



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114107418 A

(43) 申请公布日 2022.03.01

(21) 申请号 202111474503.9

(22) 申请日 2021.12.03

(71) 申请人 吉林工商学院

地址 130507 吉林省长春市九台经济开发区卡伦湖大街1666号

(72) 发明人 鞠凤霞 殷金龙 候丽丽 边忠博
赵丽艳 张园园

(74) 专利代理机构 北京精金石知识产权代理有限公司 11470

代理人 宋秀兰

(51) Int. Cl.

C12P 21/06 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种人参多肽的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及多肽制备技术领域,具体涉及一种人参多肽的制备方法,所述人参多肽的制备方法,包括如下步骤:(1)将人参粉碎后加入乙醇提取,离心、过滤,得到滤渣A和滤液A;(2)将滤渣A在水中酶解,过滤,得到滤液B;(3)将滤液A和滤液B合并,过HPD-400大孔树脂柱,分别用水、10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱,收集10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱液,干燥后即得。本发明具有收率和纯度高、抗氧化活性高的优点。

1. 一种人参多肽的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - (1) 将人参粉碎后加入乙醇提取,离心、过滤,得到滤渣A和滤液A;
 - (2) 将滤渣A在水中酶解,过滤,得到滤液B;
 - (3) 将滤液A和滤液B合并,过HPD-400大孔树脂柱,分别用水、10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱,收集10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱液,干燥后即得。
2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中加入乙醇至含醇量60-70%;步骤(2)中所述滤渣A与水的质量比为1:8-10。
3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述酶解过程中加入的酶包括风味蛋白酶、菠萝酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶中的至少一种。
4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述酶解过程如下:依次加入风味蛋白酶、菠萝酶和由中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶组成的复合酶。
5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述复合酶中中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为1:2-4:1-2。
6. 根据权利要求4或5所述的制备方法,其特征在于,所述风味蛋白酶的添加量按人参质量计为0.1-0.3%,pH为6-8;所述菠萝酶的添加量按人参质量计为0.05-0.2%,pH为6-8;所述复合酶的添加量按人参质量计为0.1-0.3%,pH为5.5-8。
7. 根据权利要求4或5所述的制备方法,其特征在于,所述风味蛋白酶、菠萝酶和复合酶的酶解温度均为40-60℃,酶解时间均为20-40min。
8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)中将滤液A和滤液B合并,先过D101和AB-8的混合树脂柱,收集流出液,再过HPD-400大孔树脂柱。
9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述D101和AB-8树脂的质量比为1-2:1。
10. 一种权利要求1-9任一所述的制备方法制备得到的人参多肽。

一种人参多肽的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及多肽制备技术领域,具体涉及一种人参多肽的制备方法。

背景技术

[0002] 人参(学名:Panax ginseng C.A.Meyer)是五加科、人参属多年生草本植物。人参的肉质根为强壮滋补药,适用于调整血压、恢复心脏功能、神经衰弱及身体虚弱等症,也有祛痰、健胃、利尿、兴奋等功效。《神农本草经》最早描述了人参的药理作用:主补五脏,安精神,定魂魄,止惊悸,明目,开心益智。人参营养成分主要有氨基酸、蛋白质、糖类、挥发油、核苷酸、黄酮、人参皂苷、有机酸、维生素、甾醇类和无机元素。现代医学研究表明,人参皂苷作为主要活性成分,广泛参与中枢神经系统、应激与性功能以及受体和信号传导功能。

[0003] 近年来研究表明人参蛋白具有多种生物学活性。李霞等人(“人参水溶性蛋白活性研究进展”,中国实用医药,5(27),2010年)报道了人参蛋白增强免疫的作用,如促进某些细胞增殖、抑制肿瘤细胞增殖、抗病毒和抗细菌等功能。徐云凤等人(“人参蛋白对小鼠的耐缺氧及抗氧化作用”,食品科技,37(03),2012年)报道了人参蛋白对小鼠耐缺氧能力具有显著增强作用,对D-半乳糖造模小鼠有一定的抗氧化作用。李红艳等人(“人参蛋白对β淀粉样蛋白1-40和H2O2损伤神经元的保护作用及其机制”,吉林大学学报(医学版),39(06),2013年)报道了人参蛋白神经保护的作用,其作用机制与减少NOS活性、降低NO水平、抑制神经元凋亡有关。

[0004] 在人参蛋白研究基础上,进一步发现人参多肽的生物学作用。王本祥等人(“人参多肽降血糖作用”,药学报,25(6),1990年)报道了人参多肽具有降低正常血糖和肝糖原,但对总血脂无明显影响,对肾上腺、四氧嘧啶及葡萄糖所引起的高血糖均有抑制作用,并能增强肾上腺素对肝糖原的分解的功效。Mara Colzani等人(“The secrets of Oriental panacea:Panax ginseng”,Journal of Proteomics,Volume 130,1January 2016,Pages 150-159)报道了用胃蛋白酶和肠酶连续水解来模拟蛋白质的生理酶促消化,证实了人参蛋白质组中的多种活性肽的生物学活性。李红艳等人(“人参总蛋白的酶解及氨基酸含量测定”,中国现代中药,18(01),2016年)报道了人参蛋白采用胃蛋白酶、胰蛋白酶及双酶(胃蛋白酶与胰蛋白酶联合)酶解后,转变为多肽及少量氨基酸,且氨基酸种类变化不大,含量明显减少。结论是人参蛋白在体内发挥作用的最终活性物质是多肽。

[0005] 多肽通常由10~100个氨基酸分子脱水缩合而成,其分子量介于1.1KDa~11KDa。近期科学家认为人参蛋白主要是以多肽的形式吸收。多肽作为基础营养物质,相比于蛋白质和氨基酸它具有容易吸收和生物利用度高的特点。因此,蛋白的吸收率低成为主要限制因素,单纯通过食物摄取蛋白质的方法,已经不能满足人体对蛋白质的需求。

[0006] 中国专利申请CN108034685A公开了一种人参多肽的制备方法,包括以下步骤:将干燥的人参切片,得到人参片,将人参片放入到加热罐中并在加热罐内加入蒸馏水,人参片与蒸馏水的比例为1:5-10,加热至121℃,并维持1~2小时,得到料液I,所得的料液I冷却至常温,用200目滤布过滤去除残渣,得到料液II,将料液II的pH调整至4.0~9.0,并加入复合

酶,维持温度在50~60℃,持续搅拌,酶解2~6小时,再加热至80~90℃,灭酶5~10分钟;得到料液Ⅲ;所得的料液Ⅲ过滤去除残渣后,再经过膜过滤、浓缩、喷雾干燥,得到人参多肽成品。本发明采用复合酶酶解人参的方法,提取收率在30%左右,酶解纯度高,极大地减少对环境的污染并简化操作工序。虽然该发明采用复合酶的方式,提高了酶解的收率和纯度,但是制备得到的人参多肽的抗氧化活性有待提高。

[0007] 中国专利申请CN109517870A公开了一种双酶分步酶解制备人参多肽的方法,是以人参粉末为原料,经过制备人参蛋白粗提液、制备人参总蛋白、双酶酶解的过程制取人参多肽;所述的双酶酶解,选择酶活力为20U/mg的风味蛋白酶和酶活力为200U/mg的碱性蛋白酶按等量混合酶解4~6h,或按等量分先后用碱性蛋白酶酶解4~6h、风味蛋白酶酶解20h。该发明不必反复调节pH和温度,酶解效果明显,多肽纯度高,收率高损失少;所提取的人参多肽安全性好,但是制备得到的人参多肽的各方面活性有待提高。

[0008] 因此,开发一种能解决上述技术问题的人参多肽的制备方法是非常必要的。

发明内容

[0009] 本发明的目的是克服现有技术的不足而提供一种收率和纯度高、抗氧化活性高的人参多肽的制备方法。

[0010] 本发明是通过以下技术方案予以实现的:

[0011] 一种人参多肽的制备方法,包括如下步骤:

[0012] (1) 将人参粉碎后加入乙醇提取,离心、过滤,得到滤渣A和滤液A;

[0013] (2) 将滤渣A在水中酶解,过滤,得到滤液B;

[0014] (3) 将滤液A和滤液B合并,过HPD-400大孔树脂柱,分别用水、10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱,收集10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱液,干燥后即得。

[0015] 优选地,步骤(1)中加入乙醇至含醇量60-70%。

[0016] 优选地,步骤(1)中提取过程,调节pH=7-9。

[0017] 优选地,步骤(1)的提取温度为30-40℃,提取时间为1-2h。

[0018] 更优选地,步骤(1)包括如下步骤:将人参粉碎后加入乙醇至含醇量60-70%提取,调节pH=7-9,在30-40℃下提取1-2h,离心、过滤,得到滤渣A和滤液A。

[0019] 优选地,步骤(2)中所述滤渣A与水的质量比为1:8-10。

[0020] 优选地,步骤(2)中所述酶解过程中加入的酶包括风味蛋白酶、菠萝酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶中的至少一种。

[0021] 更优选地,步骤(2)中所述酶解过程如下:依次加入风味蛋白酶、菠萝酶和由中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶组成的复合酶。

[0022] 更优选地,所述复合酶中中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为1:2-4:1-2。

[0023] 更优选地,所述风味蛋白酶的添加量按人参质量计为0.1-0.3%,酶解pH为6-8。

[0024] 更优选地,所述菠萝酶的添加量按人参质量计为0.05-0.2%,酶解pH为6-8。

[0025] 更优选地,所述复合酶的添加量按人参质量计为0.1-0.3%,酶解pH为5.5-8。

[0026] 更优选地,所述风味蛋白酶、菠萝酶和复合酶的酶解温度均为40-60℃,酶解时间均为20-40min。

[0027] 更优选地,步骤(2)包括如下步骤:

[0028] 将滤渣A在8-10倍量的水中进行酶解,调节酶解温度为40-60℃,先按人参质量的0.1-0.3%加入风味蛋白酶,调节pH至6-8,酶解20-40min;再按人参质量的0.05-0.2%加入菠萝酶,调节pH至6-8,酶解20-40min;最后按人参质量的0.1-0.3%加入复合酶(中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为1:2-4:1-2),调节pH至5.5-8,酶解20-40min,过滤,得到滤液B。

[0029] 优选地,步骤(3)中将滤液A和滤液B合并,先过D101和AB-8的混合树脂柱,收集流出液,再过HPD-400大孔树脂柱。

[0030] 更优选地,所述D101和AB-8树脂的质量比为1-2:1。

[0031] 更优选地,步骤(3)包括如下步骤:

[0032] 将滤液A和滤液B合并,先过D101和AB-8的混合树脂柱,D101和AB-8树脂的质量比为1-2:1,收集流出液,再过HPD-400大孔树脂柱,分别用水、10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱,收集10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱液,干燥后即得。

[0033] 更优选地,所述人参多肽的制备方法,包括如下步骤:

[0034] (1) 将人参粉碎后加入乙醇至含醇量60-70%提取,调节pH=7-9,在30-40℃下提取1-2h,离心、过滤,得到滤渣A和滤液A;

[0035] (2) 将滤渣A在8-10倍量的水中进行酶解,调节酶解温度为40-60℃,先按人参质量的0.1-0.3%加入风味蛋白酶,调节pH至6-8,酶解20-40min;再按人参质量的0.05-0.2%加入菠萝酶,调节pH至6-8,酶解20-40min;最后按人参质量的0.1-0.3%加入复合酶(中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为1:2-4:1-2),调节pH至5.5-8,酶解20-40min,过滤,得到滤液B;

[0036] (3) 将滤液A和滤液B合并,先过D101和AB-8的混合树脂柱,D101和AB-8树脂的质量比为1-2:1,收集流出液,再过HPD-400大孔树脂柱,分别用水、10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱,收集10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱液,干燥后即得。

[0037] 本发明还涉及上述的制备方法制备得到的人参多肽。

[0038] 本发明的有益效果是:

[0039] 本发明优化了原料人参的处理顺序,先进行醇提,再进行酶解,有利于多肽的提取,并且提取后的杂质较少,抗氧化活性较高。

[0040] 本发明优化了酶解工艺,通过将不同的酶进行复合,并且优化酶解顺序,制备得到的多肽抗氧化活性显著提高。

[0041] 本发明通过采用不同的大孔树脂复合进行吸附,除杂效果好,同时优化树脂类型和洗脱溶剂组成,洗脱得到的组分具有较高的抗氧化活性。

具体实施方式

[0042] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0043] 以下各实施例和对比例中的风味蛋白酶、菠萝酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性

蛋白酶购自南宁东恒华道生物科技有限责任公司,胰蛋白酶购自南宁东恒华道生物科技有限责任公司。

[0044] 实施例1

[0045] 一种人参多肽的制备方法,包括如下步骤:

[0046] (1) 将人参粉碎后加入乙醇至含醇量60%提取,调节pH=7,在30℃下提取1h,离心、过滤,得到滤渣A和滤液A;

[0047] (2) 将滤渣A在8倍量的水中进行酶解,调节酶解温度为40℃,先按人参质量的0.1%加入风味蛋白酶,调节pH至6,酶解40min;再按人参质量的0.05%加入菠萝酶,保持pH为6,酶解40min;最后按人参质量的0.1%加入复合酶(中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为1:2:1),调节pH至5.5,酶解40min,灭酶,过滤,得到滤液B;

[0048] (3) 将滤液A和滤液B合并,先过D101和AB-8的混合树脂柱,D101和AB-8树脂的质量比为1:1,收集流出液,再过HPD-400大孔树脂柱,分别用水、10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱,收集10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱液,浓缩、干燥后即得。

[0049] 实施例2

[0050] 一种人参多肽的制备方法,包括如下步骤:

[0051] (1) 将人参粉碎后加入乙醇至含醇量70%提取,调节pH=9,在40℃下提取2h,离心、过滤,得到滤渣A和滤液A;

[0052] (2) 将滤渣A在10倍量的水中进行酶解,调节酶解温度为60℃,先按人参质量的0.3%加入风味蛋白酶,调节pH至8,酶解20min;再按人参质量的0.2%加入菠萝酶,保持pH为8,酶解20min;最后按人参质量的0.3%加入复合酶(中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为1:4:2),保持pH为8,酶解20min,灭酶,过滤,得到滤液B;

[0053] (3) 将滤液A和滤液B合并,先过D101和AB-8的混合树脂柱,D101和AB-8树脂的质量比为2:1,收集流出液,再过HPD-400大孔树脂柱,分别用水、10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱,收集10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱液,浓缩、干燥后即得。

[0054] 实施例3

[0055] 一种人参多肽的制备方法,包括如下步骤:

[0056] (1) 将人参粉碎后加入乙醇至含醇量65%提取,调节pH=8,在35℃下提取1.5h,离心、过滤,得到滤渣A和滤液A;

[0057] (2) 将滤渣A在9倍量的水中进行酶解,调节酶解温度为50℃,先按人参质量的0.2%加入风味蛋白酶,调节pH至7,酶解30min;再按人参质量的0.1%加入菠萝酶,保持pH为7,酶解35min;最后按人参质量的0.2%加入复合酶(中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为1:3:1.5),调节pH至6.5,酶解25min,灭酶,过滤,得到滤液B;

[0058] (3) 将滤液A和滤液B合并,先过D101和AB-8的混合树脂柱,D101和AB-8树脂的质量比为1.5:1,收集流出液,再过HPD-400大孔树脂柱,分别用水、10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱,收集10%乙醇、20%乙醇和30%乙醇洗脱液,浓缩、干燥后即得。

[0059] 实施例4

[0060] 与实施例3的区别仅在于将步骤(2)中的复合酶替换为等质量的中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的混合酶,两者质量比为1:3,其余条件均相同。

[0061] 实施例5

[0062] 与实施例3的区别仅在于将步骤(2)中的复合酶替换为等质量的胰蛋白酶,其余条件均相同。

[0063] 实施例6

[0064] 与实施例3的区别仅在于步骤(3)中不过D101和AB-8的混合树脂柱,将滤液A和滤液B合并后直接过HPD-400大孔树脂柱,其余条件均相同。

[0065] 对比例1

[0066] 与实施例3的区别仅在于将步骤(2)复合酶中的木瓜蛋白酶替换为等质量的碱性蛋白酶,其余条件均相同。

[0067] 对比例2

[0068] 与实施例3的区别仅在于步骤(2)的酶解顺序不同,其余条件均相同,具体如下:

[0069] 将滤渣A在9倍量的水中进行酶解,调节酶解温度为50℃,先按人参质量的0.2%加入复合酶(中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶的质量比为1:3:1.5),调节pH至6.5,酶解25min;再按人参质量的0.1%加入菠萝酶,调节pH为7,酶解35min;最后按人参质量的0.2%加入风味蛋白酶,调节pH至7,酶解30min,灭酶,过滤,得到滤液B。

[0070] 对比例3

[0071] 与实施例3的区别仅在于步骤(3)中AB-8树脂替换为等质量的DA-201树脂,其余条件均相同。

[0072] 对比例4

[0073] 与实施例3的区别仅在于步骤(3)中将20%乙醇和30%乙醇洗脱液均替换为10%乙醇,即采用10%乙醇洗脱三次,其余条件均相同。

[0074] 测试例1

[0075] 人参多肽的纯度测试,结果如表1所示。

[0076] 表1

| [0077] | 纯度(%) |
|--------|-------|
| 实施例1 | 85.3 |
| 实施例2 | 86.8 |
| 实施例3 | 87.2 |
| 实施例6 | 73.1 |
| 对比例3 | 80.5 |

[0078] 测试例2抗氧化测试

[0079] DPPH自由基清除率测试:

[0080] 将实施例1-6和对比例1-4的人参多肽分别配制成6mg/mL的样品溶液,用无水乙醇配制0.04mg/mL的DPPH溶液,分别取2mL不同浓度的样品溶液加入2mL DPPH溶液,混合均匀后室温静置1小时,5000r/min速度下离心15分钟得到上清液,将上清液在517nm处测定吸光值,按照下式计算出各样品溶液对DPPH自由基清除率:

[0081] $\text{DPPH自由基清除率} = (A_0 - A_1 + A_2) / A_0 \times 100\%$ 。

[0082] A₀为2mL无水乙醇+2mL DPPH溶液的吸光值;A₁为2mL样品溶液+2mLDPPH溶液的吸光值;A₂为2mL无水乙醇+样品溶液的吸光值。

[0083] 超氧阴离子自由基清除率测试:

[0084] 将实施例1-6和对比例1-4的人参多肽分别配制成6mg/mL的样品溶液。将0.05mol/L pH=8.2的Tris-HCl缓冲液5mL,于25℃水浴锅中预热20min,再加入1mL样品溶液和0.4mL 25mmol/L的邻苯三酚溶液,混匀后,于25℃水浴中反应5min,加入10mol/L的HCl 1mL终止反应。以Tris-HCl缓冲液作参比,在299nm处测吸光度值。空白对照用相同体积的水来替代样品。按照下式计算自由基清除率。

[0085] 超氧阴离子自由基清除率(%) = [1 - (样品吸光度值/空白对照吸光度值)] × 100%。

[0086] 以上结果如表2所示。

[0087] 表2

| | DPPH 自由基清除率 (%) | 超氧阴离子自由基清 除率 (%) |
|--------------|--------------------|---------------------|
| 实施例 1 | 84.1 | 93.6 |
| 实施例 2 | 84.7 | 94.2 |
| 实施例 3 | 86.5 | 95.8 |
| [0088] 实施例 4 | 78.4 | 86.7 |
| 实施例 5 | 76.8 | 87.9 |
| 实施例 6 | 72.3 | 80.5 |
| 对比例 1 | 74.6 | 83.7 |
| 对比例 2 | 77.9 | 85.2 |
| 对比例 3 | 79.5 | 87.4 |
| [0089] 对比例 4 | 73.6 | 83.1 |

[0090] 上述详细说明是针对本发明其中之一可行实施例的具体说明,该实施例并非用以限制本发明的专利范围,凡未脱离本发明所为的等效实施或变更,均应包含于本发明技术方案的范围之内。