



(10) 授权公告号 CN 114468112 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 15

(21) 申请号 202210255535.8

A23J 3/34 (2006.01)

(22) 申请日 2022.03.15

A23L 5/20 (2016.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114468112 A

(56) 对比文件

CN 107937464 A, 2018.04.20

CN 102090692 A, 2011.06.15

(43) 申请公布日 2022.05.13

WO 2020232975 A1, 2020.11.26

(73) 专利权人 海南盛美诺生物技术有限公司

CN 102727571 A, 2012.10.17

地址 571900 海南省澄迈县老城经济开发区玉堂南路0.4公里处西侧

CN 104839741 A, 2015.08.19

CN 102766670 A, 2012.11.07

(72) 发明人 杨维 陈忆宾

CN 107475342 A, 2017.12.15

CN 106690140 A, 2017.05.24

(74) 专利代理机构 北京华际知识产权代理有限公司 11676

审查员 颜小平

专利代理师 冯春回

(51) Int. Cl.

C12P 21/06 (2006.01)

A23J 1/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称

一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,涉及多肽的提取工艺。本发明在制备抗疲劳功能多肽时,以除去壳和内脏的新鲜牡蛎为原料,通过高压冷冻处理,再粉磨成牡蛎粉,用胃蛋白酶对二次高压冷冻处理后的牡蛎粉进行酶解通过离心得酶解上清液,将酶解上清液过透析膜后用透析袋透析制得牡蛎多肽,用牡蛎多肽对铁元素进行螯合制得抗疲劳功能多肽胶体,最后将抗疲劳功能多肽胶体进行二次粉磨,杀菌,氮气封存制得。本发明制备的多肽产率较高并具有良好的抗疲劳效果。

1. 一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,其特征在于,所述抗疲劳功能多肽的制备方法主要包括以下制备步骤:

(1) 高压冷冻处理:将除去壳和内脏的新鲜牡蛎用液氮冷冻,使冷冻温度达到 $-100\sim-80^{\circ}\text{C}$ 并保持 $10\sim20\text{min}$,再增加压力至 $200\sim300\text{MPa}$ 并保持 $20\sim30\text{min}$;

(2) 粉磨脱脂:将高压冷冻处理后的牡蛎在 $-10\sim-5^{\circ}\text{C}$ 环境温度下先粉碎至颗粒小于 9mm 后再置于粉磨机中,在 $-10\sim-5^{\circ}\text{C}$ 环境温度下粉磨至颗粒小于 1mm ,再用丙酮进行离心洗涤,在 $-10\sim-5^{\circ}\text{C}$ 温度, $5\sim10\text{Pa}$ 压力下干燥 $4\sim6\text{h}$,制得牡蛎粉;

(3) 二次高压冷冻处理:将牡蛎粉放置在氮氛围中, $-80\sim-60^{\circ}\text{C}$, $200\sim300\text{MPa}$ 的环境中处理 $40\sim60\text{min}$;

(4) 酶解:将二次高压冷冻处理后的牡蛎粉和纯水按质量比 $1:10$ 混合均匀,再加入二次高压冷冻处理后的牡蛎粉质量 $0.03\sim0.05$ 倍的乙酸和二次高压冷冻处理后的牡蛎粉质量 $0.01\sim0.02$ 倍的胃蛋白酶,在 $10\sim20^{\circ}\text{C}$ 下以 $800\sim1000\text{r/min}$ 的转速搅拌 $30\sim36\text{h}$,再在 $10\sim20^{\circ}\text{C}$ 下以 $12000\sim15000\text{r/min}$ 的转速离心 $20\sim30\text{min}$,取酶解上清液;

(5) 透析螯合:将酶解上清液过透析膜,将通过透析膜的透析液用质量分数 0.1% 的氢氧化钠溶液调节至中性并置于透析袋中,浸入 $5\sim10^{\circ}\text{C}$ 中的纯水中透析 $42\sim48\text{h}$,每 6h 换一次纯水,在 $1\sim5^{\circ}\text{C}$ 温度, $5\sim10\text{Pa}$ 压力下干燥 $4\sim6\text{h}$,制得牡蛎多肽,将牡蛎多肽和纯水按质量比 $1:20$ 混合均匀,再加入牡蛎多肽质量 $0.3\sim0.5$ 倍的氯化铁,在 $60\sim70^{\circ}\text{C}$ 下以 $1000\sim1500\text{r/min}$ 的转速搅拌 $60\sim80\text{min}$ 后冷却至 $1\sim10^{\circ}\text{C}$ 过滤,并用纯水洗涤 $3\sim5$ 次,制得抗疲劳功能多肽胶体;

(6) 二次粉磨:将抗疲劳功能多肽胶体用胶体磨磨成浆,在 $-10\sim-5^{\circ}\text{C}$ 温度, $5\sim10\text{Pa}$ 压力下干燥 $4\sim6\text{h}$,再用超微粉碎机研磨至颗粒小于 0.01mm ,制得抗疲劳功能多肽粉体;

(7) 杀菌:将抗疲劳功能多肽粉体置于高压脉冲电场中,在温度 $5\sim10^{\circ}\text{C}$ 下处理 $20\sim30\text{s}$;

(8) 氮气封存:先用对玻璃容器进行氮气置换,再放入杀菌后的抗疲劳功能多肽粉体并达到玻璃容器容量的 $70\sim80\%$,再次通入氮气置换玻璃容器内的气体后进行密封保存,得到抗疲劳功能多肽。

2. 根据权利要求1所述的一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,其特征在于,步骤(1)所述新鲜牡蛎为新鲜长牡蛎,单个牡蛎体重为 $200\sim400\text{g}$ 。

3. 根据权利要求1所述的一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,其特征在于,步骤(2)所述离心洗涤的方法为:将粉磨后的牡蛎与丙酮按质量比 $1:2$ 混合均匀,在 $40\sim50^{\circ}\text{C}$ 下以 $8000\sim10000\text{r/min}$ 的转速离心 $20\sim30\text{min}$,去除离心上清液后重复 $3\sim5$ 次。

4. 根据权利要求1所述的一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,其特征在于,步骤(4)所述胃蛋白酶的国际系统编号为EC3.4.23.1。

5. 根据权利要求1所述的一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,其特征在于,步骤(5)所述透析膜规格为 $2000\sim3000\text{Da}$,透析袋规格为 $400\sim500\text{Da}$ 。

6. 根据权利要求1所述的一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,其特征在于,步骤(7)所述高压脉冲电场参数为:场强 $30\sim50\text{kV/cm}$,脉冲频率 $200\sim400\text{Hz}$ 。

一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及多肽的提取工艺,具体为一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法。

背景技术

[0002] 牡蛎肉质鲜美,营养丰富,常被称为“海洋牛奶”,是一种天然的保健食品。牡蛎中含有丰富的蛋白质、糖原、牛磺酸、不饱和脂肪酸、微量元素和维生素,这些物质能有效消除疲劳、提高机体免疫力、保护肝脏,牡蛎糖原能有效促进皮肤细胞再生,减少紫外线辐射对皮肤的损伤,抑制皮肤的衰老。牡蛎中同时含有全部8种必需氨基酸,及DHA和EPA,具有防止老年痴呆、抑制血小板凝聚等作用,是水产品精深加工近年来追逐的热点。

[0003] 牡蛎蛋白中含有丰富的生物活性肽,研究发现这些生物活性肽具有多种生理调节功能,包括抗氧化、抗高血压、促进儿童生长发育、改善男性生殖功能等生物活性。如何从牡蛎中提取生物活性肽并能工业化生产,是食品行业的热点问题。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,以解决现有技术中存在的问题。

[0005] 一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,主要包括以下制备步骤:高压冷冻处理,粉磨,二次高压冷冻处理,酶解,透析整合,二次粉磨,杀菌,氮气封存。

[0006] 作为优化,所述抗疲劳功能多肽的制备方法主要包括以下制备步骤:

[0007] (1)高压冷冻处理:将除去壳和内脏的新鲜牡蛎用液氮冷冻,使冷冻温度达到-100~-80℃并保持10~20min,再增加压力至200~300MPa并保持20~30min;

[0008] (2)粉磨脱脂:将高压冷冻处理后的新鲜牡蛎在-10~-5℃环境温度下先粉碎至颗粒小于9mm后再置于粉磨机中,在-10~-5℃环境温度下粉磨至颗粒小于1mm,再用丙酮进行离心洗涤,在-10~-5℃温度,5~10Pa压力下干燥4~6h,制得牡蛎粉;

[0009] (3)二次高压冷冻处理:将牡蛎粉放置在氮氛围中,-80~-60℃,200~300MPa的环境中处理40~60min;

[0010] (4)酶解:将二次高压冷冻处理后的牡蛎粉和纯水按质量比1:10混合均匀,再加入二次高压冷冻处理后的牡蛎粉质量0.03~0.05倍的乙酸和二次高压冷冻处理后的牡蛎粉质量0.01~0.02倍的胃蛋白酶,在10~20℃下以800~1000r/min的转速搅拌30~36h,再在10~20℃下以12000~15000r/min的转速离心20~30min,取酶解上清液;

[0011] (5)透析整合:将酶解上清液过透析膜,将通过透析膜的透析液用质量分数0.1%的氢氧化钠溶液调节至中性并置于透析袋中,浸入5~10℃中的纯水中透析42~48h,每6h换一次纯水,在1~5℃温度,5~10Pa压力下干燥4~6h,制得牡蛎多肽,将牡蛎多肽和纯水按质量比1:20混合均匀,再加入牡蛎多肽质量0.3~0.5倍的氯化铁,在60~70℃下以1000~1500r/min的转速搅拌60~80min后冷却至1~10℃过滤,并用纯水洗涤3~5次,制得抗疲

劳功能多肽胶体；

[0012] (6) 二次粉磨：将抗疲劳功能多肽胶体用胶体磨磨成浆，在-10~-5℃温度，5~10Pa压力下干燥4~6h，再用超微粉碎机研磨至颗粒小于0.01mm，制得抗疲劳功能多肽粉体；

[0013] (7) 杀菌：将抗疲劳功能多肽粉体置于高压脉冲电场中，在温度5~10℃下处理20~30s；

[0014] (8) 氮气封存：先用对玻璃容器进行氮气置换，再放入杀菌后的抗疲劳功能多肽粉体并达到玻璃容器容量的70~80%，再次通入氮气置换玻璃容器内的气体后进行密封保存，得到抗疲劳功能多肽。

[0015] 作为优化，步骤(1)所述新鲜牡蛎为新鲜长牡蛎，单个牡蛎体重为200~400g。

[0016] 作为优化，步骤(2)所述离心洗涤的方法为：将粉磨后的牡蛎与丙酮按质量比1:2混合均匀，在40~50℃下以8000~10000r/min的转速离心20~30min，去除离心上清液后重复3~5次。

[0017] 作为优化，步骤(4)所述胃蛋白酶的国际系统编号为EC3.4.23.1。

[0018] 作为优化，步骤(5)所述透析膜规格为2000~3000Da，透析袋规格为400~500Da。

[0019] 作为优化，步骤(7)所述高压脉冲电场参数为：场强30~50kV/cm，脉冲频率200~400Hz。

[0020] 与现有技术相比，本发明所达到的有益效果是：

[0021] 本发明在提取抗疲劳功能多肽时，以新鲜牡蛎为原料高压冷冻处理，粉磨，二次高压冷冻处理，酶解，透析螯合，二次粉磨，杀菌，氮气封存制得抗疲劳功能多肽。

[0022] 首先进行高压冷冻处理，用液氮直接冷冻，低温使水转化冰晶从而使细胞涨破，达到杀菌效果，再加压使冰晶转化为玻璃态水，水的形态变化引起体积变化与牡蛎本身体积变化不同步从而使牡蛎内部产生微观裂口，易于后续加工；再将高压冷冻处理后的牡蛎进行粉磨成粉后丙酮浸洗干燥，制得牡蛎粉，对牡蛎粉进行二次高压冷冻处理，高压作用下静电作用力、疏水作用力的变化较大，使蛋白质中肽链卷曲折叠形成三级结构和具有三级结构的多肽链相互结合形成四级结构破坏，冷冻作用下静电作用力、氢键作用力的变化较大，使蛋白质的二级结构和三级结构破坏，使后续酶解过程中一级结构的肽键暴露程度高，与酶有更好的结合效果，从而促进酶解效果提高多肽产率；

[0023] 其次，用胃蛋白酶对二次高压冷冻处理后的牡蛎粉进行酶解，使二次高压冷冻处理后的牡蛎粉中的蛋白质水解成小分子多肽，易被人体吸收利用；再进行透析螯合处理，筛选小分子多肽，并使多肽和铁元素进行螯合，制得螯合多肽，铁元素通过与多肽螯合使得与其他元素拮抗作用小，稳定性好，吸收利用率高，吸收的铁元素参与人体内造血、运输、携带营养物质，避免缺乏营养物质而引起疲劳，与多肽能够减少心肌线粒体氧自由基生成的效果共同作用，从而提高了螯合多肽的抗疲劳功能。

具体实施方式

[0024] 下面将结合本发明实施例，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都

属于本发明保护的范围。

[0025] 为了更清楚的说明本发明提供的方法通过以下实施例进行详细说明,在以下实施例中制作的抗疲劳功能多肽的各指标测试方法如下:

[0026] 产率:通过计算各实施例所得的疲劳功能多肽与对比例材料的产量与除去壳和内脏的新鲜牡蛎质量的比值得到产率。

[0027] 抗疲劳效果:取体重年龄基本相同的小鼠,将各实施例所得的疲劳功能多肽与对比例材料取相同质量对各小鼠进行灌胃,6小时候进行小鼠力竭游泳实验,记录游泳时长。

[0028] 实施例1

[0029] 一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,所述抗疲劳功能多肽的制备方法主要包括以下制备步骤:

[0030] (1) 高压冷冻处理:将除去壳和内脏的新鲜牡蛎用液氮冷冻,使冷冻温度达到-100℃并保持10min,再增加压力至200MPa并保持20min;

[0031] (2) 粉磨脱脂:将高压冷冻处理后的新鲜牡蛎在-10℃环境温度下先粉碎至颗粒小于9mm后再置于粉磨机中,在-10℃环境温度下粉磨至颗粒小于1mm,再用丙酮进行离心洗涤,在-10℃温度,5Pa压力下干燥6h,制得牡蛎粉;

[0032] (3) 二次高压冷冻处理:将牡蛎粉放置在氮氛围中,-80℃,200MPa的环境中处理60min;

[0033] (4) 酶解:将二次高压冷冻处理后的牡蛎粉和纯水按质量比1:10混合均匀,再加入二次高压冷冻处理后的牡蛎粉质量0.03倍的乙酸和二次高压冷冻处理后的牡蛎粉质量0.01倍的胃蛋白酶,在10℃下以800r/min的转速搅拌36h,再在10℃下以12000r/min的转速离心30min,取酶解上清液;

[0034] (5) 透析螯合:将酶解上清液过透析膜,将通过透析膜的透析液用质量分数0.1%的氢氧化钠溶液调节至中性并置于透析袋中,浸入5℃中的纯水中透析48h,每6h换一次纯水,在1℃温度,5Pa压力下干燥6h,制得牡蛎多肽,将牡蛎多肽和纯水按质量比1:20混合均匀,再加入牡蛎多肽质量0.3倍的氯化铁,在60℃下以1000r/min的转速搅拌80min后冷却至1℃过滤,并用纯水洗涤3次,制得抗疲劳功能多肽胶体;

[0035] (6) 二次粉磨:将抗疲劳功能多肽胶体用胶体磨磨成浆,在-10℃温度,5Pa压力下干燥6h,再用超微粉碎机研磨至颗粒小于0.01mm,制得抗疲劳功能多肽粉体;

[0036] (7) 杀菌:将抗疲劳功能多肽粉体置于高压脉冲电场中,在温度5℃下处理30s;

[0037] (8) 氮气封存:先用对玻璃容器进行氮气置换,再放入杀菌后的抗疲劳功能多肽粉体并达到玻璃容器容量的70%,再次通入氮气置换玻璃容器内的气体后进行密封保存,得到抗疲劳功能多肽。

[0038] 作为优化,步骤(1)所述新鲜牡蛎为新鲜长牡蛎,单个牡蛎体重为200g。

[0039] 作为优化,步骤(2)所述离心洗涤的方法为:将粉磨后的牡蛎与丙酮按质量比1:2混合均匀,在40℃下以8000r/min的转速离心30min,去除离心上清液后重复3次。

[0040] 作为优化,步骤(4)所述胃蛋白酶的国际系统编号为EC3.4.23.1。

[0041] 作为优化,步骤(5)所述透析膜规格为2000Da,透析袋规格为400Da。

[0042] 作为优化,步骤(7)所述高压脉冲电场参数为:场强30kV/cm,脉冲频率400Hz。

[0043] 实施例2

[0044] 一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,所述抗疲劳功能多肽的制备方法主要包括以下制备步骤:

[0045] (1) 高压冷冻处理:将除去壳和内脏的新鲜牡蛎用液氮冷冻,使冷冻温度达到-90℃并保持15min,再增加压力至250MPa并保持25min;

[0046] (2) 粉磨脱脂:将高压冷冻处理后的新鲜牡蛎在-8℃环境温度下先粉碎至颗粒小于9mm后再置于粉磨机中,在-8℃环境温度下粉磨至颗粒小于1mm,再用丙酮进行离心洗涤,在-8℃温度,8Pa压力下干燥5h,制得牡蛎粉;

[0047] (3) 二次高压冷冻处理:将牡蛎粉放置在氮氛围中,-70℃,250MPa的环境中处理50min;

[0048] (4) 酶解:将二次高压冷冻处理后的牡蛎粉和纯水按质量比1:10混合均匀,再加入二次高压冷冻处理后的牡蛎粉质量0.04倍的乙酸和二次高压冷冻处理后的牡蛎粉质量0.01倍的胃蛋白酶,在15℃下以900r/min的转速搅拌33h,再在15℃下以13000r/min的转速离心25min,取酶解上清液;

[0049] (5) 透析螯合:将酶解上清液过透析膜,将通过透析膜的透析液用质量分数0.1%的氢氧化钠溶液调节至中性并置于透析袋中,浸入8℃中的纯水中透析45h,每6h换一次纯水,在3℃温度,8Pa压力下干燥5h,制得牡蛎多肽,将牡蛎多肽和纯水按质量比1:20混合均匀,再加入牡蛎多肽质量0.4倍的氯化铁,在65℃下以1300r/min的转速搅拌70min后冷却至5℃过滤,并用纯水洗涤4次,制得抗疲劳功能多肽胶体;

[0050] (6) 二次粉磨:将抗疲劳功能多肽胶体用胶体磨磨成浆,在-8℃温度,8Pa压力下干燥5h,再用超微粉碎机研磨至颗粒小于0.01mm,制得抗疲劳功能多肽粉体;

[0051] (7) 杀菌:将抗疲劳功能多肽粉体置于高压脉冲电场中,在温度8℃下处理25s;

[0052] (8) 氮气封存:先用对玻璃容器进行氮气置换,再放入杀菌后的抗疲劳功能多肽粉体并达到玻璃容器容量的75%,再次通入氮气置换玻璃容器内的气体后进行密封保存,得到抗疲劳功能多肽。

[0053] 作为优化,步骤(1)所述新鲜牡蛎为新鲜长牡蛎,单个牡蛎体重为300g。

[0054] 作为优化,步骤(2)所述离心洗涤的方法为:将粉磨后的牡蛎与丙酮按质量比1:2混合均匀,在45℃下以9000r/min的转速离心25min,去除离心上清液后重复4次。

[0055] 作为优化,步骤(4)所述胃蛋白酶的国际系统编号为EC3.4.23.1。

[0056] 作为优化,步骤(5)所述透析膜规格为2500Da,透析袋规格为450Da。

[0057] 作为优化,步骤(7)所述高压脉冲电场参数为:场强40kV/cm,脉冲频率300Hz。

[0058] 实施例3

[0059] 一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,所述抗疲劳功能多肽的制备方法主要包括以下制备步骤:

[0060] (1) 高压冷冻处理:将除去壳和内脏的新鲜牡蛎用液氮冷冻,使冷冻温度达到-80℃并保持10min,再增加压力至300MPa并保持30min;

[0061] (2) 粉磨脱脂:将高压冷冻处理后的新鲜牡蛎在-5℃环境温度下先粉碎至颗粒小于9mm后再置于粉磨机中,在-5℃环境温度下粉磨至颗粒小于1mm,再用丙酮进行离心洗涤,在-5℃温度,10Pa压力下干燥6h,制得牡蛎粉;

[0062] (3) 二次高压冷冻处理:将牡蛎粉放置在氮氛围中,-60℃,300MPa的环境中处理

40min;

[0063] (4) 酶解:将二次高压冷冻处理后的牡蛎粉和纯水按质量比1:10混合均匀,再加入二次高压冷冻处理后的牡蛎粉质量0.05倍的乙酸和二次高压冷冻处理后的牡蛎粉质量0.02倍的胃蛋白酶,在20℃下以1000r/min的转速搅拌30h,再在20℃下以15000r/min的转速离心20min,取酶解上清液;

[0064] (5) 透析整合:将酶解上清液过透析膜,将通过透析膜的透析液用质量分数0.1%的氢氧化钠溶液调节至中性并置于透析袋中,浸入10℃中的纯水中透析42h,每6h换一次纯水,在5℃温度,10Pa压力下干燥4h,制得牡蛎多肽,将牡蛎多肽和纯水按质量比1:20混合均匀,再加入牡蛎多肽质量0.5倍的氯化铁,在70℃下以1500r/min的转速搅拌60min后冷却至10℃过滤,并用纯水洗涤5次,制得抗疲劳功能多肽胶体;

[0065] (6) 二次粉磨:将抗疲劳功能多肽胶体用胶体磨磨成浆,在-5℃温度,10Pa压力下干燥4h,再用超微粉碎机研磨至颗粒小于0.01mm,制得抗疲劳功能多肽粉体;

[0066] (7) 杀菌:将抗疲劳功能多肽粉体置于高压脉冲电场中,在温度10℃下处理20s;

[0067] (8) 氮气封存:先用对玻璃容器进行氮气置换,再放入杀菌后的抗疲劳功能多肽粉体并达到玻璃容器容量的80%,再次通入氮气置换玻璃容器内的气体后进行密封保存,得到抗疲劳功能多肽。

[0068] 作为优化,步骤(1)所述新鲜牡蛎为新鲜长牡蛎,单个牡蛎体重为400g。

[0069] 作为优化,步骤(2)所述离心洗涤的方法为:将粉磨后的牡蛎与丙酮按质量比1:2混合均匀,在50℃下以10000r/min的转速离心20min,去除离心上清液后重复5次。

[0070] 作为优化,步骤(4)所述胃蛋白酶的国际系统编号为EC3.4.23.1。

[0071] 作为优化,步骤(5)所述透析膜规格为3000Da,透析袋规格为500Da。

[0072] 作为优化,步骤(7)所述高压脉冲电场参数为:场强50kV/cm,脉冲频率200Hz。

[0073] 对比例1

[0074] 一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,所述抗疲劳功能多肽的制备方法主要包括以下制备步骤:

[0075] (1) 粉磨脱脂:将除去壳和内脏的新鲜牡蛎在-10℃环境温度下先粉碎至颗粒小于9mm后再置于粉磨机中,在-10℃环境温度下粉磨至颗粒小于1mm,再用丙酮进行离心洗涤,在-10℃温度,5Pa压力下干燥6h,制得牡蛎粉;

[0076] (2) 酶解:将牡蛎粉和纯水按质量比1:10混合均匀,再加入牡蛎粉质量0.03倍的乙酸和牡蛎粉质量0.01倍的胃蛋白酶,在10℃下以800r/min的转速搅拌36h,再在10℃下以12000r/min的转速离心30min,取酶解上清液;

[0077] (3) 透析:将酶解上清液过透析膜,将通过透析膜的透析液用质量分数0.1%的氢氧化钠溶液调节至中性并置于透析袋中,浸入5℃中的纯水中透析48h,每6h换一次纯水,在1℃温度,5Pa压力下干燥6h,制得抗疲劳功能多肽胶体;

[0078] (4) 二次粉磨:将抗疲劳功能多肽胶体用胶体磨磨成浆,在-10℃温度,5Pa压力下干燥6h,再用超微粉碎机研磨至颗粒小于0.01mm,制得抗疲劳功能多肽粉体;

[0079] (5) 杀菌:将抗疲劳功能多肽粉体置于高压脉冲电场中,在温度5℃下处理30s;

[0080] (6) 氮气封存:先用对玻璃容器进行氮气置换,再放入杀菌后的抗疲劳功能多肽粉体并达到玻璃容器容量的70%,再次通入氮气置换玻璃容器内的气体后进行密封保存,得

到抗疲劳功能多肽。

[0081] 作为优化,步骤(1)所述新鲜牡蛎为新鲜长牡蛎,单个牡蛎体重为200g。

[0082] 作为优化,步骤(1)所述离心洗涤的方法为:将粉磨后的牡蛎与丙酮按质量比1:2混合均匀,在40℃下以8000r/min的转速离心30min,去除离心上清液后重复3次。

[0083] 作为优化,步骤(2)所述胃蛋白酶的国际系统编号为EC3.4.23.1。

[0084] 作为优化,步骤(3)所述透析膜规格为2000Da,透析袋规格为400Da。

[0085] 作为优化,步骤(5)所述高压脉冲电场参数为:场强30kV/cm,脉冲频率400Hz。

[0086] 对比例2

[0087] 一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,所述抗疲劳功能多肽的制备方法主要包括以下制备步骤:

[0088] (1)粉磨脱脂:将除去壳和内脏的新鲜牡蛎在-10℃环境温度下先粉碎至颗粒小于9mm后再置于粉磨机中,在-10℃环境温度下粉磨至颗粒小于1mm,再用丙酮进行离心洗涤,在-10℃温度,5Pa压力下干燥6h,制得牡蛎粉;

[0089] (2)高压冷冻处理:将牡蛎粉放置在氮氛围中,-80℃,200MPa的环境中处理60min;

[0090] (3)酶解:将高压冷冻处理后的牡蛎粉和纯水按质量比1:10混合均匀,再加入高压冷冻处理后的牡蛎粉质量0.03倍的乙酸和高压冷冻处理后的牡蛎粉质量0.01倍的胃蛋白酶,在10℃下以800r/min的转速搅拌36h,再在10℃下以12000r/min的转速离心30min,取酶解上清液;

[0091] (4)透析螯合:将酶解上清液过透析膜,将通过透析膜的透析液用质量分数0.1%的氢氧化钠溶液调节至中性并置于透析袋中,浸入5℃中的纯水中透析48h,每6h换一次纯水,在1℃温度,5Pa压力下干燥6h,制得牡蛎多肽,将牡蛎多肽和纯水按质量比1:20混合均匀,再加入牡蛎多肽质量0.3倍的氯化铁,在60℃下以1000r/min的转速搅拌80min后冷却至1℃过滤,并用纯水洗涤3次,制得抗疲劳功能多肽胶体;

[0092] (5)二次粉磨:将抗疲劳功能多肽胶体用胶体磨磨成浆,在-10℃温度,5Pa压力下干燥6h,再用超微粉碎机研磨至颗粒小于0.01mm,制得抗疲劳功能多肽粉体;

[0093] (6)杀菌:将抗疲劳功能多肽粉体置于高压脉冲电场中,在温度5℃下处理30s;

[0094] (7)氮气封存:先用对玻璃容器进行氮气置换,再放入杀菌后的抗疲劳功能多肽粉体并达到玻璃容器容量的70%,再次通入氮气置换玻璃容器内的气体后进行密封保存,得到抗疲劳功能多肽。

[0095] 作为优化,步骤(1)所述新鲜牡蛎为新鲜长牡蛎,单个牡蛎体重为200g。

[0096] 作为优化,步骤(1)所述离心洗涤的方法为:将粉磨后的牡蛎与丙酮按质量比1:2混合均匀,在40℃下以8000r/min的转速离心30min,去除离心上清液后重复3次。

[0097] 作为优化,步骤(3)所述胃蛋白酶的国际系统编号为EC3.4.23.1。

[0098] 作为优化,步骤(4)所述透析膜规格为2000Da,透析袋规格为400Da。

[0099] 作为优化,步骤(6)所述高压脉冲电场参数为:场强30kV/cm,脉冲频率400Hz。

[0100] 对比例3

[0101] 一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,所述抗疲劳功能多肽的制备方法主要包括以下制备步骤:

[0102] (1)高压冷冻处理:将除去壳和内脏的新鲜牡蛎用液氮冷冻,使冷冻温度达到-100

℃并保持10min,再增加压力至200MPa并保持20min;

[0103] (2)粉磨脱脂:将高压冷冻处理后的新鲜牡蛎在-10℃环境温度下先粉碎至颗粒小于9mm后再置于粉磨机中,在-10℃环境温度下粉磨至颗粒小于1mm,再用丙酮进行离心洗涤,在-10℃温度,5Pa压力下干燥6h,制得牡蛎粉;

[0104] (3)酶解:将牡蛎粉和纯水按质量比1:10混合均匀,再加入牡蛎粉质量0.03倍的乙酸和牡蛎粉质量0.01倍的胃蛋白酶,在10℃下以800r/min的转速搅拌36h,再在10℃下以12000r/min的转速离心30min,取酶解上清液;

[0105] (4)透析螯合:将酶解上清液过透析膜,将通过透析膜的透析液用质量分数0.1%的氢氧化钠溶液调节至中性并置于透析袋中,浸入5℃中的纯水中透析48h,每6h换一次纯水,在1℃温度,5Pa压力下干燥6h,制得牡蛎多肽,将牡蛎多肽和纯水按质量比1:20混合均匀,再加入牡蛎多肽质量0.3倍的氯化铁,在60℃下以1000r/min的转速搅拌80min后冷却至1℃过滤,并用纯水洗涤3次,制得抗疲劳功能多肽胶体;

[0106] (5)二次粉磨:将抗疲劳功能多肽胶体用胶体磨磨成浆,在-10℃温度,5Pa压力下干燥6h,再用超微粉碎机研磨至颗粒小于0.01mm,制得抗疲劳功能多肽粉体;

[0107] (6)杀菌:将抗疲劳功能多肽粉体置于高压脉冲电场中,在温度5℃下处理30s;

[0108] (7)氮气封存:先用对玻璃容器进行氮气置换,再放入杀菌后的抗疲劳功能多肽粉体并达到玻璃容器容量的70%,再次通入氮气置换玻璃容器内的气体后进行密封保存,得到抗疲劳功能多肽。

[0109] 作为优化,步骤(1)所述新鲜牡蛎为新鲜长牡蛎,单个牡蛎体重为200g。

[0110] 作为优化,步骤(2)所述离心洗涤的方法为:将粉磨后的牡蛎与丙酮按质量比1:2混合均匀,在40℃下以8000r/min的转速离心30min,去除离心上清液后重复3次。

[0111] 作为优化,步骤(3)所述胃蛋白酶的国际系统编号为EC3.4.23.1。

[0112] 作为优化,步骤(4)所述透析膜规格为2000Da,透析袋规格为400Da。

[0113] 作为优化,步骤(6)所述高压脉冲电场参数为:场强30kV/cm,脉冲频率400Hz。

[0114] 对比例4

[0115] 一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,所述抗疲劳功能多肽的制备方法主要包括以下制备步骤:

[0116] (1)粉磨脱脂:将除去壳和内脏的新鲜牡蛎在-10℃环境温度下先粉碎至颗粒小于9mm后再置于粉磨机中,在-10℃环境温度下粉磨至颗粒小于1mm,再用丙酮进行离心洗涤,在-10℃温度,5Pa压力下干燥6h,制得牡蛎粉;

[0117] (2)酶解:将牡蛎粉和纯水按质量比1:10混合均匀,再加入牡蛎粉质量0.03倍的乙酸和牡蛎粉质量0.01倍的胃蛋白酶,在10℃下以800r/min的转速搅拌36h,再在10℃下以12000r/min的转速离心30min,取酶解上清液;

[0118] (3)透析螯合:将酶解上清液过透析膜,将通过透析膜的透析液用质量分数0.1%的氢氧化钠溶液调节至中性并置于透析袋中,浸入5℃中的纯水中透析48h,每6h换一次纯水,在1℃温度,5Pa压力下干燥6h,制得牡蛎多肽,将牡蛎多肽和纯水按质量比1:20混合均匀,再加入牡蛎多肽质量0.3倍的氯化铁,在60℃下以1000r/min的转速搅拌80min后冷却至1℃过滤,并用纯水洗涤3次,制得抗疲劳功能多肽胶体;

[0119] (4)二次粉磨:将抗疲劳功能多肽胶体用胶体磨磨成浆,在-10℃温度,5Pa压力下

干燥6h,再用超微粉碎机研磨至颗粒小于0.01mm,制得抗疲劳功能多肽粉体;

[0120] (5)杀菌:将抗疲劳功能多肽粉体置于高压脉冲电场中,在温度5℃下处理30s;

[0121] (6)氮气封存:先用对玻璃容器进行氮气置换,再放入杀菌后的抗疲劳功能多肽粉体并达到玻璃容器容量的70%,再次通入氮气置换玻璃容器内的气体后进行密封保存,得到抗疲劳功能多肽。

[0122] 作为优化,步骤(1)所述新鲜牡蛎为新鲜长牡蛎,单个牡蛎体重为200g。

[0123] 作为优化,步骤(1)所述离心洗涤的方法为:将粉磨后的牡蛎与丙酮按质量比1:2混合均匀,在40℃下以8000r/min的转速离心30min,去除离心上清液后重复3次。

[0124] 作为优化,步骤(2)所述胃蛋白酶的国际系统编号为EC3.4.23.1。

[0125] 作为优化,步骤(3)所述透析膜规格为2000Da,透析袋规格为400Da。

[0126] 作为优化,步骤(5)所述高压脉冲电场参数为:场强30kV/cm,脉冲频率400Hz。

[0127] 对比例5

[0128] 一种采用新鲜牡蛎提取抗疲劳功能多肽的方法,所述抗疲劳功能多肽的制备方法主要包括以下制备步骤:

[0129] (1)高压冷冻处理:将除去壳和内脏的新鲜牡蛎用液氮冷冻,使冷冻温度达到-100℃并保持10min,再增加压力至200MPa并保持20min;

[0130] (2)粉磨脱脂:将高压冷冻处理后的新鲜牡蛎在-10℃环境温度下先粉碎至颗粒小于9mm后再置于粉磨机中,在-10℃环境温度下粉磨至颗粒小于1mm,再用丙酮进行离心洗涤,在-10℃温度,5Pa压力下干燥6h,制得牡蛎粉;

[0131] (3)二次高压冷冻处理:将牡蛎粉放置在氮氛围中,-80℃,200MPa的环境中处理60min;

[0132] (4)酶解:将二次高压冷冻处理后的牡蛎粉和纯水按质量比1:10混合均匀,再加入二次高压冷冻处理后的牡蛎粉质量0.03倍的乙酸和二次高压冷冻处理后的牡蛎粉质量0.01倍的胃蛋白酶,在10℃下以800r/min的转速搅拌36h,再在10℃下以12000r/min的转速离心30min,取酶解上清液;

[0133] (5)透析:将酶解上清液过透析膜,将通过透析膜的透析液用质量分数0.1%的氢氧化钠溶液调节至中性并置于透析袋中,浸入5℃中的纯水中透析48h,每6h换一次纯水,在1℃温度,5Pa压力下干燥6h,制得抗疲劳功能多肽胶体;

[0134] (6)二次粉磨:将抗疲劳功能多肽胶体用胶体磨磨成浆,在-10℃温度,5Pa压力下干燥6h,再用超微粉碎机研磨至颗粒小于0.01mm,制得抗疲劳功能多肽粉体;

[0135] (7)杀菌:将抗疲劳功能多肽粉体置于高压脉冲电场中,在温度5℃下处理30s;

[0136] (8)氮气封存:先用对玻璃容器进行氮气置换,再放入杀菌后的抗疲劳功能多肽粉体并达到玻璃容器容量的70%,再次通入氮气置换玻璃容器内的气体后进行密封保存,得到抗疲劳功能多肽。

[0137] 作为优化,步骤(1)所述新鲜牡蛎为新鲜长牡蛎,单个牡蛎体重为200g。

[0138] 作为优化,步骤(2)所述离心洗涤的方法为:将粉磨后的牡蛎与丙酮按质量比1:2混合均匀,在40℃下以8000r/min的转速离心30min,去除离心上清液后重复3次。

[0139] 作为优化,步骤(4)所述胃蛋白酶的国际系统编号为EC3.4.23.1。

[0140] 作为优化,步骤(5)所述透析膜规格为2000Da,透析袋规格为400Da。

[0141] 作为优化,步骤(7)所述高压脉冲电场参数为:场强30kV/cm,脉冲频率400Hz。

[0142] 效果例

[0143] 下表1给出了采用本发明实施例1至3与对比例1至3的抗疲劳功能多肽产率和抗疲劳效果的分析结果。

[0144] 表1

[0145]

	产率	游泳时长		产率	游泳时长
实施例1	15.6%	1263s	对比例2	13.6%	1228s
实施例2	15.3%	1245s	对比例3	9.7%	1082
实施例3	15.5%	1276s	对比例4	8.2%	1025
对比例1	7.5%	875s	对比例5	12.2%	1037

[0146] 从表1中实施例1,实施例2和实施例3的实验数据比较可发现,实施例1,实施例2和实施例3的产率和游泳时长基本不变,说明在本发明制备方法的工艺参数范围类改变温度,压力,反应时间等对最后生产抗疲劳功能多肽的产率和抗疲劳效果影响不大;从实施例1和对比例1的实验数据比较可发现,实施例1对比对比例1的产率和游泳时长数值增大,说明了进行了两次高压冷冻处理和螯合处理,使制得的抗疲劳功能多肽具有更高的产率和更好的抗疲劳效果;从实施例1和对比例2实验数据比较可发现,实施例1对比对比例2的产率升高,说明了在粉磨脱脂前进行高压冷冻处理,使能对牡蛎细胞造成微观结构上的缝隙,使酶更易进入内部进行附着,从而提高了产率;从实施例1对比对比例3实验数据比较可发现,实施例1对比对比例3的产率和游泳时长数值增大,说明了在粉磨脱脂后进行二次高压冷冻处理,破坏牡蛎蛋白质的二级,三级和四级结构,使牡蛎蛋白质在后续过程中易被酶解成多肽,从而提高了产率,游泳时长的数值增大可能是因为二次高压冷冻处理会使水解产生的多肽中抗疲劳效果更好的多肽水解比率上升,从而提高抗疲劳效果;从实施例1对比对比例4实验数据比较可发现,实施例1对比对比例4的产率和游泳时长数值增大,说明了在粉磨脱脂前后都进行高压冷冻处理,对牡蛎细胞造成微观结构上的缝隙,使酶更易进入内部进行附着,同时破坏牡蛎蛋白质的二级,三级和四级结构,使制得的抗疲劳功能多肽具有更高的产率和更好的抗疲劳效果;从实施例1对比对比例5实验数据比较可发现,实施例1对比对比例5的产率和游泳时长数值增大,说明了进行螯合后,使铁和多肽难以被体内微生物吸收,从而使人体可以更好的吸收营养,同时铁元素和多肽的共同作用使制得的产物具有更好的抗疲劳效果,产率数值的变化是因为铁元素的螯合增加了产物的质量。

[0147] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。不应将权利要求中的任何标记视为限制所涉及的权利要求。