



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108129552 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 07

(21) 申请号 201711399569.X

CN 104356201 A, 2015.02.18

(22) 申请日 2017.12.22

CN 104402972 A, 2015.03.11

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 104540960 A, 2015.04.22

申请公布号 CN 108129552 A

CN 105177095 A, 2015.12.23

(43) 申请公布日 2018.06.08

CN 105368901 A, 2016.03.02

CN 106107635 A, 2016.11.16

(73) 专利权人 大连深蓝肽科技研发有限公司

刘志彤等. 海参二肽基肽酶 IV 抑制肽的酶解制备及结构鉴定. 现代食品科技. 第36卷(第36期), 全文.

地址 116000 辽宁省大连市普兰店区皮口街道平岛社区

左爱华等. 海参低聚肽的高通量 HPLC MS/MS 分析鉴定和活性筛选. 食品工业科技. 第41卷(第41期), 全文.

(72) 发明人 包卫洋 王祖哲 杨大苹 马普

By P. R. DANDO.MEGRIM

(74) 专利代理机构 大连瑞博晟知识产权代理有限公司 21259

(LEPIDORHOMBUSWHIFF-IAGONIS)

专利代理师 于忠晶

POPULATIONS IN THE ENGLISH CHANNEL AND

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

APPROACHES—LACTATE DEHYDROGENASE AND

'GLYCEROL-3-PHOSPHATE DEHYDRO-GENASE

POLYMORPHISMS. J. mar. biol. Ass.

U.K..1970, 第50卷808-818.

(56) 对比文件

CN 103987724 A, 2014.08.13

CN 104356200 A, 2015.02.18

审查员 丁海

权利要求书1页 说明书4页

序列表1页 附图3页

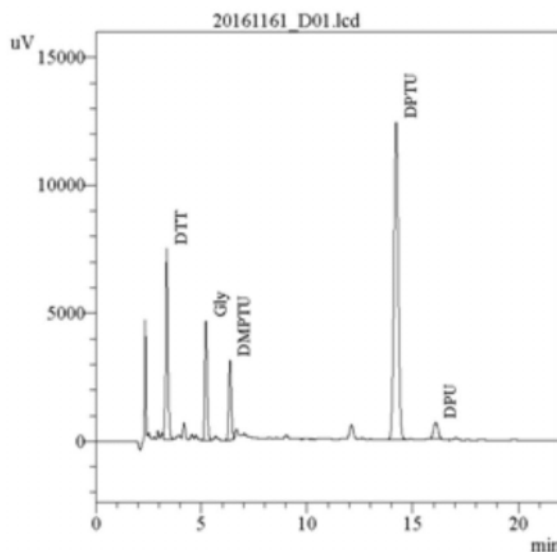
(54) 发明名称

一种海参来源的抗氧化活性肽及提取方法

(57) 摘要

本发明属于抗氧化活性肽制备及鉴定领域, 特别涉及一种海参来源的抗氧化活性肽段及提取方法. 所述肽段的氨基酸序列为NH<sub>2</sub>-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Cys, 利用复合蛋白酶制剂酶解获得, 对DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基具有良好的清除作用. 本发明方法制得的海参低聚肽分子量400-800占比57%~68%; 本发明方法制得的海参低聚肽无苦味、腥味, 可作为蛋白营养补充剂直接食用; 本发明获得肽段来源于仿刺参, 抗氧化活性强, 序列明确, 可以采用原核表达或多肽合成法等进行批量生产.

CN 108129552 B



1. 一种海参来源的抗氧化活性肽在制备具有抗氧化活性的海参肽粉中的应用,其特征  
在于,所述抗氧化活性肽的氨基酸序列为NH<sub>2</sub>-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Cys。

2. 根据权利要求1所述应用,其特征  
在于,其中所述抗氧化活性肽具有清除DPPH自由  
基、羟自由基活性。

## 一种海参来源的抗氧化活性肽及提取方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于抗氧化活性肽制备及鉴定领域,特别涉及一种海参来源的抗氧化活性肽及提取方法。

### 背景技术

[0002] 由于海洋存在许多极端环境,如高压(深海)、低温(极地、深海)、高温(海底火山口)和高盐等。为了适应这些极端的海洋生境,海洋生物蛋白质无论氨基酸的组成或序列都与陆地生物蛋白有很大的不同。种类繁多的海洋蛋白氨基酸序列中,潜在着许多具有生物活性的氨基酸序列,用特异的蛋白酶水解,就释放出有活性的肽段。这些活性的肽段生物学意义主要体现在其吸收机制优于氨基酸和具有氨基酸不可比拟的生理功能两个方面,其生理功能主要有类吗啡样活性、激素和调节激素的作用,对生物体内的酶具有调节和抑制功能,免疫调节,抗血栓,抗高血压,降胆固醇,抑制细菌、病毒,抗癌作用,抗氧化和清除自由基作用,改善元素吸收和矿物质运输,促进生长,调节食品风味、口味和硬度等。生物活性肽是世界上药物及保健品研究的热点。

[0003] 海参纲仿刺参属,又称刺参,主要分布于中国的黄渤海和俄罗斯、朝韩和日本等东北亚海域。由于刺参特殊的进化地位、独特的繁殖生活史以及夏眠、排脏与再生、自溶等生物学现象,使其具有重要的科学研究价值,同时,针对其活性肽段的研究相对较少,目前主要以蛋白酶酶解海参蛋白制备的海参混合多肽,分子量为5000Da以上,不利于人体吸收,同时也是各种功能的肽段混合在一起。若通过肽段的鉴定把海参不同功能的肽段分离,有助于开发医疗用途精准肽段产品。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种海参来源的抗氧化活性肽及提取方法,为食品、保健品、化妆品提供高活性和安全的功能性原料。

[0005] 本发明为实现上述目的所采取的技术方案为:一种海参来源的抗氧化活性肽,其特征在于,所述肽的氨基酸序列为 $\text{NH}_2\text{-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Cys}$ 。

[0006] 所述肽利用复合蛋白酶制剂酶解获得,对DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基具有良好的清除作用。

[0007] 所述复合蛋白酶的质量配比为:中性蛋白酶:木瓜蛋白酶:风味蛋白酶=(2~4):(3~5):(3~5)。

[0008] 一种海参来源的抗氧化活性肽的提取方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0009] S1、原料预处理:取新鲜仿刺参体壁粉碎、制浆,得到仿刺参浆液;

[0010] S2、向步骤S1制得的仿刺参浆液中加入所述仿刺参浆液2~5倍质量的水,升温至40~55℃后,加入2.5mol/L的NaOH溶液调节PH至8.0~9.0;加入占所述仿刺参浆液质量0.1~0.2%的复合蛋白酶,搅拌酶解3~6h后,升温至80~95℃灭酶10~25min,得到酶解液;将所述酶解液离心分离,收集液相;

- [0011] S3、将步骤S2得到的液相采用切割分子量2000~5000Da的纳滤膜分离,收集透过液;
- [0012] S4、将步骤S3收集的透过液采用电渗析脱出离子;
- [0013] S5、将步骤S4制得的精制液通过膜浓缩设备浓缩至可溶性固形物,含量占浓缩液总质量20~40%;
- [0014] S6、将步骤S5制得浓缩液采用蛋白N端测序法分析肽氨基酸排列顺序;
- [0015] S7、将步骤S5制得浓缩液进行喷雾干燥,得到海参肽粉进行自由基清除实验。
- [0016] 所述步骤S1具体为:取新鲜仿刺参体壁,利用绞肉机将所述仿刺参体壁绞碎10~20min,得到仿刺参浆液。
- [0017] 所述步骤S1中复合蛋白酶的质量配比为:中性蛋白酶:木瓜蛋白酶:风味蛋白酶=(2~4):(3~5):(3~5)。
- [0018] 所述步骤S2中离心分离的条件为:采用摇摆型管式分离机,转速为10000~16000r/min。
- [0019] 所述步骤S4中电渗析的操作条件为:电压10~100V,进分离液流速1.0~1.55吨/小时,浓水流速1.0~1.60吨/小时,电极冷却水流速0.5~1.0吨/小时。
- [0020] 所述步骤S5中膜浓缩的操作条件为:采用切割分子量为10~100Da的纳滤级、中空纤维膜,操作压力为1.5~1.8Mpa。
- [0021] 所述步骤S7中喷雾干燥的条件为:进风温度140℃,出风温度85℃。
- [0022] 本发明以海参体壁为原料,经过特异性的复合蛋白酶酶解,释放出活性肽。通过测序的方法得到肽的氨基酸组成,鉴定抗氧化活性,相比于现有技术的有益效果在于:
- [0023] 1、本发明方法制得的海参低聚肽分子量400-800占比57%~68%;
- [0024] 2、本发明方法制得的海参低聚肽无苦味、腥味,可作为蛋白营养补充剂直接食用;
- [0025] 3、本发明获得肽来源于仿刺参,抗氧化活性强,序列明确,可以采用原核表达或多肽合成法等进行批量生产。

## 附图说明

- [0026] 图1为本发明海参来源的抗氧化活性肽的蛋白N段测序峰图一(第一位点)。
- [0027] 图2为本发明海参来源的抗氧化活性肽的蛋白N段测序峰图二(第二位点)。
- [0028] 图3为本发明海参来源的抗氧化活性肽的蛋白N段测序峰图三(第三位点)。
- [0029] 图4为本发明海参来源的抗氧化活性肽的蛋白N段测序峰图四(第四位点)。
- [0030] 图5为本发明海参来源的抗氧化活性肽的蛋白N段测序峰图五(第五位点)。
- [0031] 图6为本发明海参来源的抗氧化活性肽的蛋白N段测序峰图六(第六位点)。

## 实施方式

- [0032] 下面结合附图与实施例对本发明进一步说明,但本发明不局限于具体实施例。
- [0033] 实施例1
- [0034] 一种海参来源的抗氧化活性肽,所述肽的氨基酸序列为NH<sub>2</sub>-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Cys。所述肽对DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基具有良好的清除作用。
- [0035] 实施例2

[0036] 一种实施例1中所述海参来源的抗氧化活性肽的提取方法,具体包括以下步骤:

[0037] S1、原料预处理:将仿刺参体壁1000kg用绞肉机粉碎15min,绞碎后进入胶体磨磨浆得浆液;

[0038] S2、将浆液导入5m<sup>3</sup>酶解罐,所述5m<sup>3</sup>酶解罐为夹层式加热反应釜,加入3倍牡蛎浆液质量的纯水,调整体系温度50℃,用2.5mol/L的NaOH溶液调PH至8.6,加入所述仿刺参浆液总质量0.12%的复合蛋白酶;复合蛋白酶的质量配比为:中性蛋白酶:木瓜蛋白酶:风味蛋白酶=3:4:3;搅拌酶解4h,升温80℃灭酶20min,采用管式离心机16000rpm离心进行固液分离,收集离心清液,导入5m<sup>3</sup>清液储罐;

[0039] S3、5m<sup>3</sup>分离液储罐与膜分离装置相连,将所得清液经切割分子量5000Da纳滤膜分离装置分离得透过液;

[0040] S4、膜分离装置与电渗析装置相连,将所得透过液经电渗析去除无机离子,电渗析的电压为70V,进分离液流速1.5吨/小时,浓水流速1.52吨/小时,电极冷却水流速0.8吨/小时;

[0041] S5、所述电渗析装置与膜浓缩设备相连,将精制液经切割分子量50Da纳滤膜浓缩浓缩,使用1.6Mpa压力,浓缩至可溶性固含量占浓缩液质量30%,导入浓缩储罐;

[0042] S6、将步骤S5中所制得料液进行蛋白N端测序,结果见图1-图6;

[0043] S7、将步骤S5制得浓缩液进行喷雾干燥,得到海参肽粉,进行自由基清除实验。步骤S5中所述浓缩储罐,设置有出料口,将浓缩料液从出料口取出后导入喷雾干燥塔进行喷雾干燥,喷雾干燥时进风温度维持在140℃,出风温度维持在85℃,得海参肽粉;

[0044] 所得海参肽粉进行清除自由基的抗氧化实验结果表明:

[0045] NH<sub>2</sub>-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Cys对DPPH自由基(EC50 0.98mg/mL)、羟基自由基(EC50 0.08mg/mL)和超氧阴离子自由基(EC50 0.15mg/mL)具有良好的清除作用。适用于开发功能性食品、保健品、以及防止皮肤衰老的化妆品等。

[0046] 实施例3

[0047] 本实施例中所述海参来源的抗氧化活性肽的提取方法与实施例2中相同,不同的技术参数为:

[0048] 1) 步骤S1中将仿刺参体壁用绞肉机粉碎10min;

[0049] 2) 步骤S2中加入2倍牡蛎浆液质量的纯水,调整体系温度40℃,用2.5mol/L的NaOH溶液调PH至8.0,加入所述仿刺参浆液总质量0.1%的复合蛋白酶;复合蛋白酶的质量配比为:中性蛋白酶:木瓜蛋白酶:风味蛋白酶=2:3:4;搅拌酶解3h,升温82℃灭酶10min,采用管式离心机10000rpm离心进行固液分离;

[0050] 3) 步骤S3中将所得清液经切割分子量2000Da纳滤膜分离装置分离得透过液;

[0051] 4) 步骤S4中电渗析的电压为10V,进分离液流速1.0吨/小时,浓水流速1.0吨/小时,电极冷却水流速0.5吨/小时;

[0052] 5) 步骤S5中将精制液经切割分子量10Da纳滤膜浓缩浓缩,使用1.5Mpa压力,浓缩至可溶性固含量占浓缩液质量20%。

[0053] 实施例4

[0054] 本实施例中所述海参来源的抗氧化活性肽的提取方法与实施例2中相同,不同的技术参数为:

- [0055] 1) 步骤S1中将仿刺参体壁用绞肉机粉碎20min;
- [0056] 2) 步骤S2中加入5倍牡蛎浆液质量的纯水,调整体系温度55℃,用2.5mol/L的NaOH溶液调PH至9.0,加入所述仿刺参浆液总质量0.2%的复合蛋白酶;复合蛋白酶的质量配比为:中性蛋白酶:木瓜蛋白酶:风味蛋白酶=3:4:3;搅拌酶解6h,升温95℃灭酶25min,采用管式离心机13000rpm离心进行固液分离;
- [0057] 3) 步骤S3中将所得清液经切割分子量3500Da纳滤膜分离装置分离得透过液;
- [0058] 4) 步骤S4中电渗析的电压为100V,进分离液流速1.55吨/小时,浓水流速1.60吨/小时,电极冷却水流速1.0吨/小时;
- [0059] 5) 步骤S5中将精制液经切割分子量100Da纳滤膜浓缩浓缩,使用1.8Mpa压力,浓缩至可溶性固含量占浓缩液质量40%。
- [0060] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。
- [0061] SEQUENCE LISTING
- [0062] <110> 大连深蓝肽科技研发有限公司
- [0063] <120> 一种海参来源的抗氧化活性肽及提取方法
- [0064] <130> 0001S
- [0065] <160> 1
- [0066] <170> PatentIn version 3.5
- [0067] <210> 1
- [0068] <211> 6
- [0069] <212> PRT
- [0070] <213> *Apostichopus japonicus*
- [0071] <400> 1
- [0072] Gly Pro Ala Gly Pro Cys
- [0073] 1 5

- [0001] SEQUENCE LISTING  
[0002] <110> 大连深蓝肽科技研发有限公司  
[0003] <120> 一种海参来源的抗氧化活性肽段及提取方法  
[0004] <130> 0001S  
[0005] <160> 1  
[0006] <170> PatentIn version 3.5  
[0007] <210> 1  
[0008] <211> 6  
[0009] <212> PRT  
[0010] <213> *Apostichopus japonicus*  
[0011] <400> 1  
[0012] Gly Pro Ala Gly Pro Cys  
[0013] 1 5

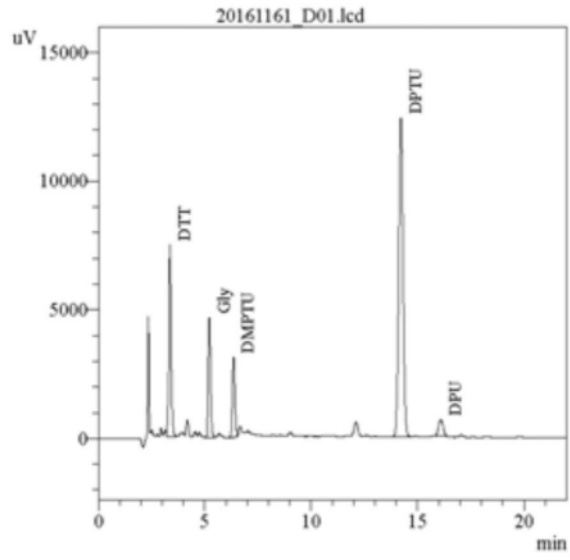


图1

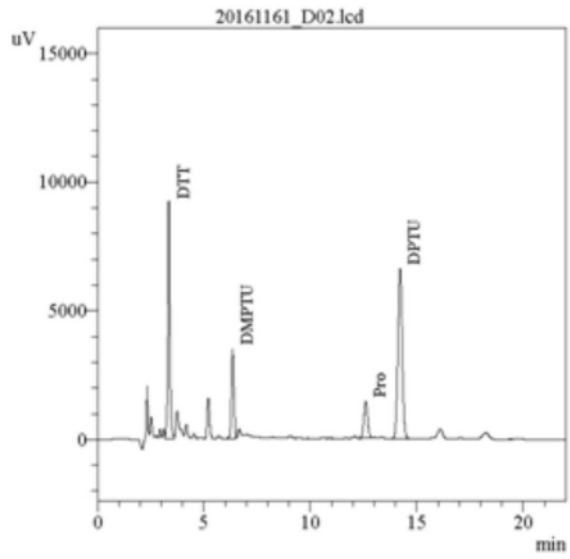


图2

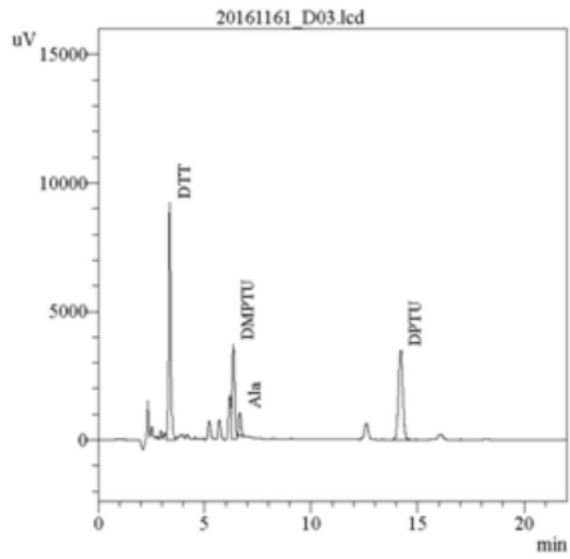


图3

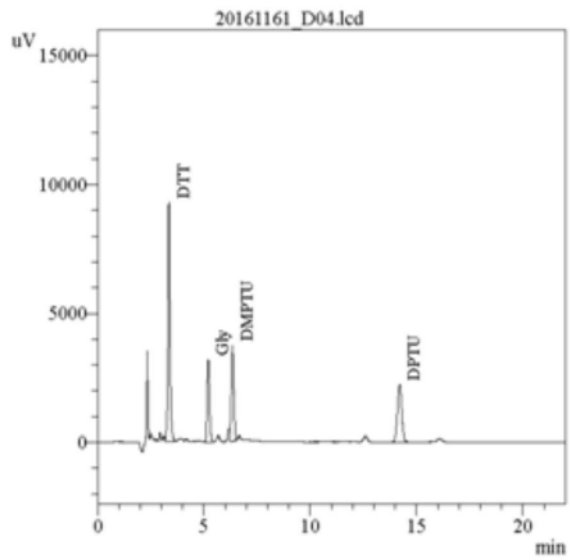


图4

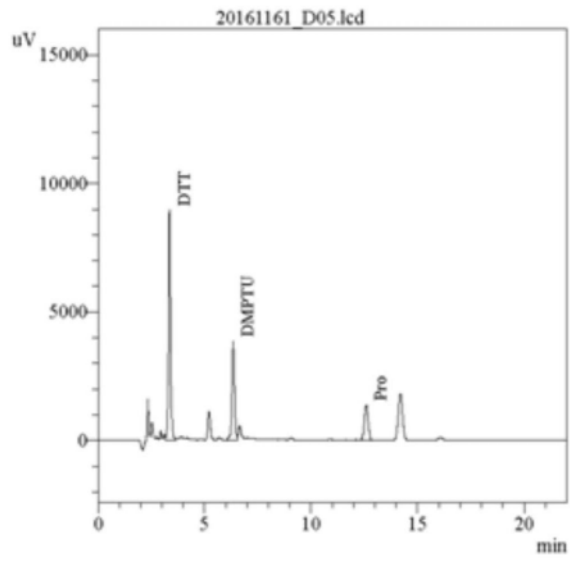


图5

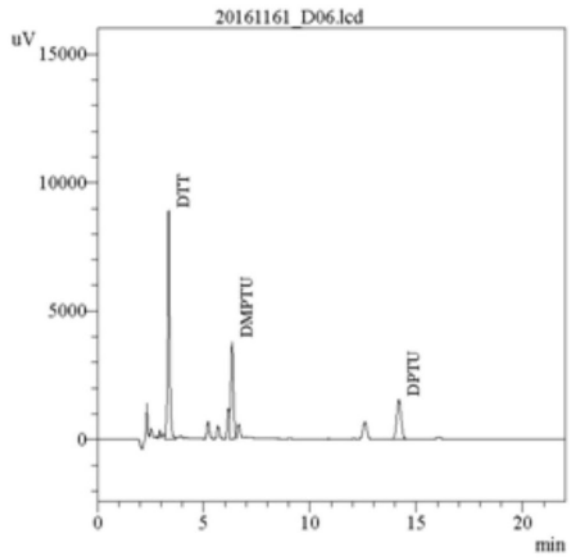


图6