



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103540636 B

(45) 授权公告日 2015.05.20

(21) 申请号 201310449388.9

余华. 高营养蚕蛹复合氨基酸液的研制.《粮油食品科技》.2000,第8卷(第4期),

(22) 申请日 2013.09.29

审查员 李煦颖

(73) 专利权人 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 王伟 杨玉英 王楠 张玉

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务有限公司
33212

代理人 金祺

(51) Int. Cl.

C12P 21/06(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1896267 A, 2007.01.17,
林高堂等. 单酶水解蚕蛹蛋白工艺条件研究.《广东蚕业》.2008,第42卷(第2期),

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

利用蚕蛹制取降血脂肽的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用蚕蛹制取降血脂肽的方法,包括以下步骤:1)、将脱脂干蚕蛹粉或蚕蛹蛋白粉与水混合后,先调节pH值为6.8~7.2,然后升温至85~95℃并保温8~12min后自然冷却至45℃~50℃;接着再加入木瓜蛋白酶进行酶解反应;将酶解反应所得产物升温至95~105℃并保持此温度10~15min,再自然冷却至室温以终止酶解反应;离心,得酶解液;2)、采用活性炭对酶解液于42~48℃进行脱色处理,将脱色后酶解液进行过滤;3)、将粗滤酶解液在0.1~0.2Mpa的工作压力和0~45℃的工作温度下,采用超滤膜进行超滤处理,得超滤酶解液;将所述超滤酶解液依次进行真空浓缩、冷冻干燥;得降血脂肽。

1. 利用蚕蛹制取降血脂肽的方法,其特征是包括以下步骤:

1)、将脱脂干蚕蛹粉或蚕蛹蛋白粉与水按照 1:10 ~ 11 的重量比混合后,先调节 pH 值为 6.8 ~ 7.2,然后于 5 ~ 10min 内升温至 85 ~ 95℃并保温 8 ~ 12min 后自然冷却至 45℃ ~ 50℃;接着再加入木瓜蛋白酶进行酶解反应,所述木瓜蛋白酶的重量是脱脂干蚕蛹粉或蚕蛹蛋白粉重量的 1.5 ~ 2.5%,酶解反应温度为 45℃ ~ 50℃,酶解反应时间为 3 ~ 4h;所述木瓜蛋白酶的酶活力 800AU/g;

将酶解反应所得产物于 5 ~ 10min 内升温至 95 ~ 105℃并保持此温度 10 ~ 15min,再自然冷却至室温以终止酶解反应;离心,得酶解液;

2)、采用活性炭对所述酶解液于 42 ~ 48℃进行脱色处理,活性炭的用量为酶解液总重的 9 ~ 11%,得脱色后酶解液;

将脱色后酶解液进行过滤,得粗滤酶解液;

3)、将粗滤酶解液在 0.1 ~ 0.2Mpa 的工作压力和 0 ~ 45℃的工作温度下,采用超滤膜进行超滤处理,得超滤酶解液,所述超滤膜的截留分子量为 5KDa;

将所述超滤酶解液依次进行真空浓缩、冷冻干燥;得降血脂肽。

2. 根据权利要求 1 所述的利用蚕蛹制取降血脂肽的方法,其特征是:所述步骤 1) 的离心为 2000 ~ 4000r/min 的转速下离心 15 ~ 25min。

利用蚕蛹制取降血脂肽的方法

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脂肽的方法。

背景技术

[0002] HMG-CoA 还原酶是体内催化 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA) 生成二羟甲基戊酸 (MVA) 的关键酶,这一步是体内合成胆固醇的限速步骤,也是目前最主要的高血脂症临床药物的靶点。HMG-CoA 还原酶抑制剂是降血脂功效成分和药物筛选主要手段之一。目前,市场上使用的降脂药物大都为化学合成的他汀类药物,虽然其对改善由高血脂引起的心脑血管疾病有很好的疗效,但长期使用会有带来一系列的不良反应和副作用。

[0003] 从天然蛋白中提取具有营养性和生理活性的功能肽,并将这些功能肽应用到保健食品和强化营养食品中,不但能够全面利用食品及食品加工中的优质蛋白,而且能够有效的提高来源广泛的蛋白质原料的附加值,同时大大提升传统食品的科技含量。

[0004] 食品蛋白质经酶解产生的降血脂肽具有食用安全性高、无副作用、疗效好的优点,近年来受到广泛关注。目前人们已经成功的从大豆、大米、土豆、荞麦、鳕鱼、大西洋鲑、鲑鱼、乳清蛋白中获得了 HMG-CoA 还原酶抑制肽。但上述研究分离方法成本高,规模化生产的成本也较高,并且原料多为人们的生活食物。九十年代后期,国内外关于蛋白酶解肽的研究主要围绕在蛋白质的水解度、分子量大小、游离氨基酸含量、生物酶重复利用以及对苦味的控制和去除等。

[0005] 蚕蛹 (Silkworm pupa) 为蚕蛾科昆虫家蚕蛾 (*Bombyx mori* L.) 的蛹,既是一种高营养的美食,也是一种中药,具有和脾胃、祛风湿、长阳气之功效,自古以来就得到广泛应用。现代医学证明,蚕蛹具有降低血胆固醇、治疗冠状动脉供血不足等效果。2000 年全国产茧 45.5 万吨,生丝约 6 万吨。2001 年中国国家经贸委发布的《茧丝绸行业“十五”规划》中预计到 2015 年,蚕茧产量将超过 60 万吨,生丝年产量将达到 8 万吨以上。而实际上,2011 年,蚕茧产量就达到了 66.1 万吨。通常缫制 1 吨生丝可得 1.5 吨干蚕蛹,蚕蛹产量非常可观。同时随着蚕丝业的进一步发展,蚕蛹的产量将会更大,因此开发利用蚕蛹资源具有重要的意义与广阔的前景。

[0006] 目前国内对于利用食物蛋白制备降血脂肽报道较少,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脂肽的技术未见面世。

[0007] 200610052094.2 的发明《利用蚕蛹制取降血压肽的方法》公开了一种利用蚕蛹制取降血压肽的方法,其特征是包括以下步骤:将脱脂干蚕蛹粉或蚕蛹蛋白粉与水按照 1:6~7 的重量比混和后,先调节 pH 值为 6.0~6.5,然后升温至 50~55℃并保持此温度 18~22 分钟,再加入中性蛋白酶进行酶解反应;所述中性蛋白酶的重量是脱脂干蚕蛹粉或蚕蛹蛋白粉的 0.9%~1.1%,酶解反应温度 50℃~55℃,酶解反应时间 120~200 分钟;所述中性蛋白酶的酶活力 1.5AU/g;所述酶解反应时间到后,将酶解反应产物迅速升温至 85℃并保持此温度 10~15 分钟,再迅速冷却至 0~30℃以终止酶解反应;然后离心即得酶解液;采用活性炭对所述酶解液进行脱色处理,活性炭用量为酶解液总重的 5~30%,温度

55℃；再进行粗滤处理后得粗滤酶解液；将所述粗滤酶解液在 0.1 ~ 0.2Mpa 的工作压力和 0 ~ 45℃的工作温度下，采用超滤膜进行超滤处理，得超滤酶解液，所述超滤膜截留分子量为 30 千道尔顿；再将所述超滤酶解液依次进行真空浓缩、冷冻干燥；得降血压肽。肽含量为 92.12%，产品得率为 6.3%，利用体外检测 ACE 抑制活性的 CUSHMAN 法，测得其 IC₅₀ 为 1.02mg/ml。

[0008] 采用该方法能到的是降血压肽，其对降血脂的效果相对较差。

发明内容

[0009] 本发明要解决的技术问题是提供一种成本低、所得降血压肽效果好的利用蚕蛹制取降血脂肽的方法。

[0010] 为了解决上述技术问题，本发明提供一种利用蚕蛹制取降血脂肽的方法，包括以下步骤：

[0011] 1)、将脱脂干蚕蛹粉或蚕蛹蛋白粉与水按照 1:10~11 的重量比混合后，先调节 pH 值为 6.8 ~ 7.2 (较佳为 7.0)，然后于 5~10min 内升温至 85~95℃ (较佳为 90℃) 并保温 8~12min (较佳为 10min) 后自然冷却至 45℃ ~ 50℃；接着再加入木瓜蛋白酶进行酶解反应，所述木瓜蛋白酶的重量是脱脂干蚕蛹粉或蚕蛹蛋白粉重量的 1.5~2.5% (较佳为 2%)，酶解反应温度为 45℃ ~ 50℃，酶解反应时间为 3~4h (较佳为 3.5h)；

[0012] 将酶解反应所得产物于 5~10min 内升温至 95~105℃ (较佳为 100℃) 并保持此温度 10 ~ 15min，再自然冷却至室温以终止酶解反应；离心，得酶解液；

[0013] 2)、采用活性炭对所述酶解液于 42~48℃ (较佳为 45℃) 进行脱色处理，活性炭的用量为酶解液总重的 9~11% (较佳为 10%)，得脱色后酶解液；

[0014] 将脱色后酶解液进行过滤(属于粗滤处理)，得粗滤酶解液；

[0015] 3)、将粗滤酶解液在 0.1 ~ 0.2Mpa 的工作压力和 0 ~ 45℃(例如为 20 ~ 30℃)的工作温度下，采用超滤膜进行超滤处理，得超滤酶解液，所述超滤膜的截留分子量为 5KDa；

[0016] 将超滤酶解液依次进行真空浓缩、冷冻干燥；得降血脂肽。

[0017] 作为本发明的利用蚕蛹制取降血脂肽的方法的改进：木瓜蛋白酶的酶活力 800AU/g。

[0018] 作为本发明的利用蚕蛹制取降血脂肽的方法的进一步改进：步骤 1) 的离心为 2000~4000r/min 的转速下离心 15~25min。

[0019] 备注说明：

[0020] 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 ≤ 1.5%(重量%)。

[0021] 2、本发明所指的室温为 0 ~ 30℃。

[0022] 在本发明中，脱脂干蚕蛹粉为常规的市购品。

[0023] 在本发明中，蚕蛹蛋白粉可通过市购的形式获得，也可通过常规技术利用脱脂干蚕蛹粉制备而得，例如可采用以下制备方法：

[0024] 称取粉碎后的脱脂干蚕蛹粉(水分 1.5%，蛋白质含量 75.03%，原料来源于南通福丽尔生物制品有限公司)10kg，利用 50L 的 1.0% (质量浓度)的 NaOH 溶液提取蛋白，提取温度 60℃，提取时间为 4h，所得的提取液在 J-6M 型大容量冷冻离心机(BECKMAN 公司)3000r/min 的 4℃条件下离心 20min，上清液用浓度为 2mol/L 的 HCl 溶液将 pH 值降低到 4.6，所得

沉淀离心后真空冷冻至恒重,得到蚕蛹蛋白粉 2.71kg,蛋白质含量 97.3%。

[0025] 本发明的利用蚕蛹制取降血脂肽的方法,具有如下优点:

[0026] 1)、本发明所制备的降血脂肽是脱脂干蚕蛹粉或蚕蛹蛋白粉经生物酶水解而得,具有抑制 HMG-CoA 还原酶活性的作用,对高血脂患者具有降血脂作用,安全、无毒副作用,对血脂水平正常者可起到保健作用,对正常血脂水平无影响。

[0027] 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。

[0028] 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。

[0029] 4)、对降血脂的效果好。

[0030] 本发明的降血脂肽的实际使用方法为:口服每日两次;每次 0.5~1 克。

具体实施方式

[0031] 实施例 1、一种利用蚕蛹制取降血脂肽的方法,依次进行以下步骤:

[0032] 1)、称取粉碎后的脱脂干蚕蛹粉(水分 1.5%,蛋白质含量 75.03%,原料来源于南通福尔尔生物制品有限公司)50kg,加水 500kg 搅匀后,调节 pH 值为 7.0 后(用浓度为 2mol/L HCl 溶液、NaOH 溶液进行调节,此调节方法属于常规技术),先于 5~10min 内升温至 90℃并保持此温度 10min 后自然冷却至 45℃~50℃保温,作为反应起始物;在反应起始物中加入木瓜蛋白酶(酶活力为 800AU/g)1kg,继续保温并不断搅拌进行酶解反应 3h。

[0033] 时间到达后,将酶解反应所得产物于 5~10min 内升温至 100℃,并保温 10min;然后自然冷却至室温,从而终止反应;

[0034] 接着,在 J-6M 型大容量冷冻离心机(BECKMAN 公司)3000r/min 的 4℃条件下离心 20min,得上清液 350kg,该上清液为酶解液;离心所得的沉淀物可代替反应起始物重新用于参加上述酶解反应。

[0035] 2)、用 35kg 的脱色活性炭对上述酶解液(350kg)脱色 2h,温度控制在 45℃;所得的脱色后酶解液经 3 层致密纱布袋过滤,得粗滤酶解液。

[0036] 3)、利用中空纤维聚砜超滤膜(截留分子量 5KDa)对粗滤酶解液进行超滤,工作压力 0.1~0.2Mpa,工作温度 20~30℃,得到超滤酶解液 187kg。

[0037] 利用真空浓缩机将此超滤酶解液浓缩至 50kg,进行真空冷冻至恒重,得到具有降血脂功能的肽粉(降血脂肽)4.41kg,肽含量为 91.2%,产品得率为 8.8%,色泽白色细腻。

[0038] 按照已经公开发表的专利号为 201110073398.8 的《一种检测 HMG-CoA 还原酶活性的改良分光光度法》进行检测,测得其 IC_{50} 为 0.65mg/ml。

[0039] 实施例 2、一种利用蚕蛹制取降血脂肽的方法,依次进行以下步骤:

[0040] 1)、称取蚕蛹蛋白粉 2kg,加水 20kg 搅匀后调节 pH 值为 7.0 后,先于 5~10min 内升温至 90℃并保持此温度 10min 后,然后自然冷却至 45℃~50℃保温,作为反应起始物;在反应起始物中加入木瓜蛋白酶(酶活力为 800AU/g)40g,继续保温并不断搅拌进行酶解反应 3h。时间到达后,将此酶解反应液于 5~10min 内升温至 100℃,并保温 10min;然后自然冷却至室温,从而终止反应;

[0041] 接着,在 J-6M 型大容量冷冻离心机(BECKMAN 公司)3000r/min 的 4℃条件下离心

20min,得上清液 13.5kg,即为酶解液;离心所得的沉淀物可作为反应起始物重新用于参加上述酶解反应。

[0042] 2)、用 1.35kg 的脱色活性炭对上述酶解液脱色 2h,温度控制在 45℃,所得的脱色后酶解液经 3 层致密纱布袋过滤(为粗滤),得粗滤酶解液。

[0043] 3)、利用中空纤维聚砜超滤膜(截留分子量 5KDa)对粗滤酶解液进行超滤,工作压力 0.1~0.2Mpa,工作温度 20~30℃,得到超滤酶解液 6.4kg。利用真空浓缩机将此超滤酶解液浓缩至 2.1kg,进行真空冷冻干燥至恒重,得到具有降血脂功能的肽粉(降血脂肽) 0.23kg,肽含量为 93.2%,产品得率为 11.5%,色泽白色细腻。

[0044] 按照已经公开发表的专利号为 201110073398.8 的《一种检测 HMG-CoA 还原酶活性的改良分光光度法》进行检测,测得其 IC_{50} 为 0.58mg/ml。

[0045] 对比例 1、将 200610052094.2 的发明《利用蚕蛹制取降血压肽的方法》中告知的实施例 1 和实施例 2 所得的具有降血压功能的肽粉,按照已经公开发表的专利号为 201110073398.8 的《一种检测 HMG-CoA 还原酶活性的改良分光光度法》进行,测得其 IC_{50} 分别仅为 4.5mg/ml、4.8mg/ml。

[0046] 对比例 2、将实施例 2 中的木瓜蛋白酶由酶活力为 800AU/g、用量为 40g 改成酶活力为 400AU/g、用量为 80g;其余同实施例 2。

[0047] 最终得到具有降血脂功能的肽粉 0.18kg,肽含量为 92.7%,产品得率为 9.0%。

[0048] 按照已经公开发表的专利号为 201110073398.8 的《一种检测 HMG-CoA 还原酶活性的改良分光光度法》进行检测,测得其 IC_{50} 为 0.63mg/ml。

[0049] 对比例 3、将实施例 2 中的木瓜蛋白酶由酶活力为 800AU/g、用量为 40g 改成酶活力为 1600AU/g、用量为 20g;其余同实施例 2。

[0050] 得到具有降血脂功能的肽粉 0.19kg,肽含量为 92.8%,产品得率为 9.5%。

[0051] 按照已经公开发表的专利号为 201110073398.8 的《一种检测 HMG-CoA 还原酶活性的改良分光光度法》进行检测,测得其 IC_{50} 为 0.61mg/ml。

[0052] 对比例 4、将实施例 2 的步骤 1)中的“调节 pH 值为 7.0”改成“调节 pH 值为 6.5”;其余同实施例 2。

[0053] 得到具有降血脂功能的肽粉 0.15kg,肽含量为 91.7%,产品得率为 7.5%。

[0054] 按照已经公开发表的专利号为 201110073398.8 的《一种检测 HMG-CoA 还原酶活性的改良分光光度法》进行检测,测得其 IC_{50} 为 0.78mg/ml。

[0055] 对比例 5、将实施例 2 的步骤 1)中的“调节 pH 值为 7.0”改成“调节 pH 值为 9”;其余同实施例 2。

[0056] 得到具有降血脂功能的肽粉 0.09kg,肽含量为 88.9%,产品得率为 4.5%。

[0057] 按照已经公开发表的专利号为 201110073398.8 的《一种检测 HMG-CoA 还原酶活性的改良分光光度法》进行检测,测得其 IC_{50} 为 5.3mg/ml。

[0058] 对比例 6、对于实施例 2 的步骤 1)中的“先于 5~10min 内升温至 90℃并保持此温度 10min 后,然后自然冷却至 45℃~50℃保温,作为反应起始物”;取消升温步骤,即,改成“控制温度为 45℃~50℃,作为反应起始物”。其余同实施例 2。

[0059] 得到具有降血脂功能的肽粉 0.13kg,肽含量为 91.6%,产品得率为 6.5%。

[0060] 按照已经公开发表的专利号为 201110073398.8 的《一种检测 HMG-CoA 还原酶活性

的改良分光光度法》，测得其 IC_{50} 为 0.97mg/ml。

[0061] 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。