



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109234342 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811093620.9

(22)申请日 2018.09.19

(71)申请人 新昌县赛因斯生物科技有限公司  
地址 312500 浙江省绍兴市新昌县天姥路  
22号

(72)发明人 徐康

(74)专利代理机构 北京国翰知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11696  
代理人 卫翠婷

(51) Int. Cl.

C12P 21/06(2006.01)

C07K 14/78(2006.01)

C07K 1/34(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

甲鱼肽的制备方法

(57)摘要

本发明公开了甲鱼肽的制备方法,步骤为:将甲鱼原料粉碎,加入含3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸和葛根素的水溶液并一起投入双螺杆蒸煮热压机进料口中,热挤压出浓浆物,加木瓜蛋白酶限制性酶解,将酶解液离心,收集上清液,冷冻干燥得甲鱼胶原蛋白干品;将甲鱼胶原蛋白与枯草杆菌蛋白酶,于蒸馏水中溶解,依次加入过氧叔丁醇、甜菊糖,水解得酶解液;将酶解液经脱色、超滤膜除杂、纳滤膜浓缩、冷冻干燥得到甲鱼胶原蛋白肽。有益效果为:本发明甲鱼肽制备方法无需酸碱预处理,甲鱼蛋白纯度高、甲鱼肽提取率高、提取时间短。

1. 甲鱼肽的制备方法,采用双螺杆蒸煮热挤压结合酶解提取甲鱼胶原蛋白,其特征在于:所述双螺杆蒸煮热挤压进料中包含3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸和葛根素的水溶液。

2. 根据权利要求1所述的甲鱼肽的制备方法,其特征在于:按以下步骤进行:

(1) 将甲鱼原料粉碎;

(2) 将粉碎后的甲鱼、3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸和葛根素的水溶液一起投入双螺杆蒸煮热挤压机进料口中,在蒸煮温度100-131℃,螺杆转速50-80r/min下挤压0.5-1h,热挤压出浓浆物;

(3) 挤压得浓浆物中加占甲鱼重量1-3%的木瓜蛋白酶限制性酶解,控制温度在5-10℃,双频率超声辅助酶解,持续低速搅拌下酶解24-48小时,沸水浴灭酶,将酶解液高速离心,取上清液,沉淀重复酶解操作2-3次,收集上清液,冷冻干燥得甲鱼胶原蛋白干品;

(4) 将25-40份冻干的甲鱼胶原蛋白与0.7-0.9份枯草杆菌蛋白酶,加入到100-150份蒸馏水中完全溶解,依次加入过氧叔丁醇、甜菊糖,调节pH为7.5-8.0,置于45-55℃恒温水浴锅内,双频率超声辅助酶解,水解1.5-2小时后用沸水浴灭酶15-20分钟,冷却得酶解液;

(5) 将酶解液经脱色、超滤膜除杂、纳滤膜浓缩、冷冻干燥得到甲鱼胶原蛋白肽。

3. 根据权利要求2所述的甲鱼肽的制备方法,其特征在于:所述双螺杆蒸煮挤压机为食品加工领域通用机械。

4. 根据权利要求2所述的甲鱼肽的制备方法,其特征在于:所述(2)中甲鱼含量为水溶液的85-90%,3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸的含量为水溶液的2-6%,葛根素的含量为水溶液的0.1-0.3%。

5. 根据权利要求2所述的甲鱼肽的制备方法,其特征在于:所述(3)中双频率超声辅助酶解的超声频率为30-45kHz,超声声强为0.4-0.5W/cm<sup>2</sup>。

6. 根据权利要求2所述的甲鱼肽的制备方法,其特征在于:所述(4)中双频率超声辅助酶解的超声频率为50-60kHz,超声声强为0.4-0.5W/cm<sup>2</sup>。

7. 根据权利要求2所述的甲鱼肽的制备方法,其特征在于:所述(4)中加入的过氧叔丁醇、甜菊糖分别为0.003-0.007份、0.001-0.004份。

8. 根据权利要求2所述的甲鱼肽的制备方法,其特征在于:所述(5)中超滤膜为截留分子量为3000Da1的超滤膜,纳滤膜为截留分子量为500Da1的纳滤膜。

## 甲鱼肽的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及甲鱼的深加工技术领域,尤其是涉及甲鱼肽的制备方法。

### 背景技术

[0002] 甲鱼又名鳖、团鱼,有补血、强骨、抗疲劳、延年益寿之功效,是我国传统食品,也是开发高级保健食品的良好原料;甲鱼的主要营养成分为蛋白质、脂肪、铁、钙、动物胶、角质白及多种维生素等。甲鱼含有很高的蛋白质,大约每公斤有165克蛋白质,而食物或药物中的蛋白质一般要被消化液酶解为低聚肽或氨基酸而被机体吸收和利用,因此吸收慢,利用率低,所以也达不到应有的药效。

[0003] 胶原蛋白肽是胶原蛋白的水解产物,一般分子量在3000Da以下。胶原蛋白肽具有多方面的生理功能,胶原蛋白肽的消化吸收率几乎达100%,能保护胃黏膜以及抗溃疡,促进皮肤胶原代谢,抑制血压上升,促进Ca<sup>2+</sup>吸收和降低血清中胆固醇含量,抗氧化、抗衰老等,因此可以在医药、保健品、化妆品等行业中有广泛应用。

[0004] 提取胶原蛋白肽的方法主要有热水浸提法、酸法、碱法、盐法及酶法等,其活性肽的获得方法则有从天然生物体中提取、通过化学方法和重组DNA技术合成、体外水解蛋白质等。随着酶制剂工业的迅猛发展,酶法水解比传统的酸法、碱法更为温和、安全、专一,不仅降解时间短,产品营养流失较少,而且无环境污染。目前,酶解胶原蛋白主要有单酶法和多酶法,多酶法又分为混合酶解法和分步酶解法。酶解提取活性肽的条件通常应考虑所开发产品对分子量的要求,分子量较小的产品宜用多酶法。

[0005] 现有技术如授权公告号为CN 102286589B的中国发明专利,公开了一种甲鱼低聚肽的提取方法,以甲鱼为原料用碱性蛋白酶酶解后,再用风味蛋白酶外切和调节风味,酶解液进行超滤,碱性蛋白酶加入量为原料甲鱼重量的0.2-5%,风味蛋白酶加入量为原料甲鱼重量的0.1-2%,膜截留分子量为0.5-30万道尔顿的超滤膜进行超滤,薄膜浓缩喷雾干燥得到甲鱼低聚肽;该发明操作简便,口感好,成本低,环保高效,非常适合工业化大生产,但是采用传统的酶解法得到的甲鱼胶原蛋白纯度较低,使得水解不彻底,进而降低了甲鱼蛋白肽的得率,造成营养物质浪费。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种无需酸碱预处理,甲鱼蛋白纯度高、甲鱼肽提取率高、提取时间短的甲鱼肽的制备方法。

[0007] 本发明针对上述技术中提到的问题,采取的技术方案为:

[0008] 甲鱼肽的制备方法,通过以下工艺步骤实现:

[0009] 步骤1:将洗净的甲鱼原料通过粉碎机粉碎;

[0010] 步骤2:将粉碎后的甲鱼、3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸和葛根素的水溶液一起投入双螺杆蒸煮热挤压机进料口中,在蒸煮温度100-131℃,螺杆转速50-80r/min下挤压0.5-1h,热挤压出浓浆物;

[0011] 步骤3:挤压得浓浆物中加占甲鱼重量1-3%的木瓜蛋白酶限制性酶解,控制温度在5-10℃,双频率超声辅助酶解,持续低速搅拌下酶解24-48小时,沸水浴灭酶,将酶解液于10000-13000r/min高速离心,取上清液,沉淀重复酶解操作2-3次,收集上清液,冷冻干燥得甲鱼胶原蛋白干品;

[0012] 步骤4:称取25-40份冻干的甲鱼胶原蛋白与0.7-0.9份枯草杆菌蛋白酶,加入到100-150份蒸馏水中完全溶解,依次加入过氧叔丁醇、甜菊糖,调节pH为7.5-8.0,置于45-55℃恒温水浴锅内,双频率超声辅助酶解,水解1.5-2小时后用沸水浴灭酶15-20分钟,冷却得酶解液;胶原蛋白独特的三股超螺旋结构,性质十分稳定,一般的加工温度及短时间加热都不能使其分解,从而造成其消化吸收较困难,不易被人体充分利用,甲鱼胶原蛋白分子经水解后主要形成相对分子量较小的多肽、小肽、氨基酸,水解后其吸收利用率可以提高很多,且可以促进食品中的其它蛋白质的吸收;

[0013] 步骤5:将酶解液经脱色、超滤膜除杂、纳滤膜浓缩、冷冻干燥得到甲鱼胶原蛋白肽。

[0014] 作为优选,步骤2中所用的双螺杆蒸煮挤压为食品加工领域通用机械。

[0015] 作为优选,步骤2中甲鱼含量为水溶液的85-90%,3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸的含量为水溶液的2-6%,葛根素的含量为水溶液的0.1-0.3%;3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸和葛根素的特殊存在,能够在螺杆搅拌及热蒸煮的作用下迅速溶解甲鱼细胞的膜蛋白及脂肪,使细胞膜破裂,分离出甲鱼中含有的动物胶、核酸、蛋白、维生素等营养成分,提高了热挤压效率;同时,由于其富含正电荷,能够与核酸等带负电荷的成分结合,削弱了这些物质与蛋白的结合,从而提高挤压出浓浆物中甲鱼胶原蛋白的含量和纯度,最终可提高甲鱼胶原蛋白肽的得率。

[0016] 作为优选,步骤3和4所用的双频率超声辅助酶解的超声频率分别为30-45kHz与50-60kHz,超声声强为0.4-0.5W/cm<sup>2</sup>;双频率超声可以通过降低酶解反应Ea和KM值,增加酶与底物的接触频率与接触面积,增大酶解反应速率。

[0017] 作为优选,步骤4中加入的过氧叔丁醇、甜菊糖分别为0.003-0.007份、0.001-0.004份;微量的过氧叔丁醇和甜菊糖产生协同作用,一方面能够增加枯草杆菌蛋白酶与甲鱼胶原蛋白结合的活性位点,提高酶与底物的亲和力,加快枯草杆菌蛋白酶的酶解速率,从而缩减水解反应时间,降低时间成本与人工成本,并且在随后的水解液煮沸时蒸腾除去,不会残留在胶原蛋白肽产品中;另一方面,能够促进枯草杆菌蛋白酶将甲鱼胶原蛋白的肽链从内部断开,使蛋白内部的氨基酸暴露出来,并进一步将多肽末端的疏水性氨基酸切断、释放出来,在增加小分子氨基酸游离程度的同时,还能有效减少肽的苦味,改善产品的口感。

[0018] 作为优选,步骤5所用的超滤膜为截留分子量为3000Da1的超滤膜,纳滤膜为截留分子量为500Da1的纳滤膜。

[0019] 与现有技术相比,本发明的优点在于:(1)本发明采用双螺杆蒸煮热挤压结合酶解提取甲鱼胶原蛋白,3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸和葛根素的特殊存在,能够加速甲鱼细胞膜破裂,分离出甲鱼中含有的动物胶、核酸、蛋白、维生素等营养成分,提高热挤压效率;同时,能够与核酸等带负电荷的成分结合,削弱了这些物质与蛋白的结合,从而提高了挤压出浓浆物中甲鱼胶原蛋白的含量和纯度;(2)水解过程中,过氧叔丁醇和甜菊糖具有协同作用,一方面能够提高枯草杆菌蛋白酶的酶解速率,从而缩减水解反应时间,降低时间成

本与人工成本,另一方面,能够提高疏水性氨基酸的游离程度,改善产品的口感。

### 具体实施方式

[0020] 下面通过实施例对本发明方案作进一步说明:

[0021] 实施例1:

[0022] 甲鱼肽的制备方法,通过以下工艺步骤实现:

[0023] (1) 将洗净的甲鱼原料通过粉碎机粉碎;

[0024] (2) 将粉碎后的甲鱼、3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸和葛根素的水溶液一起投入双螺杆蒸煮热挤压机进料口中,于蒸煮温度100℃,螺杆转速50r/min下挤压0.5h,热挤压出浓浆物;其中,按重量百分比计,甲鱼含量为85%,3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸含量为2%,葛根素含量为0.1%;

[0025] (3) 挤压得浓浆物中加占甲鱼重量1%的木瓜蛋白酶限制性酶解,控制温度在5℃,于超声频率为30kHz、超声声强为0.4W/cm<sup>2</sup>下双频率超声辅助酶解,持续低速搅拌下酶解24小时,沸水浴灭酶,将酶解液于10000r/min高速离心,取上清液,沉淀重复酶解操作2次,收集上清液,冷冻干燥得甲鱼胶原蛋白干品;

[0026] (4) 称取25份冻干的甲鱼胶原蛋白与0.7份枯草杆菌蛋白酶,加入到100份蒸馏水中完全溶解,依次加入0.003份过氧叔丁醇、0.001份甜菊糖,调节pH为7.5,置于45℃恒温水浴锅内,于超声频率为50kHz、超声声强为0.4W/cm<sup>2</sup>下双频率超声辅助酶解,水解1.5小时后用沸水浴灭酶15分钟,冷却得酶解液;胶原蛋白独特的三股超螺旋结构,性质十分稳定,一般的加工温度及短时间加热都不能使其分解,从而造成其消化吸收较困难,不易被人体充分利用,甲鱼胶原蛋白分子经水解后主要形成相对分子量较小的多肽、小肽、氨基酸,水解后其吸收利用率可以提高很多,且可以促进食品中的其它蛋白质的吸收;

[0027] (5) 将(4)步的酶解液经脱色、超滤膜除杂、纳滤膜浓缩、冷冻干燥得到甲鱼胶原蛋白肽;超滤膜为截留分子量为3000Da1的超滤膜,纳滤膜为截留分子量为500Da1的纳滤膜。

[0028] 采用考马斯亮蓝法测定甲鱼胶原蛋白的含量为81.2%;采用高效凝胶过滤色谱法测定相对分子质量小于3000道尔顿的甲鱼胶原蛋白肽的含量为95.3%。

[0029] 实施例2:

[0030] 甲鱼肽的制备方法,通过以下工艺步骤实现:

[0031] (1) 将洗净的甲鱼原料通过粉碎机粉碎;

[0032] (2) 将粉碎后的甲鱼、3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸和葛根素的水溶液一起投入双螺杆蒸煮热挤压机进料口中,于蒸煮温度123℃,螺杆转速60r/min下挤压0.6h,热挤压出浓浆物;其中,按重量百分比计,甲鱼含量为87%,3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸含量为5%,葛根素含量为0.2%;

[0033] (3) 挤压得浓浆物中加占甲鱼重量2%的木瓜蛋白酶限制性酶解,控制温度在8℃,于超声频率为35kHz、超声声强为0.4W/cm<sup>2</sup>下双频率超声辅助酶解,持续低速搅拌下酶解36小时,沸水浴灭酶,将酶解液于12000r/min高速离心,取上清液,沉淀重复酶解操作2次,收集上清液,冷冻干燥得甲鱼胶原蛋白干品;

[0034] (4) 称取30份冻干的甲鱼胶原蛋白与0.8份枯草杆菌蛋白酶,加入到130份蒸馏水中完全溶解,依次加入0.005份过氧叔丁醇、0.002份甜菊糖,调节pH为7.8,置于50℃恒温水

浴锅内,于超声频率为55kHz、超声声强为 $0.4\text{W}/\text{cm}^2$ 下双频率超声辅助酶解,水解1.8小时后用沸水浴灭酶16分钟,冷却得酶解液;胶原蛋白独特的三股超螺旋结构,性质十分稳定,一般的加工温度及短时间加热都不能使其分解,从而造成其消化吸收较困难,不易被人体充分利用,甲鱼胶原蛋白分子经水解后主要形成相对分子量较小的多肽、小肽、氨基酸,水解后其吸收利用率可以提高很多,且可以促进食品中的其它蛋白质的吸收;

[0035] (5) 将(4)步的酶解液经脱色、超滤膜除杂、纳滤膜浓缩、冷冻干燥得到甲鱼胶原蛋白肽;超滤膜为截留分子量为3000Da1的超滤膜,纳滤膜为截留分子量为500Da1的纳滤膜。

[0036] 采用考马斯亮蓝法测定甲鱼胶原蛋白的含量为86.6%;采用高效凝胶过滤色谱法测定相对分子质量小于3000道尔顿的甲鱼胶原蛋白肽的含量为96.8%。

[0037] 实施例3:

[0038] 甲鱼肽的制备方法,通过以下工艺步骤实现:

[0039] (1) 将洗净的甲鱼原料通过粉碎机粉碎;

[0040] (2) 将粉碎后的甲鱼、3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸和葛根素的水溶液一起投入双螺杆蒸煮热挤压机进料口中,于蒸煮温度 $131^\circ\text{C}$ ,螺杆转速80r/min下挤压1h,热挤压出浓浆物;其中,按重量百分比计,甲鱼含量为90%,3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸含量为6%,葛根素含量为0.3%;

[0041] (3) 挤压得浓浆物中加占甲鱼重量3%的木瓜蛋白酶限制性酶解,控制温度在 $10^\circ\text{C}$ ,于超声频率为45kHz、超声声强为 $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ 下双频率超声辅助酶解,持续低速搅拌下酶解48小时,沸水浴灭酶,将酶解液于13000r/min高速离心,取上清液,沉淀重复酶解操作3次,收集上清液,冷冻干燥得甲鱼胶原蛋白干品;

[0042] (4) 称取40份冻干的甲鱼胶原蛋白与0.9份枯草杆菌蛋白酶,加入到150份蒸馏水中完全溶解,依次加入0.007份过氧叔丁醇、0.004份甜菊糖,调节pH为8.0,置于 $55^\circ\text{C}$ 恒温水浴锅内,于超声频率为60kHz、超声声强为 $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ 下双频率超声辅助酶解,水解2小时后用沸水浴灭酶20分钟,冷却得酶解液;胶原蛋白独特的三股超螺旋结构,性质十分稳定,一般的加工温度及短时间加热都不能使其分解,从而造成其消化吸收较困难,不易被人体充分利用,甲鱼胶原蛋白分子经水解后主要形成相对分子量较小的多肽、小肽、氨基酸,水解后其吸收利用率可以提高很多,且可以促进食品中的其它蛋白质的吸收;

[0043] (5) 将(4)步的酶解液经脱色、超滤膜除杂、纳滤膜浓缩、冷冻干燥得到甲鱼胶原蛋白肽;超滤膜为截留分子量为3000Da1的超滤膜,纳滤膜为截留分子量为500Da1的纳滤膜。

[0044] 采用考马斯亮蓝法测定甲鱼胶原蛋白的含量为82.5%;采用高效凝胶过滤色谱法测定相对分子质量小于3000道尔顿的甲鱼胶原蛋白肽的含量为96.0%。

[0045] 对比例1:

[0046] 步骤(2)水溶液中不加入3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸和葛根素,其余部分和实施例2完全一致。

[0047] 采用考马斯亮蓝法测定甲鱼胶原蛋白的含量为70.9%;采用高效凝胶过滤色谱法测定相对分子质量小于3000道尔顿的甲鱼胶原蛋白肽的含量为89.8%。

[0048] 由以上的测定结果可知,实施例2的甲鱼胶原蛋白及相对分子质量小于3000道尔顿的甲鱼胶原蛋白肽的含量远高于对比例1,表明3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸和葛根素具有增益效果,能够提高甲鱼胶原蛋白的含量和纯度,进而提高了甲鱼胶原蛋白肽的得

率。

[0049] 本发明的操作步骤中的常规操作为本领域技术人员所熟知,在此不进行赘述。

[0050] 以上所述的实施例对本发明的技术方案进行了详细说明,应理解的是以上所述仅为本发明的具体实施例,并不用于限制本发明,凡在本发明的原则范围内所做的任何修改、补充或类似方式替代等,均应包含在本发明的保护范围之内。