶、风味蛋白酶、菠萝蛋白酶组成;

[0046] 其中,破壁酶的添加量占白果粉质量的0.5%,果胶酶的添加量占白果粉质量的0.5%,纤维素酶的添加量占白果粉质量的0.2%,酸性蛋白酶的添加量占白果粉质量的0.2%,碱性蛋白酶的添加量占白果粉质量的1.0%,木瓜蛋白酶的添加量占白果粉质量的0.5%,胰酶的添加量占白果粉质量的1.0%,风味蛋白酶的添加量占白果粉质量的0.1%,菠萝蛋白酶的添加量占白果粉质量的0.1%;

[0047] 步骤3,两步提取:将灭酶溶液的温度调整至3℃,保持3h,经抽滤分离,获得第一次水解液和第一次残渣;将第一次水解液升温至60℃,保持1h,然后经12000r/min离心10min,收集第一次上清液;

[0048] 再将得到的第一次残渣溶于0.3mol/L的NaCl溶液中,于70℃保持1h,然后再经抽滤分离,收集第二次上清液,其中第一次残渣与NaCl溶液的固液比为1g:15mL;

[0049] 步骤4,浓缩:合并第一次上清液和第二次上清液,将上清液真空浓缩至原体积的1/10,获得浓缩液;

[0050] 步骤5,干燥:将步骤4中所得浓缩液进行50℃真空干燥,得到白果生物活性多肽。

[0051] 经分析,白果生物活性多肽中,分子量在1000Da左右的生物活性小肽占多肽总量的82%左右,生物活性多肽的总提取率大约为54.47%。

[0052] 实施例3

[0053] 一种提取白果生物活性多肽的方法,包括以下步骤:

[0054] 步骤1,粉碎:将白果仁于沸水中煮沸3min,干燥后粉碎时采用中草药粉碎机进行粉碎,过1000目筛,获得1000目的白果粉;

[0055] 步骤2,酶解:将步骤1中的白果粉用水溶解,其中白果粉与水的固液比为1g:30mL,搅拌混匀调节pH值至7.0,在搅拌的同时加入破壁酶、果胶酶、纤维素酶和蛋白酶,在58℃下酶解1h,得到酶解液,然后将酶解液经高温灭酶,得到灭酶溶液;

[0056] 其中,高温灭酶的方法为:将酶解液于100℃保温7min;

[0057] 其中,所述破壁酶由蜗牛酶、溶菌酶按7:1的质量比例混合而成;所述蛋白酶由木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、菠萝蛋白酶组成;

[0058] 其中,破壁酶的添加量占白果粉质量的0.1%,果胶酶的添加量占白果粉质量的1.0%,纤维素酶的添加量占白果粉质量的0.8%,木瓜蛋白酶的添加量占白果粉质量的1.0%,风味蛋白酶的添加量占白果粉质量的1.0%,菠萝蛋白酶的添加量占白果粉质量的1.0%;

[0059] 步骤3,两步提取:将灭酶溶液的温度调整至5℃,保持3h,经抽滤分离,并且抽滤时添加助滤剂硅藻土,获得第一次水解液和第一次残渣;将第一次水解液升温至55℃,保持1.5h,然后经12000r/min离心10min,收集第一次上清液;

[0060] 再将得到的第一次残渣溶于0.01mol/L的NaH₂PO₄溶液中,于70℃保持1.5h,然后再以12000r/min离心15min,收集第二次上清液,其中第一次残渣与NaH₂PO₄溶液的固液比为1g:10mL;

[0061] 步骤4,浓缩:合并第一次上清液和第二次上清液,利用旋转蒸发仪将上清液浓缩至原体积的1/10,获得浓缩液;

[0062] 步骤5,干燥:将步骤4中所得浓缩液进行50℃真空干燥,得到白果生物活性多肽。

[0063] 经分析,白果生物活性多肽中,分子量在1000Da左右的生物活性小肽占多肽总量

的80%左右,生物活性多肽的总提取率大约为56.62%。

[0064] 实施例4

[0065] 一种提取白果生物活性多肽的方法,包括以下步骤:

[0066] 步骤1,粉碎:将白果仁于沸水中煮沸5min,干燥后粉碎时采用中草药粉碎机进行粉碎,过500目筛,获得500目的白果粉;

[0067] 步骤2,酶解:将步骤1中的白果粉用水溶解,其中白果粉与水的固液比为1g:20mL,搅拌混匀,调节pH至5.5,在搅拌的同时加入破壁酶、果胶酶、纤维素酶和蛋白酶,在55℃下酶解4h,得到酶解液,然后将酶解液经高温灭酶,得到灭酶溶液;

[0068] 其中,高温灭酶的方法为:将酶解液于100℃保温5min;

[0069] 其中,所述破壁酶由蜗牛酶、溶菌酶按7:1的质量比例混合而成;所述蛋白酶由酸性蛋白酶和中性蛋白酶组成;

[0070] 其中,破壁酶的添加量占白果粉质量的0.3%,果胶酶的添加量占白果粉质量的0.2%,纤维素酶的添加量占白果粉质量的0.1%,酸性蛋白酶的添加量占白果粉质量的1.0%,中性蛋白酶的添加量占白果粉质量的1.0%;

[0071] 步骤3,两步提取:将灭酶溶液的温度调整至4℃,保持1h,经3500r/min离心10min,获得第一次水解液和第一次残渣;将第一次水解液升温至60℃,保持1h,然后经12000r/min离心10min,收集第一次上清液;

[0072] 再将得到的第一次残渣溶于0.1mol/L的NaCl溶液中,于80℃保持2h,然后再以12000r/min离心15min,收集第二次上清液,其中第一次残渣与NaCl溶液的固液比为1g:25mL;

[0073] 步骤4,浓缩:合并第一次上清液和第二次上清液,利用旋转蒸发仪将上清液浓缩至原体积的1/10,获得浓缩液;

[0074] 步骤5,干燥:将步骤4中所得浓缩液进行50℃真空干燥,得到白果生物活性多肽。

[0075] 经分析,白果生物活性多肽中,分子量在1000Da左右的生物活性小肽占多肽总量的85%左右,生物活性多肽的总提取率大约为55.13%。

[0076] 实施例5

[0077] 一种提取白果生物活性多肽的方法,包括以下步骤:

[0078] 步骤1,粉碎:将白果仁于沸水中煮沸3min,干燥后粉碎时采用中草药粉碎机进行粉碎,过1000目筛,获得1000目的白果粉;

[0079] 步骤2,酶解:将步骤1中的白果粉用水溶解,其中白果粉与水的固液比为1g:30mL,搅拌混匀调节pH值至7.0,在搅拌的同时加入破壁酶、果胶酶、纤维素酶和蛋白酶,在58℃下酶解1h,得到酶解液,然后将酶解液经高温灭酶,得到灭酶溶液;

[0080] 其中,高温灭酶的方法为:将酶解液于100℃保温7min;

[0081] 其中,所述破壁酶由蜗牛酶、溶菌酶按7:1的质量比例混合而成;所述蛋白酶为木瓜蛋白酶;

[0082] 其中,破壁酶的添加量占白果粉质量的0.1%,果胶酶的添加量占白果粉质量的1.0%,纤维素酶的添加量占白果粉质量的0.8%,木瓜蛋白酶的添加量占白果粉质量的1.0%;

[0083] 步骤3,两步提取:将灭酶溶液的温度调整至5℃,保持3h,经抽滤分离,并且抽滤时

添加助滤剂硅藻土，获得第一次水解液和第一次残渣；将第一次水解液升温至55℃，保持1.5h，然后经12000r/min离心10min，收集第一次上清液；

[0084] 再将得到的第一次残渣溶于0.01mol/L的NaH₂PO₄溶液中，于70℃保持1.5h，然后再以12000r/min离心15min，收集第二次上清液，其中第一次残渣与NaH₂PO₄溶液的固液比为1g:10mL；

[0085] 步骤4，浓缩：合并第一次上清液和第二次上清液，利用旋转蒸发仪将上清液浓缩至原体积的1/10，获得浓缩液；

[0086] 步骤5，干燥：将步骤4中所得浓缩液进行50℃真空干燥，得到白果生物活性多肽。

[0087] 经分析，白果生物活性多肽中，分子量在1000Da左右的生物活性小肽占多肽总量的83%左右，生物活性多肽的总提取率大约为58.32%。

[0088] 传统方法得到的活性小肽组份(分子量小于1000Da)的比例不超过60%，且提取有效率小于45%。而由上述实施例所得结果可知，采用本发明的方法提取白果生物活性多肽，分子量在1000Da左右的生物活性小肽占多肽总量的80%以上，有较大幅度的提高。

[0089] 尽管已描述了本发明的优选实施例，但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念，则可对这些实施例作出另外的变更和修改。所以，所附权利要求意欲解释为包括优选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。

[0090] 显然，本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样，倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内，则本发明也意图包含这些改动和变型在内。