



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101568552 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 26

(21) 申请号 200780048059. 6

(22) 申请日 2007. 11. 15

(30) 优先权数据

309032/2006 2006. 11. 15 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 06. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2007/072196 2007. 11. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/059927 JA 2008. 05. 22

(73) 专利权人 株式会社明治

地址 日本东京都

(72) 发明人 松本均 大原浩树 中岛孝谦

杉原富人 高崎一

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int. Cl.

C07K 14/78(2006. 01)

A23L 1/30(2006. 01)

A23L 1/305(2006. 01)

A23L 2/52(2006. 01)

A61K 35/60(2006. 01)

A61K 38/00(2006. 01)

A61K 38/17(2006. 01)

A61P 3/02(2006. 01)

A61P 17/16(2006. 01)

A61P 19/08(2006. 01)

A61P 19/10(2006. 01)

A61P 43/00(2006. 01)

C07K 2/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1683550 A, 2005. 10. 19, 全文.

CN 1814782 A, 2006. 08. 09, 权利要求 1.

审查员 王翔宇

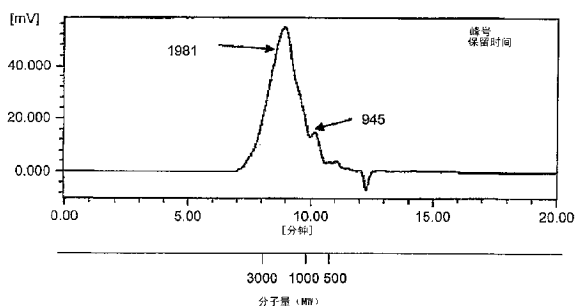
权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54) 发明名称

胶原肽组合物以及含有其的饮食品

(57) 摘要

本发明的课题在于发现一种胶原肽,其由比现有胶原肽的血中移行性更高的寡肽构成,并提供配合了这种胶原肽的饮食品。本发明提供了一种用蛋白酶分解胶原而获得的胶原肽组合物,其特征在于,其包含 70 ~ 100 重量%的分子量在 500 以上、3000 以下的肽,不到 10 重量%的分子量不到 500 的肽和不到 20 重量%的分子量超过 3000 的肽,而且该组合物中的肽的 N 末端氨基酸中甘氨酸所占比例在 33 摩尔%以上、65 摩尔%以下。



1. 一种胶原肽组合物,其为通过选自如下(1)~(5)所组成的组中的任一种蛋白酶分解胶原或明胶而获得的胶原肽组合物,

(1)枯草杆菌蛋白酶、(2)胰凝乳蛋白酶、(3)奇异果蛋白酶、(4)枯草杆菌蛋白酶和菠萝蛋白酶的混合物以及(5)胰凝乳蛋白酶和菠萝蛋白酶的混合物,

其特征在于,包含70~100重量%的分子量在500以上、3000以下的肽,不到10重量%的分子量不到500的肽和不到20重量%的分子量超过3000的肽,而且该组合物中的肽的N末端氨基酸中甘氨酸所占比例在33摩尔%以上、65摩尔%以下。

2. 根据权利要求1所述的胶原肽组合物,其中,所述胶原或明胶来源于鱼类。

3. 根据权利要求1所述的胶原肽组合物,其中,所述(4)枯草杆菌蛋白酶和菠萝蛋白酶的混合物为:相对于每1kg明胶为5.5g枯草杆菌蛋白酶与3.0g菠萝蛋白酶的混合物,将所述(4)枯草杆菌蛋白酶和菠萝蛋白酶的混合物与胶原或明胶在pH8.0、40℃下酶反应6小时。

4. 根据权利要求1所述的胶原肽组合物,其中,所述(5)胰凝乳蛋白酶和菠萝蛋白酶的混合物为:相对于每1kg明胶为5.5g胰凝乳蛋白酶和3.0g菠萝蛋白酶的混合物,将所述(5)胰凝乳蛋白酶和菠萝蛋白酶的混合物与胶原或明胶在pH8.0、40℃下酶反应6小时。

5. 含有权利要求1所述的胶原肽组合物的饮食品。

6. 一种胶原肽组合物的制造方法,该方法包括:通过选自如下(1)~(5)所组成的组中的蛋白酶处理胶原或明胶之后,从酶处理液中纯化胶原肽,

(1)枯草杆菌蛋白酶、(2)胰凝乳蛋白酶、(3)奇异果蛋白酶、(4)枯草杆菌蛋白酶和菠萝蛋白酶的混合物以及(5)胰凝乳蛋白酶和菠萝蛋白酶的混合物,

其中,该胶原肽组合物包含70~100重量%的分子量在500以上、3000以下的肽,不到10重量%的分子量不到500的肽和不到20重量%的分子量超过3000的肽,而且该组合物中的肽的N末端氨基酸中甘氨酸所占比例在33摩尔%以上、65摩尔%以下。

7. 一种权利要求1所述的胶原肽组合物在制造饮食品中的应用。

胶原肽组合物以及含有其的饮食品

技术领域

[0001] 本发明涉及胶原肽组合物,更详细而言,涉及由血中移行性优异的寡肽构成的胶原肽组合物,以及含有该胶原肽组合物的饮食品。

背景技术

[0002] 胶原是构成真皮、韧带、腱、骨、软骨等的蛋白质之一,其是多细胞动物胞外基质(extracellular matrix)的主要成分。胶原存在于皮肤、血管、内脏、骨组织等各处,占构成身体的蛋白质的约 30%。皮肤中真皮的 70% 由胶原构成,包裹各种肌肉的筋膜(fascia)也由胶原构成。

[0003] 胶原蛋白聚集了 3 条具有 Gly-X-Y(X、Y 为 Gly 以外的氨基酸)这样的重复结构的分子量约为 10 万的多肽链(α 链),形成螺旋结构。胶原蛋白由于具有羟脯氨酸和羟赖氨酸等胶原特有的氨基酸,另一方面,其没有必需氨基酸色氨酸,因此氨基酸记分为 0,因此一直以来并没有作为营养素而受到人们关注。

[0004] 但是,近年来,已经发现胶原的多种生理作用和药理作用,胶原、胶原经加热变性而形成的明胶、以及它们的水解产物即胶原肽,被广泛用作用于化妆品和食品的原材料和用于药品的生物功能性材料。迄今为止,已经阐明的胶原的生理作用和药理作用有:与骨质疏松症的预防和改善相关的成骨细胞增殖促进作用、骨强化作用(参照专利文献 1、2),使生物体组织功能随年龄增长而降低的情况得以改善的生物体组织的新陈代谢促进作用(参照专利文献 3、4),皮肤代谢促进作用、皮肤活化作用(参照专利文献 4、5)等。但是,在这些现有文献中,对于有效成分均只记载了胶原或明胶、胶原或明胶的分解物,具体具有多少分子量、具有怎样的氨基酸序列并不清楚。而且,为了充分发挥上述生理作用和药理作用,需要大量摄取胶原或明胶以及它们的分解物。

[0005] 而且,据报道,谷口等人就用胶原酶处理而获得的胶原分解物(肽混合物或肽体)以及相同比率的氨基酸混合物这两组物质分别对大鼠中皮肤胶原的合成促进效果进行比较研究,结果氨基酸混合物看不到效果,而仅胶原酶分解物有效果(非专利文献 1)。因此,根据该结果,提示胶原酶分解物的生理作用和药理作用并非以氨基酸形式吸收到体内再构成蛋白质而发挥,而是通过移行到血中的肽体而发挥作用。但是,在该报告中,并未阐明具有怎样的氨基酸序列的肽体是有效的。

[0006] 另一方面,在专利文献 6 中公开了作为通过胶原酶获得的胶原的分解物的、含有氨基酸序列为 Gly-X-Y 的三肽的生物体胶原合成促进剂。但是,胶原促进活性试验的试样不是经口而是用胃管(gastric tube)给药,没有对经口摄取的肽体的血中移行性进行任何研究。而且,用于制备该三肽的酶即胶原酶并没有记载于厚生劳动省的食品添加物表中,其安全性未确认,因此实际上该肽难以在食品中使用。

[0007] 而且,专利文献 7 中,与上述公报一样,公开了含有以 Gly-X-Y 表示的各种三肽的胶原促进活性剂,报道了上述三肽比现有的胶原、明胶和它们的水解产物以及游离的氨基酸更迅速且有效地被消化吸收。在该公报中,进行了用放射性同位素标记的三肽的体内动

态试验,但并不清楚分布于血浆中和各组织中的放射活性的主体是没有发生变化的三肽还是二肽或是游离氨基酸。而且,由于用于制备三肽的酶同样是胶原酶,因此在安全性方面,实际上难以在食品中使用。而且,构成包含于该公报所公开的胶原促进活性剂中的三肽混合物的肽都是N末端氨基酸为甘氨酸(Gly-X-Y)的肽,对于调整混合物中的三肽的N末端氨基酸中甘氨酸所占比例没有任何记载。

[0008] 而且,在专利文献8中记载了含有大量分子量为400~3000的肽的胶原肽组合物在配合到皮肤用化妆品和药品时,发挥对皮肤的优异的使用感和渗透性,但对于经口摄取时的血中移行性的评价、组合物中的肽的N末端氨基酸中甘氨酸所占比例的调整没有任何记载。

[0009] 专利文献1:日本特开平9-255588号公报

[0010] 专利文献2:日本特开平11-12192号公报

[0011] 专利文献3:日本特开平7-278012号公报

[0012] 专利文献4:日本特开平9-67262号公报

[0013] 专利文献5:日本特开2000-201649号公报

[0014] 专利文献6:日本特开2001-131084号公报

[0015] 专利文献7:日本特开2003-137807号公报

[0016] 专利文献8:日本特开2006-151847号公报

[0017] 非专利文献1:日本兽医学会学术集会讲演要旨集, Vol. 132nd, Page 126, PS-5014(2001. 09. 07)

发明内容

[0018] 发明要解决的问题

[0019] 如上所述,目前为了在体内充分发挥胶原肽的生理作用和药理作用,需要摄取5g~10g这样大量的胶原肽。但是,在常规餐食外再加上单独长期大量摄取特定蛋白质是很困难的,而且营养学上也不好。而且为了通过经口摄取胶原肽后在体内发挥生理作用和药理作用,不是以氨基酸形式而是以寡肽形式移行到血中十分重要。

[0020] 因此,本发明的课题在于发现由比以往的胶原肽的血中移行性更高的寡肽构成的胶原肽,并提供配合这种胶原肽的饮食品。

[0021] 用于解决问题的手段

[0022] 本发明人为了解决上述课题,反复进行了积极的研究,结果发现具有特定分子量分布且N末端氨基酸中甘氨酸所占比例达到特定范围的胶原肽组合物经口摄取时血中移行性优异,从而完成了本发明。

[0023] 也就是说,本发明包括以下发明。

[0024] (1) 一种胶原肽组合物,其通过蛋白酶分解胶原或明胶而获得,其特征在于,包含70~100重量%的分子量在500以上、3000以下的肽,不到10重量%的分子量不到500的肽,不到20重量%的分子量超过3000的肽,而且该组合物中的肽的N末端氨基酸中甘氨酸所占比例在33摩尔%以上、65摩尔%以下。

[0025] (2) 根据(1)中记载的胶原肽组合物,其中,蛋白酶是丝氨酸蛋白酶或半胱氨酸蛋白酶。

[0026] (3) 根据 (1) 或 (2) 中记载的胶原肽组合物, 其中, 所述胶原或明胶来源于鱼类。

[0027] (4) 含有 (1) ~ (3) 任一项中记载的胶原肽组合物的饮食品。

[0028] 以下, 对本发明进行详细的说明。本申请以 2006 年 11 月 15 日提出申请的日本专利申请 2006-309032 号作为优先权, 并包含该专利申请的说明书中所记载的内容。

[0029] 发明效果

[0030] 本发明提供了由比以往的胶原肽的血中移行性更高的寡肽构成的胶原肽组合物。因此, 在饮食品中配合本发明的胶原肽组合物, 并将其经口摄取, 由此可以以比现有产品更少的量有效发挥其生理作用和药理作用。

附图说明

[0031] 图 1 表示本发明的胶原肽组合物的分子量分布。

具体实施方式

[0032] 以下, 就本发明进行详细说明。

[0033] 1. 胶原肽组合物

[0034] 本发明的胶原肽组合物的特征在于具有特定的分子量分布, 而且该组合物中肽的 N 端氨基酸中甘氨酸所占比例为特定范围。

[0035] 上述肽的分子量分布可以通过常规方法测定, 例如, 可以用采用凝胶过滤柱的 HPLC 法 (High Performance Liquid Chromatography, 高效液相色谱)。分子量分布呈以分子量约 2000 为中心的山形, 优选分子量在 500 以上、3000 以下的肽为 70 ~ 100 重量%, 分子量超过 3000 的肽不到 20 重量%, 分子量不到 500 的肽不到 10% 重量。如果分子量比 3000 大, 消化吸收就会变差, 因此不优选。另一方面, 从消化吸收的容易程度考虑, 一般而言理想的是低分子化, 但如果分子量比 500 小的过多, 则在消化阶段分解成氨基酸, 以寡肽形式向血中的移行性反而变差, 因此并不优选。

[0036] 而且, 胶原肽组合物中的肽的 N 末端氨基酸中甘氨酸所占比例优选在 33 摩尔%以上、65 摩尔%以下, 更优选 35 摩尔%以上、65 摩尔%以下。其中, 所谓“N 末端氨基酸中甘氨酸所占比例”是指: 分析胶原肽组合物中的各肽的 N 末端起第一位残基的氨基酸, 以摩尔百分比表示甘氨酸在检测到的 N 末端氨基酸整体中所占的比例。N 末端氨基酸的分析可以用将埃德曼 (Edman) 法自动化的氨基酸序列分析装置来进行。

[0037] 本发明的胶原肽组合物的特征还在于以寡肽形式的血中移行性高。这其中, 作为“寡肽”, 除了脯氨酸-羟脯氨酸、异亮氨酸-羟脯氨酸、亮氨酸-羟脯氨酸、苯丙氨酸-羟脯氨酸等二聚体之外, 还包括丙氨酸-羟脯氨酸-甘氨酸、丝氨酸-羟脯氨酸-甘氨酸等三聚体。

[0038] 本发明的胶原肽组合物, 普通成人经口摄取 25g, 1 小时 ~ 2 小时后释放到血中的肽型羟脯氨酸量为约 70 ~ 170 nmol/ml。

[0039] 本发明中使用的“胶原肽组合物”(以下, 本说明书中有时也简单写成“胶原肽”)为通过将胶原或明胶水解而获得的肽类(混合物)。

[0040] 本发明中使用的“胶原肽组合物”的原料即胶原或明胶可以是牛、猪等哺乳动物来源或者是鲨鱼等鱼类来源的任一种, 并没有限定, 为了配合到饮食品中, 优选胶原气味较弱

的鱼类来源的胶原。特别优选的原料是鱼鳞。作为鱼鳞,只要是含有胶原组织的鱼鳞,则鱼种类和鳞的部位等没有特别限定。例如,作为鱼种类,可以例举泉鲷(罗非鱼)、尼罗河鲈鱼、鲤鱼、草鱼、千年笛鲷、金线鱼、日本鹦鲤、沙丁鱼、笛鲷、狗母鱼、草鱼、鳕鱼、青鱼、白鲢、黑鲢等。

[0041] 胶原可以从前述哺乳动物的骨、皮部分和鱼类的骨、皮、鳞部分等中获得,可以对骨等各种材料进行脱脂处理、提取处理等以往公知的处理。在使用鱼鳞时,为了去除鱼鳞上附着的污垢和杂质,优选事先通过进行数次水洗等清洗工序除去污垢和杂质,通过进行脱脂处理除去油脂成分,通过脱钙处理除去磷和钙等无机物。

[0042] 而且,以胶原作为原料时,从容易控制 N 末端氨基酸中甘氨酸所占比例这一点出发,优选一次明胶化。明胶是对胶原进行热变性而增溶化的物质。明胶化在用酸或碱对胶原原料进行前处理后,通过加热提取来进行。前处理可以根据胶原原料的种类进行酸处理或碱处理中的任意一种,酸处理可通过将胶原原料浸入盐酸或硫酸等无机酸中 5 天~20 天来进行,碱处理通过例如将胶原原料浸入含有消石灰(氢氧化钙)的石灰液等中 2~3 个月来进行。而且,通常,在对完成了前处理的原料通过水洗除去过量的酸和碱之后,用 50~60℃ 的温水进行第 1 次提取,然后以比第 1 次提取更高的温度进行第 2 次提取。

[0043] 2. 胶原肽组合物的制造

[0044] 本发明中使用的“胶原肽组合物”的制造按照例如以下方式进行。对胶原或通过上述处理由胶原获得的明胶进行蛋白酶处理,使胶原分子分解到肽阶段。为了使胶原肽组合物的分子量分布和 N 末端氨基酸中甘氨酸所占比例都处于上述设定范围内,作为蛋白酶,优选使用丝氨酸蛋白酶或半胱氨酸蛋白酶。胶原酶由于使 N 末端氨基酸的大部分(95%以上)形成甘氨酸,因此并不优选(参照酒井等人 *Fragrance Journal*, 2006 年 3 月号,第 54~60 页)。作为丝氨酸蛋白酶,可以例举枯草杆菌蛋白酶、嗜热蛋白酶(Thermitase)、蛋白酶 K、抗生肽酶(lantibioticpeptidase)、克新(kexin)、黄瓜素(cucumisin)、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、凝血酶、克新(kexin, ケキシ ン)、弗林蛋白酶(Furin)、Xa 因子、弹性蛋白酶等,作为半胱氨酸蛋白酶,可以例举奇异果蛋白酶(Actinidain)、菠萝蛋白酶等,可以使用这些酶中的任意一种,也可以将多种酶组合使用。

[0045] 酶处理通过例如如下方式进行:相对于 100 重量份的胶原或明胶使用 0.02~5 重量份的酶,在 30~70℃ 使之反应 0.5~24 小时。前述处理温度、处理时间完全是例示,为了获得具有目的分子量分布和 N 末端氨基酸组成的胶原肽组合物,可适当调整处理温度和时间以使得酶的功能充分发挥,而且不会使胶原分解过度进行。

[0046] 上述酶处理后,于 70~100℃ 进行加热处理使酶失活。但高温处理一旦过度则可能使风味变差,因此并不优选。

[0047] 在上述酶处理结束的阶段,胶原肽组合物呈溶解于或分散于酶处理液中的状态。为了从酶溶液中纯化胶原肽组合物,可以按通常采用的各种纯化手段来进行。作为纯化手段,没有特别限定,例如,通过添加活性炭,可以非常简便地进行色调、风味的改良和杂质去除。而且,通过实施过滤和离心分离等以往公知的固液分离处理,可以除去杂质。实施了前述处理的胶原肽溶液,可以通过喷雾干燥和滚筒干燥等方法进行干燥,从而粉末化。

[0048] 3. 含胶原肽组合物的饮食品

[0049] 上述胶原组合物以寡肽的形式的血中移行性良好,因此可作为日常摄取的饮食品

来提供。胶原肽组合物在饮食品中的形态包括胶原肽组合物作为饮食品本身的情况、以及作为制造饮食品时的原料或中间制品的情况。

[0050] 本发明中,所谓饮食品可以采用以下含义:包括健康食品、功能性食品、特定保健用食品、患者用食品。进而,在以人以外的哺乳动物作为对象使用本发明的饮食品时,可以在包括饲料在内的含义下使用。

[0051] 配合上述胶原肽组合物的饮食品的形态可以是固体状,也可以是液状。作为饮食品的种类,具体可以例举清凉饮料、碳酸饮料、营养饮料、果汁饮料、乳饮料等饮料(包括这些饮料的浓缩原液和调制用粉末);冰淇淋、冰冻果子露(sherbet)、刨冰等冷饮;荞麦面条、乌冬面、粉丝、饺子皮、烧麦皮、中国面、方便面等面类;饴糖、口香糖(chewing gum)、糖果、橡皮糖(Gummy candy)、口香糖(gum)、焦糖、巧克力、片状糖果、休闲点心、饼干等烤制点心,果冻、果酱、奶油等点心类;鱼糕、汉堡、火腿、香肠等水产/畜产加工食品;加工奶、发酵奶、酸奶、黄油、奶酪等乳制品;色拉油、天麸罗油、人造黄油、蛋黄酱、起酥油、鲜奶油、调味汁(dressing)等油脂和油脂加工食品;沙司、佐料汁等调味料;汤、炖菜、咖喱、面包、果酱、色拉、家常菜、咸菜等,但不限于此。

[0052] 本发明的饮食品中还可以配合上述胶原肽组合物之外的其它成分。例如,可以组合比肽分子量大的水溶性胶原和明胶等。通过组合多种胶原成分,期待可以发挥只用上述胶原肽组合物无法获得的功能和特性。而且,尤其是还可以添加含透明质酸的鸡冠提取物,牛、猪或人的胎盘提取物,牛或猪的弹性蛋白及其水解产物(酸、碱、酶等)或它们的水溶性弹性蛋白衍生物,角蛋白及其分解物或它们的衍生物,丝蛋白及其分解物或它们的衍生物,猪或牛血细胞蛋白分解物(珠蛋白肽),牛或猪血红蛋白分解物(氯高铁血红素、高铁血红素、血红素、正高铁血红素、血红素铁(hemo iron)等),牛奶、酪蛋白及其分解物或它们的衍生物,脱脂奶粉及其分解物或它们的衍生物,乳铁蛋白及其分解物,鸡蛋成分,鱼肉分解物,核酸相关物质(核糖核酸、脱氧核糖核酸)等。

[0053] 本发明的饮食品还可以根据其种类适当配合通常使用的添加剂。作为添加剂,可以例举砂糖、果糖、异构化液状糖、葡萄糖、阿斯巴甜(Aspartame)、甜菊糖等甜味剂,柠檬酸、苹果酸、酒石酸等酸味剂,糊精、淀粉等赋形剂,结合剂,稀释剂,香料,缓冲剂,增稠剂,凝胶化剂,着色剂,稳定剂,乳化剂,分散剂,悬浮剂,防腐剂等。

[0054] 本发明的饮食品中胶原肽组合物的配合量只要是能够发挥其生理作用和药理作用的量即可,但考虑对象饮食品的一般的摄取量,通常成人每日的摄取量可以为100mg~10000mg,优选1000~6000mg。例如,在为固体状食品时,优选在10~50重量%,在为饮料等液状食品时,优选为1~10重量%。

[0055] 具体的代表性饮品食品的配合例如下所示,但并不限于此。果汁饮料:胶原肽组合物0.5~30重量份,果汁1~50重量份,异构化液状糖5~20重量份,酸味剂(柠檬酸等)0.01~1.0重量份,香料0.1~1.0重量份,水30~95重量份。

[0056] 果冻/果冻饮料:胶原肽组合物0.5~20重量份,果汁1~40重量份,细砂糖5~20重量份,酸味剂(柠檬酸等)0.01~1.0重量份,凝胶化剂(明胶等)0.5~10.0重量份,香料0.1~1.0重量份,水15~95重量份。

[0057] 粉末食品:胶原肽组合物0.5~80重量份,麦芽糖糊精5~20重量份,增稠剂(明胶等)0.1~5.0重量份,乳化剂(糖酯等)0.1~5.0重量份,甜味剂(阿斯巴甜等)0.01~

1 重量份。

[0058] 片剂 (tablet) 形态食品:配合以下物质并将所得粉末压成片:胶原肽组合物 0.5 ~ 80 重量份,麦芽糖糊精 5 ~ 20 重量份,增稠剂(明胶等)0.1 ~ 5.0 重量份,乳化剂(糖酯等)0.1 ~ 5.0 重量份,甜味剂(阿斯巴甜等)0.01 ~ 1 重量份。

[0059] 通过经口摄取本发明的饮食品,可以发挥例如关节疾病(变形性关节炎、慢性关节炎风湿病)的治疗,骨质疏松症的减轻,动脉硬化和高血压的防止,促进伤口的治愈,皮肤疾病(湿疹,粗糙,特应性皮炎,色素沉积)的治愈,提高皮肤的保湿性,皮肤老化(皱纹、斑点、暗淡、松弛、角质化等)的改善,毛发老化(白发、脱发、少发等)的防止,抗溃疡效果等多种生理效果、药理效果。

[0060] 实施例

[0061] 以下,通过实施例对本发明进行更具体的说明。但是,本发明不限于这些实施例。

[0062] (实施例 1) 本发明的胶原肽组合物的制备

[0063] 将经酸处理的鱼鳞明胶(Nitta Gelatin Inc. 制)1.0kg 溶解于 2.0kg 的 75℃ 的温水中。在获得的明胶溶液中添加作为蛋白酶的 5.5g 的枯草杆菌蛋白酶(和光纯药公司制),将溶液的 pH 调整到 8,于 50℃ 进行 4 小时酶反应。反应结束后,将溶液加热到 90℃ 以上使酶失活,添加 20g 微粉活性炭,进行精密过滤后,进行喷雾干燥,获得了粉末状的胶原肽组合物。

[0064] 获得的胶原肽组合物的平均分子量,在下述条件下通过进行凝胶过滤高效液相色谱(GF-HPLC)来测定,通过 MultistationGPC-8020 软件 Ver4.0(TOSOH 制)进行数据处理。使用根据分子量为 307 ~ 17800 的分子量标记的保留时间而另外制成的校正曲线,根据该胶原肽组合物的平均保留时间计算出平均分子量。

[0065] (分析条件)

[0066] 柱:TSK-GEL 2500PW_{XL}(300×7.8mm)

[0067] 洗脱液:45%乙腈(含 0.1%三氟乙酸)

[0068] 流速:0.8ml/min

[0069] 检测波长:214nm

[0070] 本发明的胶原肽组合物的分子量分布示于图 1。该胶原肽组合物的平均分子量为 2000,大部分为分子量 500 以上、3000 以下的肽类。其比例具体是:分子量 500 以上、3000 以下的肽为 88.1 重量%,分子量超过 3000 的肽为 10.3 重量%,分子量不到 500 的肽为 1.6 重量%。

[0071] (实施例 2) 向血中的移行性比较试验(吸收性试验(1))

[0072] 将实施例 1 中制备的本发明的胶原肽组合物(平均分子量 2000)的血中移行性与市售的胶原肽组合物的血中移行性进行比较。作为市售的胶原肽组合物,使用鱼皮胶原肽 A(Nippi, inc 制,商品名 NippiPeptide FCP,平均分子量 5000)、鱼皮胶原肽 B(MARUHA 制,商品名 Fish Collagen WP,平均分子量 3000)、鱼鳞胶原肽 C(RABJ 制,商品名 Marine Collagen MS5)、猪皮胶原肽 D(Nitta Gelatin Inc. 制,商品名 Super Collagen PeptideSCP5000,平均分子量 5000)。

[0073] 试验基于岩井等人的报告(Agric.Food Chem.,2005, Vol.53, No.16, p6531 ~ 6536)进行。对 5 名人类志愿者设置 6 天以上的清洗期,对每一名受试者,以所有上述胶原

肽组合物作为待测试样并分别进行单次摄取,形成交叉试验。受试者在 12 小时的断食后,进行摄取前采血,使受试者摄取各待测试样。待测试样的摄取量为 25g/65kg 体重。摄取 0、5、1、2、4、7 小时后分别采血 5mL。采血后的采血管倒转数次混合,于冰中放置约 15 分钟后,通过离心分离 (3000rpm, 15 分钟, 4℃) 获得血浆。在 300 μ L 血浆中加入 900 μ L 乙醇,用旋涡混合器搅拌 15 秒,离心分离 (12000rpm, 10 分钟, 4℃),获得上清。各受试者的各采血时间的血浆于 -80℃ 冷冻保存直至分析。

[0074] 分别测定总羟脯氨酸 (羟脯氨酸) 量和游离型羟脯氨酸量,求出其差作为血浆中的肽型羟脯氨酸量。总羟脯氨酸 (羟脯氨酸) 按照佐藤等人 (Sato K. 等人, J. Agric. Food Chem. 1992, 40, 806 ~ 810) 的方法,用 6N 盐酸将血浆样品水解后,进行异硫氰酸苯酯 (PITC) 衍生,通过在下述条件下进行 HPLC 来测定。而且,血浆中的游离型羟脯氨酸量通过对除去蛋白的血浆样品在相同条件下进行 HPLC 来测定。

[0075] (分析条件)

[0076] 柱:TSK80TsQA (250×2.0mm)

[0077] 洗脱液:(A 液)50mM 醋酸钠缓冲液 (pH6)

[0078] (B 液) 乙腈

[0079] 洗脱条件:B 液 5 ~ 10% (0 ~ 8 分钟),B 液 70% (8 ~ 11 分钟),B 液 5% (11 分钟)

[0080] 流速:0.18mL/min

[0081] 检测波长:254nm

[0082] 各血浆样品的计算出的肽型羟脯氨酸的血中浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-7} 量 (hr·nmol/ml) 的平均值 $\pm$ S.E. 示于下表 1。

[0083] 表 1

[0084] 胶原肽组合物经口摄取后,血中的肽型羟脯氨酸量

[0085]

胶原肽组合物	肽型羟脯氨酸量 (hr·nmol/ml, 平均值 $\pm$ S.E.)
本发明的胶原肽	401.1 $\pm$ 29.2
胶原肽 A	220.6 $\pm$ 18.7*
胶原肽 B	245.4 $\pm$ 18.5*
胶原肽 C	190.0 $\pm$ 11.8*
胶原肽 D	277.2 $\pm$ 12.6*

[0086] *:P < 0.01

[0087] 而且,血中的肽型羟脯氨酸的量在摄取后 1 ~ 2 小时时出现峰。表 2 中表示了摄取各胶原肽后 1 小时后和 2 小时后肽型羟脯氨酸量 (nmol/ml) 的平均值 $\pm$ S.E.。

[0088] 表 2

[0089] 胶原肽组合物经口摄取 1 小时后和 2 小时后,血中的肽型羟脯氨酸的量

[0090]

胶原肽组合物	1 小时后 (nmol/ml)	2 小时后 (nmol/ml)
本发明的胶原肽	94.8 $\pm$ 9.3	125.5 $\pm$ 12.9
胶原肽 A	53.8 $\pm$ 5.7 ^{*1}	63.0 $\pm$ 5.6 ^{*1}
胶原肽 B	65.3 $\pm$ 6.5 ^{*2}	76.2 $\pm$ 6.7 ^{*1}
胶原肽 C	55.3 $\pm$ 11.8 ^{*1}	67.1 $\pm$ 10.0 ^{*1}
胶原肽 D	57.3 $\pm$ 2.5 ^{*1}	83.3 $\pm$ 6.6 ^{*1}

[0091] *¹:P < 0.05 *²:P < 0.01

[0092] 如表 1 所示,若比较 AUC,本发明的胶原肽组合物的血中移行性比其它市售的胶原肽组合物的血中移行性显著增加。而且,如表 2 所示,摄取本发明的胶原肽组合物后,1 小时后和 2 小时后的血中移行性显著增加到其它市售的胶原肽组合物的血中移行性的 1.4 ~ 1.8 倍以及 1.5 ~ 2.0 倍。

[0093] (实施例 3) 胶原肽组合物经口摄取后的血中的肽组成

[0094] 实施例 2 中采集的血浆样品中,以摄取本发明的胶原肽组合物、市售的胶原肽 A(鱼皮来源)和胶原肽 D(猪皮来源)后的血浆样品作为试样。用真空离心干燥机将各试样的乙醇上清部分干燥成固体后,加入 200 μ L 的含 0.1%三氟乙酸的 30%乙腈溶解,在下述条件下用 HPLC 进行分级。

[0095] (分析条件)

[0096] 柱:Superdex peptide HR10/30 (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)

[0097] 洗脱液:30%乙腈(含 0.1%三氟乙酸)

[0098] 流速:0.5mL/min

[0099] 检测波长:230nm

[0100] 柱温:室温

[0101] 分析时间:60 分钟

[0102] 洗出的试样每 1 分钟用级分收集器进行回收。将通过凝胶过滤色谱获得的分子量为 200 ~ 500 的部分作为肽级分,将其用真空离心干燥机浓缩至约 50 μ L,在下述条件下用反相色谱进行分级。

[0103] (分析条件)

[0104] 柱:Inertsil ODS-3(250mm $\times$ 4.6mm i.d., GL Science, 东京)

[0105] 洗脱液:(A 液)0.1%三氟乙酸

[0106] (B 液)80%乙腈(含 0.1%三氟乙酸)

[0107] 洗脱条件:B 液 0% (0 ~ 15 分钟), B 液 0 ~ 50% (15 ~ 30 分钟), B 液 100% (30 ~ 40 分钟), B 液 0% (40 ~ 55 分钟)

[0108] 流速:1mL/min

[0109] 柱温:43.0 $^{\circ}$ C

[0110] 检测波长:230nm

[0111] 对通过反相色谱分级的各峰进行氨基酸分析和蛋白质测序,计算各胶原肽组合物经口摄取后的血中的肽组成。氨基酸分析按照佐藤等人(Sato K. 等人, J. Agric. Food Chem. 1992, 40, 806 ~ 810)的方法,与实施例 2 同样进行分析。其中,使用 PTH 氨基酸标准混合液(Applied Biosystem 公司制)和 PTH 羟脯氨酸制备液(Applied Biosystem 公司制)作为标准。蛋白质测序如下进行,即,在将各峰的分级液滴加到 PVDF(聚偏二氟乙烯)膜后,用蛋白质测序仪(Applied Biosystem 公司制)分析。代表性结果即摄取 1 小时后的数据示于下表 3。

[0112] 表 3

[0113] 胶原肽组合物经口摄取后,血中的肽组成

[0114]

肽体	本发明的胶原肽	胶原肽 A	胶原肽 D
Ala-Hyp-Gly	30.9	0	0
Ser-Hyp-Gly	23.7	0	0
Pro-Hyp	69.5	22.6	54.4
Pro-Hyp-Gly	4.4	1.6	0
Ile-Hyp	3	3.8	0.6
Leu-Hyp	10.5	14.5	1.7
Phe-Hyp	3.6	3.8	0.6

[0115] (数值 :nmol/ml)

[0116] 如表 3 所示,经口摄取胶原肽 A、D 后,血中的肽组成的大部分为脯氨酸-羟脯氨酸的二聚体,还发现异亮氨酸-羟脯氨酸、亮氨酸-羟脯氨酸、苯丙氨酸-羟脯氨酸等二聚体。与之相对,经口摄取本发明的胶原肽组合物后,血中的肽组成在现有的脯氨酸-羟脯氨酸、异亮氨酸-羟脯氨酸、亮氨酸-羟脯氨酸、苯丙氨酸-羟脯氨酸等二聚体的基础上,还存在丙氨酸-羟脯氨酸-甘氨酸、丝氨酸-羟脯氨酸-甘氨酸等三聚体。因此,清楚了如果经口摄取本发明的胶原肽组合物,以往不向血中移行的肽体重 新移行。而且,在经口摄取胶原肽 A、D 后的血中肽中,没有检测到 N 末端氨基酸为甘氨酸的肽。该结果表示迄今为止报道的(参照日本特开 2001-131084 号、日本特开 2003-137807 号)氨基酸序列为 Gly-X-Y 的三肽即使经口摄取也不能原样向血中移行,因此无效。可认为,之所以 Gly-X-Y 的三肽在经口摄取后的血中检测不到,是因为经口摄取后,甘氨酸在消化道内被切断,只有残留的二肽体移行到血中。

[0117] (实施例 4) 胶原肽组合物的 N 末端氨基酸的测定

[0118] 研究了实施例 1 中制备的胶原肽组合物和实施例 2 中使用的胶原肽 A ~ D 的 N 末端氨基酸。各胶原肽中所含的肽的氨基酸序列的测定如下进行,即,在将各肽溶解于水后滴加到 PDVF 膜上,然后使用埃德曼法自动化的氨基酸分析装置即蛋白质测序仪(Applied Biosystem)进行。组合物中的肽的 N 末端氨基酸中,甘氨酸所占比例示于下表 4。

[0119] 表 4

[0120]

胶原肽组合物	N 末端氨基酸中 甘氨酸所占比例(摩尔%)
本发明的胶原肽组合物	59.4
胶原肽 A	69.0
胶原肽 B	21.6
胶原肽 C	25.3
胶原肽 D	65.4

[0121] 如表 4 所示,胶原肽 A、D 的 N 末端氨基酸中甘氨酸所占比例比 65 摩尔%大,另一方面,胶原肽 B、C 的 N 末端氨基酸中甘氨酸所占比例比 30 摩尔%小。如实施例 2 所示,这些胶原肽 A ~ D 的肽体的血中移行性低。与之相对,本发明的胶原肽组合物 N 末端氨基酸中甘氨酸所占比例为 59.4 摩尔%,而且血中移行性好,因此可判断,构成组合物的肽的 N 末端氨基酸组成中甘氨酸所占比例在适当范围时,血中的移行性高,一旦偏离该范围,血中移行性降低。

[0122] (实施例 5) 本发明的胶原肽组合物的制备

[0123] 在实施例 1 获得的明胶溶液中加入各种蛋白质分解酶,在下表 5 的条件下获得 5 种粉末状的胶原肽组合物作为本发明的胶原肽组合物。

[0124] 表 5

[0125]

本发明的胶原肽组合物 (试样名)	酶名和酶量(相对于每 1kg 明胶)	反应 pH、反应温度和反应 时间	失活条件	纯化条件
02A	枯草杆菌蛋白酶 (6.0g)	pH8.0, 50℃, 6 小时	90℃以上, 10 分钟	微粉活性炭 2.0 % 添加明胶后纯化过滤
02B	胰凝乳蛋白酶 (6.0g)	pH8.0, 40℃, 6 小时	同上	同上
02N	奇异果蛋白酶 (6.0g)	pH7.5, 40℃, 6 小时	同上	同上
02AF	枯草杆菌蛋白酶 (5.5g) 和菠萝蛋白酶 (3.0g) 的混合酶	pH8.0, 40℃, 6 小时	同上	同上
02BF	胰凝乳蛋白酶 (5.5g) 和菠萝蛋白酶 (3.0g) 的混合酶	pH8.0, 40℃, 6 小时	同上	同上

[0126] 获得的胶原肽组合物的平均分子量用与实施例 1 同样的方法调查, 用与实施例 4 同样的方法研究组合物中肽的 N 末端氨基酸中甘氨酸所占比例。结果示于下表 6。而且, 所有的胶原肽组合物的平均分子量为 2000。

[0127] 表 6

[0128]

本发明的胶原肽组合物 (试样名)	N 末端氨基酸中甘氨酸量所占比例 (摩尔 %)	分子量 500 以下 (%)	分子量 500 以上、3000 以下 (%)	分子量 3000 以上 (%)
02A	56.7	4.4	88.0	7.7
02B	63.6	3.8	87.6	8.6
02N	36.4	5.0	85.7	9.3
02AF	58.9	4.0	87.1	8.9
02BF	64.9	4.5	87.8	7.7

[0129] (实施例 6) 向血中的移行性比较试验 (吸收性试验 (2))

[0130] 用豚鼠研究实施例 5 中制备的 5 种本发明的胶原肽组合物的血中移行性。使用实施例 2 中所用的胶原肽 D 作为对照。试验中使用 7 周龄的 Hartley 系雄性豚鼠。待测试样的给药量为 3g/10mL/kg 体重, 溶解于蒸馏水中再经口给药。豚鼠在试验前一天的傍晚开始断食, 给药前和给药后 0.5、1、2、6 小时后在二乙醚麻醉下从颈静脉经时采血。血液的处理法和血浆中的羟脯氨酸量的测定法按照实施例 2 中所示方法进行。各血浆试样的计算出的肽型羟脯氨酸的血中浓度 - 时间曲线下面积 AUC_{0-7} 量 (hr · nmol/ml ; 平均值 ± S. E.) 示于下表 7。

[0131] 表 7

[0132] 胶原肽组合物经口给药后, 血中肽型羟脯氨酸量

[0133]

胶原肽组合物	肽型羟脯氨酸量 (hr · nmol/ml ; 平均值 ± S. E.)
胶原肽 D (实施例 2)	155.0 ± 12.5
02A	247.4 ± 7.9**
02B	281.9 ± 20.6**
02N	264.5 ± 44.3
02AF	269.7 ± 26.0**
02BF	257.2 ± 47.5

[0134] **: $p < 0.01$

[0135] 而且, 豚鼠中血中的肽型羟脯氨酸的量在摄取后 1 ~ 2 小时后出现峰。下表 8 中表示的是, 给予各胶原肽 1 小时后和 2 小时后的肽型羟脯氨酸量 (nmol/ml ; 平均值 ± S. E.)。

[0136] 表 8

[0137]

胶原肽组合物	1 小时后	2 小时后
--------	-------	-------

胶原肽 D(实施例 2)	29.82±5.13	27.84±2.91
02A	40.77±4.90	54.75±3.70**
02B	42.00±5.72	66.04±9.70*
02N	44.28±5.84	58.24±11.53
02AF	42.16±4.14	66.06±10.36*
02BF	41.33±10.48	61.55±13.41

[0138] ** :p < 0.01, * :p < 0.05

[0139] 如表 7 所示,若比较 AUC,本发明的胶原肽组合物的血中 移行性比市售的胶原肽 D 有显著提高。而且,如表 8 所示,摄取本发明的胶原肽组合物 1 小时和 2 小时后,血中移行性也比市售的胶原肽 D 有显著提高。

[0140] (实施例 7) 向血中的移行性比较试验 (吸收性试验 (3))

[0141] 用人研究实施例 5 中制备的本发明的胶原肽组合物中的 2 种 (02B、02N) 的血中移行性。使用市售的胶原肽 E(Nitta GelatinInc. 制,商品名 IXOS HDL-50F,分子量 500 以下的为 0.117%,分子量 500 以上、3000 以下的为 46.248%,分子量 3000 以上的为 53.637%,N 末端为甘氨酸的比例为 72.1 摩尔%) 作为对照。

[0142] 试验对 13 名人类志愿者设置 6 天以上的清洗期,对每一名受试者,以上述 3 种胶原肽组合物作为待测试样并分别单次摄取,形成交叉试验。受试者在断食 12 小时后,进行摄取前采血,使受试者摄取各待测试样。待测试样的摄取量为 25g/65kg 体重。摄取 0.5、1、2、4、7 小时后分别采血 5mL,与实施例 2 的方法同样地求出血浆中肽型羟脯氨酸量。各血浆试样的计算出的肽型羟脯氨酸的血中浓度-时间曲线下面积 AUC₀₋₇ 量 (hr • nmol/ml ;平均值 ±S.E.) 示于下表 9。

[0143] 表 9

[0144] 胶原肽组合物经口摄取后,血中的肽型羟脯氨酸量

[0145]

胶原肽组合物	肽型羟脯氨酸量 (hr • nmol/ml ;平均值 ±S.E.)
胶原肽 E	225.8±21.2
02B	241.0±19.4
02N	255.1±19.9**

[0146] ** :p < 0.01

[0147] 血中的肽型羟脯氨酸的量在摄取后 1 ~ 2 小时后出现峰。在下表 10 中表示的是给予各胶原肽 1 小时后和 2 小时后的肽型羟脯氨酸量 (nmol/ml ;平均值 ±S.E.)。

[0148] 表 10

[0149]

胶原肽组合物	1 小时后	2 小时后
胶原肽 E	63.5±28.4	67.7±30.1
02B	76.6±26.2	79.4±30.6
02N	82.5±25.1**	80.8±24.6*

[0150] ** :p < 0.01, * :p < 0.05

[0151] 如表 9 所示,若比较 AUC,本发明的胶原肽组合物的血中移行性比市售的胶原肽 E 有显著提高。而且,如表 10 所示,摄取本发明的胶原肽组合物 1 小时和 2 小时后,血中移行性也比市售的胶原肽 E 有显著提高。

[0152] 工业上利用的可能性

[0153] 本发明可以在功能性食品和补充剂等饮食品的制造领域中利用。

[0154] 本说明书中引用的所有刊物、专利和专利申请都直接作为参考整合到本说明书中。

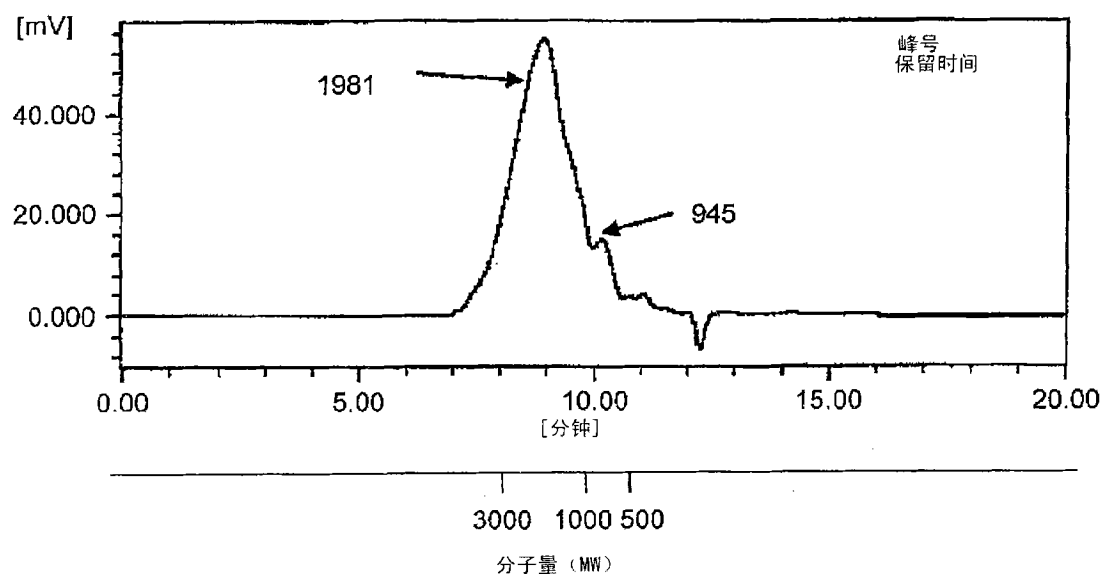


图 1