



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104031963 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201410129977. 3

(22) 申请日 2014. 04. 02

(71) 申请人 浙江省农业科学院

地址 310021 浙江省杭州市江干区石桥路
198 号

(72) 发明人 张玉 王伟 王君虹

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公
司 33212

代理人 金祺

(51) Int. Cl.

C12P 21/06 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

利用蚕蛹制备降血糖肽的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用蚕蛹制备降血糖肽的方法,包括如下步骤:1) 在脱脂干蚕蛹粉中加入水后搅匀,然后调节 pH 值为 3.8 ~ 4.2,作为反应起始物;于 35℃ ~ 40℃,在反应起始物中加入酸性蛋白酶,于搅拌状态下保温酶解反应 3.5 ~ 4.5h;终止反应后离心,得上清液,该上清液为酶解液;2) 用脱色活性炭对酶解液于 35 ~ 35℃进行脱色处理,所得的脱色后酶解液经过滤,得粗滤酶解液;利用截留分子量 3Kda 的中空纤维聚砜超滤膜对粗滤酶解液进行超滤,先利用真空浓缩机将此超滤酶解液浓缩至原重的 25 ~ 40%,然后真空冷冻干燥,得到具有降血糖功能的肽粉。

1. 利用蚕蛹制备降血糖肽的方法,其特征是包括如下步骤:

1)、在脱脂干蚕蛹粉中按照 1:13~17 的重量比加入水后搅匀,然后调节 pH 值为 3.8~4.2,作为反应起始物;于 35℃~40℃,在反应起始物中加入为脱脂干蚕蛹粉重量 2~3% 的酸性蛋白酶,于搅拌状态下保温酶解反应 3.5~4.5h;

将酶解反应所得产物于 10min 内升温至 95~100℃,并保温 8~12min;然后自然冷却至室温以终止反应;然后离心,得上清液,该上清液为酶解液;

2)、用脱色活性炭对所述酶解液于 35~35℃进行脱色处理,所得的脱色后酶解液经过滤,得粗滤酶解液;

利用截留分子量 3Kda 的中空纤维聚砜超滤膜对粗滤酶解液进行超滤,工作压力 0.1~0.2Mpa,工作温度 0~45℃,得到超滤酶解液;

先利用真空浓缩机将此超滤酶解液浓缩至原重的 25~40%,然后真空冷冻干燥,得到具有降血糖功能的肽粉。

2. 根据权利要求 1 所述的利用蚕蛹制备降血糖肽的方法,其特征是:

所述步骤 1) 中酸性蛋白酶的酶活力为 5 万 U/g。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的利用蚕蛹制备降血糖肽的方法,其特征是:

所述步骤 2) 中的真空冷冻干燥为:于真空度为 65Pa,冷阱温度为 -50℃,物料温度为 -25℃的条件下真空冷冻干燥,直至含水率≤7%。

4. 根据权利要求 3 所述的利用蚕蛹制备降血糖肽的方法,其特征是:

所述步骤 1) 中的离心为:3500~4500r/min 下离心 18~22min。

5. 根据权利要求 4 所述的利用蚕蛹制备降血糖肽的方法,其特征是:

所述步骤 2) 中的过滤为 3 层致密纱布袋粗滤。

6. 根据权利要求 5 所述的利用蚕蛹制备降血糖肽的方法,其特征是:

所述步骤 2) 中:脱色活性炭与酶解液的重量比为 9~11%;脱色处理时间为 1.5~2.5h。

利用蚕蛹制备降血糖肽的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及利用蚕蛹制备降血糖肽的方法。

背景技术

[0002] 目前,糖尿病已成为继肿瘤、心血管疾病之后严重威胁人类健康的慢性病,是威胁人类健康的三大慢性疾病之一,餐后高血糖是糖尿病的主要风险因子, α -葡萄糖苷酶抑制剂能通过抑制小肠上皮绒毛膜刷状缘上 α -葡萄糖苷酶的活性,减少食物中碳水化合物的消化,延缓葡萄糖的生成,在降低餐后血糖中具有重要作用。目前已开发出一些化学合成的 α -葡萄糖苷酶抑制剂(如阿卡波糖片),并应用于临床治疗。但化学合成的 α -葡萄糖苷酶抑制剂对人体能产生一定的副作用,如损害肝脏、导致胃肠气胀和肠功能紊乱等。

[0003] 目前人们已从深海鱼、牛奶等食物中分离到了具有降血糖活性的多肽。但这些方法原料成本相对较高。

[0004] 已有研究中,张海娜发现蚕蛹蛋白以碱性蛋白酶和复合蛋白酶制备ACE活性抑制肽,同时具有一定降低小鼠血糖的功效,但活性不高,且未报道其降血糖机制。李国荣通过碱性蛋白酶和复合蛋白酶酶解蚕蛹粉制备的多肽,能抑制酵母的 α -葡萄糖苷酶活性,但未涉及动物体 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,且活性不高。蚕蛹源活性肽针对动物体内 α -葡萄糖苷酶抑制活性的研究尚无报道。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种成本低、降血糖效果好的利用蚕蛹制备降血糖肽的方法。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种利用蚕蛹制备降血糖肽的方法,包括如下步骤:

[0007] 1)、在脱脂干蚕蛹粉中按照1:13~17(较佳为1:15)的重量比加入水后搅匀,然后调节pH值为3.8~4.2(较佳为4.0),作为反应起始物;于35°C~40°C,在反应起始物中加入为脱脂干蚕蛹粉重量2~3%的酸性蛋白酶,于搅拌状态下保温(35°C~40°C)酶解反应3.5~4.5h(较佳为4h);

[0008] 将酶解反应所得产物于10min内(一般为5~10分钟)升温至95~100°C,并保温8~12min(较佳为10min);然后自然冷却至室温以终止反应;然后离心,得上清液,该上清液为酶解液;

[0009] 2)、用脱色活性炭对所述酶解液于35~35°C(较佳为40°C)进行脱色处理,所得的脱色后酶解液经过滤,得粗滤酶解液;

[0010] 利用截留分子量3Kda的中空纤维聚砜超滤膜(即,聚砜中空纤维超滤膜)对粗滤酶解液进行超滤,工作压力0.1~0.2Mpa,工作温度0~45°C(例如为20~45°C),得到超滤酶解液;

[0011] 先利用真空浓缩机将此超滤酶解液浓缩至原重的25~40%,然后真空冷冻干燥,

得到具有降血糖功能的肽粉（即，降血糖肽）。

[0012] 作为本发明的利用蚕蛹制备降血糖肽的方法的改进：

[0013] 步骤 1) 中酸性蛋白酶的酶活力为 5 万 U/g。

[0014] 作为本发明的利用蚕蛹制备降血糖肽的方法的进一步改进：

[0015] 所述步骤 2) 中的真空冷冻干燥为：于真空度为 65Pa, 冷阱温度为 -50°C , 物料温度为 -25°C 的条件下真空冷冻干燥, 直至含水率 $\leq 7\%$ (质量%)。

[0016] 作为本发明的利用蚕蛹制备降血糖肽的方法的进一步改进：

[0017] 所述步骤 1) 中的离心为：3500 ~ 4500r/min 下离心 18 ~ 22min (较佳为 4000r/min 离心 20min)。

[0018] 作为本发明的利用蚕蛹制备降血糖肽的方法的进一步改进：

[0019] 所述步骤 2) 中的过滤为 3 层致密纱布袋粗滤。

[0020] 作为本发明的利用蚕蛹制备降血糖肽的方法的进一步改进：所述步骤 2) 中：脱色活性炭与酶解液的重量比为 9 ~ 11% (较佳为 10%)；脱色处理时间为 1.5 ~ 2.5h (较佳为 2h)。

[0021] 备注说明：

[0022] 1、本发明中作为原料的脱脂干蚕蛹粉或蚕蛹蛋白粉, 其含水率均 $\leq 1.5\%$ (重量%)；脂肪含量 $\leq 3\%$ (重量%)。

[0023] 2、本发明所指的室温为 $10 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 。

[0024] 3、本发明的酸性蛋白酶, 例如可选用上海源叶生物科技有限公司生产的 M0010 酸性蛋白酶 BR。

[0025] 4、采用本发明方法制备而得的降血糖活性肽的使用方法和用量为口服, 每日两次, 每次 2-3g。

[0026] 本发明的利用蚕蛹制备利用蚕蛹制备降血糖肽的方法的方法, 具有如下优点：

[0027] 1)、本发明所制备的降血糖肽是脱脂干蚕蛹或蚕蛹蛋白粉经生物酶水解而得, 对高血糖患者具有降血糖的作用, 安全、无毒副作用, 对血糖水平正常者可起到保健作用, 对正常血糖水平无影响。

[0028] 2)、本发明所采用的原料来源广泛, 价格低廉, 经过本发明的技术转化可以有效的提高丝厂蚕蛹副产物的附加值, 对继续促进桑蚕产业的发展具有重要意义。

[0029] 即, 从而使采用缫丝后经脱脂的干蚕蛹这一原料广泛、价格低廉的蛋白质源制备降血糖肽的技术具有更广泛的应用前景。

[0030] 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, 具有较强的工业实施性。

[0031] 综上所述, 本发明是一项针对动物体内 α -葡萄糖苷酶具有高抑制活性的蚕蛹蛋白源降血糖肽的制备方法, 对于深化蚕蛹蛋白资源在功能食品和医药领域的应用具有重要意义。本发明以蚕蛹蛋白 (脱脂干蚕蛹粉) 为原料, 选择酸性蛋白酶对蚕蛹蛋白进行酶解, 通过特定的酶解条件, 制备所得的蚕蛹蛋白降血糖肽具有对 α -葡萄糖苷酶活性高, 稳定性好的特点。

具体实施方式

[0032] 下述案例中的脱脂干蚕蛹粉的水分含量 1.5%，蛋白质含量 75.03%，脂肪含量 3%，上述%均为重量%；该脱脂干蚕蛹粉例如可购自南通福丽尔生物制品有限公司。

[0033] 实施例 1、一种利用蚕蛹制取降血糖肽的方法，依次进行以下步骤：

[0034] 1)、称取粉碎后的脱脂干蚕蛹粉 10kg，加水 150kg 搅匀后，用适量 HCl 调节 pH 值为 4.0 后，作为反应起始物，控制温度为 35℃～40℃，在反应起始物中加入酸性蛋白酶（酶活力为 5 万 U/g）300g，继续保温（35℃～40℃）并不断搅拌进行酶解反应 4h。

[0035] 反应时间到达后，将酶解反应所得产物于 5～10 分钟内升温至 95～100℃，并保温（95～100℃）10min；然后自然冷却至室温来终止反应。

[0036] 然后在 4000r/min 下离心 20min，得上清液 98kg，该上清液为酶解液；

[0037] 2)、用 9.8kg 的脱色活性炭对此酶解液脱色 2h，温度控制在 40℃；所得的脱色后酶解液经 3 层致密纱布袋粗滤，得粗滤酶解液。利用中空纤维聚砜超滤膜（截留分子量 3KDa）对粗滤酶解液进行超滤，工作压力 0.1～0.2Mpa，工作温度 20～45℃，得到超滤酶解液 50kg。

[0038] 利用真空浓缩机将此超滤酶解液浓缩至 20kg，进行真空冷冻（真空度达 65Pa，冷阱温度为 -50℃，物料温度为 -25℃）至干燥（即，含水率≤7%），得到具有降血糖功能的肽粉（蚕蛹肽）0.96kg，肽含量为 90.2%，产品得率为 8.66%。

[0039] 配制 3mg/mL 的上述蚕蛹肽溶液，测得其对小鼠肠内 α-葡萄糖苷酶抑制活性为 73.9%，其 IC₅₀ 为 2.03mg/mL。

[0040] 测试方法参考文献：Pierre Chapdelaine, Roland RTremblay, Jean Y Dube P-Nitrophenol- α -D-Glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in Human Semen[J]. CLIN CHEM1987, 2(24)208-211 进行。

[0041] 实施例 2、一种利用蚕蛹制取降血糖肽的方法，依次进行以下步骤：

[0042] 1)、称取粉碎后的脱脂干蚕蛹粉 40kg，加水 600kg 搅匀后，用适量 HCl 调节 pH 值为 4.0 后，作为反应起始物，控制温度为 35℃～40℃，在反应起始物中加入酸性蛋白酶（酶活力为 5 万 U/g）800g，继续保温并不断搅拌进行酶解反应 4h。

[0043] 酶解时间到达后，将酶解反应所得产物于 5～10 分钟内升温至 95-100℃，并保温 10min；然后自然冷却至室温来终止反应。

[0044] 然后在 4000r/min 下离心 20min，得上清液 390kg，该上清液为酶解液；

[0045] 2)、用 39kg 的脱色活性炭对此酶解液脱色 2h，温度控制在 40℃；所得的脱色后酶解液经 3 层致密纱布袋粗滤，得粗滤酶解液。利用中空纤维聚砜超滤膜（截留分子量 3KDa）对粗滤酶解液进行超滤，工作压力 0.1～0.2Mpa，工作温度 20～45℃，得到超滤酶解液 200kg。

[0046] 利用真空浓缩机将此超滤酶解液浓缩至 50kg，进行真空冷冻至干燥（真空度达 65Pa，冷阱温度为 -50℃，物料温度为 -25℃）至干燥（即，含水率≤7%），得到具有降血糖功能的肽粉 3.68kg，肽含量为 92.5%，产品得率为 8.51%。

[0047] 配制 3mg/mL 的上述蚕蛹肽溶液，测得其对小鼠肠内 α-葡萄糖苷酶抑制活性为 75.1%，IC₅₀ 为 2.00mg/mL。

[0048] 对比例 1、将脱脂干蚕蛹粉按照背景技术中告知的“利用深海鱼分离具有降血糖活性多肽”的方法进行制备；

[0049] 即,以脱脂干蚕蛹粉替代等干重的深海鱼,其余内容等同于该方法。

[0050] 所得结果为:

[0051] 得到具有降血糖功能的肽粉 0.89kg,肽含量为 87.4%,产品得率为 7.78%。

[0052] 配制 3mg/mL 的上述蚕蛹肽,测得其对小鼠肠内 α -葡萄糖苷酶抑制活性为 28.6%, IC_{50} 为 5.24mg/mL。

[0053] 对比例 2-1、将实施例 1 中的“酸性蛋白酶(酶活力为 5 万 U/g)300g”改成“碱性蛋白酶(酶活力为 10 万 U/g)300g”,且将调节 pH 值为 4.0 相应的更改成调节 pH 值为 9-11;反应温度更改为 50 ~ 60°C;其余等同于实施例 1。

[0054] 所得结果为:

[0055] 得到的具有降血糖功能的肽粉中肽含量为 90.7%,产品得率为 20.6%。

[0056] 配制 3mg/mL 的上述蚕蛹肽,测得其对小鼠肠内 α -葡萄糖苷酶抑制活性为 13.2%, IC_{50} 为 11.36mg/mL。

[0057] 通过上述结果可见,该案例虽然水解度相对高,因此得率较高;可是所得的蚕蛹肽对小鼠肠内 α -葡萄糖苷酶抑制活性却大大降低。

[0058] 对比例 2-2、将实施例 1 中的“酸性蛋白酶(酶活力为 5 万 U/g)300g”改成“复合蛋白酶(酶活力为 12 万 U/g)200g”,且将调节 pH 值为 4.0 相应的更改成调节 pH 值为 6-8;反应温度为 40 ~ 50°C;其余等同于实施例 1。

[0059] 所得结果为:

[0060] 得到具有降血糖功能的肽粉 0.81kg,肽含量为 91.3%,产品得率为 7.4%。

[0061] 配制 3mg/mL 的上述蚕蛹肽,测得其对小鼠肠内 α -葡萄糖苷酶抑制活性为 7.8%, IC_{50} 为 19.23mg/mL。

[0062] 通过对比例结果可见,该案例所得的蚕蛹肽对小鼠肠内 α -葡萄糖苷酶抑制活性却大大降低。

[0063] 最后,还需要注意的是,以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然,本发明不限于以上实施例,还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。