



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103239705 A

(43) 申请公布日 2013.08.14

(21) 申请号 201310175112.6

A61K 31/7008(2006.01)

(22) 申请日 2013.05.10

A61K 31/737(2006.01)

(71) 申请人 汪华东

地址 510000 广东省广州市越秀区寺右一马路 18 号泰恒大厦 2209

(72) 发明人 汪华东

(74) 专利代理机构 广州市越秀区海心联合专利代理事务所(普通合伙)
44295

代理人 黄为 蔡国

(51) Int. Cl.

A61K 38/01(2006.01)

C12P 21/06(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

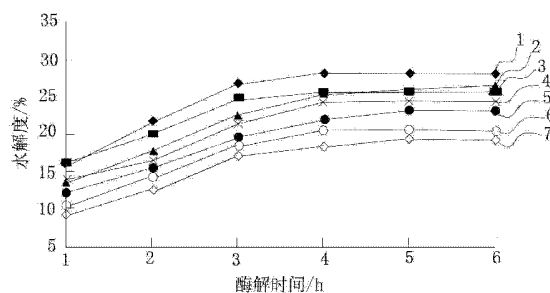
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物及其制备方法,旨在提供一种对关节炎等骨关节疾病治疗方面具有良好的疗效的组合物,其技术要点是:该组合包括下述质量百分比的原料:鳄鱼胶原蛋白抗菌肽 1-90%, D-氨基葡萄糖 1-50%,硫酸软骨素 1-50%,各组份之和为 100%;其制备方法是:称取鳄鱼胶原蛋白抗菌肽, D-氨基葡萄糖,硫酸软骨素,麦芽糊精和粘合剂; 2) 将步骤 1) 称取的鳄鱼胶原蛋白抗菌肽和 D-氨基葡萄糖多肽通过传统的喷雾方法制成细小颗粒,然后和硫酸软骨素颗粒混合在一起,充分的搅拌,再添加的麦芽糊精和粘合剂;属于生物医药技术领域。



1. 一种鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物,其特征在于,该组合包括下述质量百分比的原料:鳄鱼胶原蛋白抗菌肽 1 90%,D-氨基葡萄糖 1 50%,硫酸软骨素 1 50%,各组分之和为 100%。

2. 根据权利要求 1 所述的鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物,其特征在于,该组合物包括下述质量百分比的原料:鳄鱼胶原蛋白抗菌肽 10 80%,D-氨基葡萄糖 5 40%,硫酸软骨素 5 40%,各组分之和为 100%。

3. 根据权利要求 1 所述的鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物,其特征在于,该组合物包括下述质量百分比的原料:鳄鱼胶原蛋白抗菌肽 25 65%,D-氨基葡萄糖 10 30%,硫酸软骨素 10 30,各组分之和为 100%。

4. 权利要求 1 所述的鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物制备方法,其特征在于,该制备方法依次包括下述步骤:

1)称取鳄鱼骨,磨碎,按质量比 1:1 加入水,煮沸后保持 15min 后置于 4℃冷却,将冷却后凝固于上层的油脂去除,制备骨泥;

2)将骨泥与蒸馏水按 1:1 的质量比装入烧瓶中,置于恒温水浴中进行酶解 1-5h;

3)酶解结束后,在 80℃水浴中保温 20min 使酶失活;

4)将灭酶后的酶解液冷却至室温,去除未水解的骨粒,然后在 4℃、10000r/min 离心分离 15min,除去固体物质,收集上清液,利用真空冷冻干燥机冻干成粉末备用。

5. 据权利要求 4 所述的鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物制备方法,其特征在于,步骤 2)所述的酶解时采用的酶为复合动物蛋白酶或者风味蛋白酶或者碱性蛋白酶或者木瓜蛋白酶或者胃蛋白酶或者中性蛋白酶或者胰蛋白酶的其中之一。

6. 根据权利要求 4 所述的鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物制备方法,其特征在于,步骤 2)所述的酶解时温度为 37-60/℃。

7. 根据权利要求 4 所述的鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物制备方法,其特征在于,步骤 2)所述的酶解时要不断加入酸碱以维持溶液的 pH 值在 3-8 之间。

8. 根据权利要求 4 所述的鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物制备方法,其特征在于,步骤 2)所述的酶解酶与骨泥的质量比为:1:0.005-0.01。

一种鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物,本发明还涉及该组合物的制备方法,属于生物医药技术领域。

背景技术

[0002] 胶原蛋白主要存在于动物的骨、软骨、皮肤和肌腱组织中,约占哺乳动物自身所含蛋白质总量的 25% ~ 35%,发挥着支架作用和保护作用。胶原多肽是胶原蛋白的酶解产物,分子质量要比胶原蛋白低得多,其肽链已经断开,可被人体直接吸收利用。

[0003] 目前,大量的研究表明,利用蛋白酶水解畜骨得到的水解产物胶原多肽具有多种生物活性功能,例如降血压、抗氧化、预防和治疗关节炎和抗衰老等。

[0004] 抗菌肽是参与固有免疫的、具有广谱高效抗菌活性的物质,在动植物体内大量存在,具有抗菌性强、安全无毒、水溶性好、热稳定性好、作用范围广等优点,同时还具有保健作用。

[0005] 鳄鱼与恐龙同时代,是地球上最古老的动物之一,有“活化石”之称。鳄鱼同时还是地球上寿命最长的动物之一,寿命高达两百多岁,比龟和鳖还长。此外,鳄鱼还是地球上体形最大的动物,目前在非洲发现最大的鳄鱼体长有 12 米,重量高达 8 吨。如此庞大的身体必然需要超强的骨骼才能支撑。研究发现,鳄鱼的骨骼硬度比牛骨要硬十倍,加工时常常需要采用德国进口的特质合金钢。

[0006] 研究发现,鳄骨粉中含有大量的活性钙和磷以及丰富的胶原蛋白等,亦可用于预防和治疗老年骨质疏松、婴幼儿缺钙等。同时,鳄鱼尾胶含有丰富的胶质,能有效的防治骨质疏松,并有润肤养颜的功效。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种可以改善人体骨关节的生物制品及其制备该组合物的方法。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明提供的前一技术方案是这样的:该鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物,包括下述质量百分比的原料:鳄鱼胶原蛋白抗菌肽 1 ~ 90%,D- 氨基葡萄糖 1 ~ 50%,硫酸软骨素 1 ~ 50%,各组分之和为 100%。

[0009] 优选的,所述的鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物,该组合物包括下述质量百分比的原料:鳄鱼胶原蛋白抗菌肽 10 ~ 80%,D- 氨基葡萄糖 5 ~ 40%,硫酸软骨素 5 ~ 40%,各组分之和为 100%。

[0010] 更优的,所述的鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物,该组合物包括下述质量百分比的原料:鳄鱼胶原蛋白抗菌肽 25 ~ 65%,D- 氨基葡萄糖 10 ~ 30%,硫酸软骨素 10 ~ 30,各组分之和为 100%。

[0011] 本发明提供的后一技术方案是这样的:该鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物制备方法,依次包括下述步骤:1)称取鳄鱼骨,磨碎,按质量比 1:1 加入水,煮沸后保持 15min 后置

于 4℃冷却,将冷却后凝固于上层的油脂去除,制备骨泥;2)将骨泥与蒸馏水按 1:1 的质量比装入烧瓶中,置于恒温水浴中进行酶解 1-5h;3)酶解结束后,在 80℃水浴中保温 20min 使酶失活;4)将灭酶后的酶解液冷却至室温,去除未水解的骨粒,然后在 4℃、10000r/min 离心分离 15min,除去固体物质,收集上清液,利用真空冷冻干燥机冻干成粉末备用。

[0012] 上述的鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物的制备方法,其特征在于,步骤 2)所述的酶解时采用的酶为复合动物蛋白酶或者风味蛋白酶或者碱性蛋白酶或者木瓜蛋白酶或者胃蛋白酶或者中性蛋白酶或者胰蛋白酶的其中之一;步骤 2)所述的酶解时温度为 37-60/℃;步骤 2)所述的酶解时要不断加入酸碱以维持溶液的 pH 值在 3-8 之间;步骤 2)所述的酶解酶与骨泥的质量比为:1:0.005-0.01。

[0013] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:发明将鳄鱼骨骼中的胶原蛋白提取出来,在改善关节炎等骨关节疾病治疗方面具有良好的疗效,为骨关节疾病的治疗提供了新途径。

附图说明

[0014] 图 1 是 7 种酶不同处理时间下的水解度变化趋势;

[0015] 图 2 是不同酶添加量对水解度的影响。

[0016] 其中:动物复合蛋白酶 1;风味蛋白酶 2;胰蛋白酶 3;碱性蛋白酶 4;中性蛋白酶 5;胃蛋白酶 6;木瓜蛋白酶 7。

具体实施方案

[0017] 以下将结合具体实施方式,对本发明的权利要求作进一步详细说明,但不构成对本发明的任何限制,任何人在本发明权利要求范围内做所的有限次的修改,仍在本发明的权利要求保护范围内。

[0018] 实施例 1

[0019] 本发明的一种鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物,包括下述原料:鳄鱼胶原蛋白抗菌肽 1g, D-氨基葡萄糖 49g,硫酸软骨素 50g。

[0020] 实施例 2

[0021] 本发明的一种鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物,包括下述原料:鳄鱼胶原蛋白抗菌肽 90g, D-氨基葡萄糖 5g,硫酸软骨素 5g。

[0022] 实施例 3

[0023] 本发明的一种鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物,包括下述原料:鳄鱼胶原蛋白抗菌肽 50g, D-氨基葡萄糖 20g,硫酸软骨素 30g。

[0024] 实施例 4

[0025] 本发明的一种鳄鱼胶原蛋白抗菌肽的组合物,包括下述原料:鳄鱼胶原蛋白抗菌肽 1g, D-氨基葡萄糖 49g,硫酸软骨素 50g。

[0026] 实施例 5

[0027] 1 材料与方法

[0028] 1.1 材料与试剂

[0029] 鳄鱼骨由广西钦州华宏特种水产养殖开发有限公司吴川分公司提供。

[0030] 胃蛋白酶 (8.6×10 U/g)、胰蛋白酶 05.2×10 U/g)、木瓜蛋白酶 (2.5×104U/g)、琼脂 国药集团化学试剂有限公司 ;碱性蛋白酶 (9.2×104U/g)、中性蛋白酶 (6.2×10 U/g)、风味蛋白酶 (4.2×10 U/g)、动物复合蛋白酶 (8.9×10 U/g) 诺维信 (中国) 投资有限公司 ;金黄色葡萄球菌和肠炎沙门氏菌 中国食品发酵工业研究院 ;营养肉汤培养基和脑心浸液培养基 北京陆桥技术有限责任公司。

[0031] 1.2 仪器与设备

[0032] 恒温培养箱(日本三洋公司);骨粉碎机(河北廊坊惠友机械公司);LGJ-30 真空冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司);牛津杯(河南新乡市新华检测仪器厂);电热恒温水浴锅(北京市医疗设备厂);二级生物安全柜(新加坡艺思高科技有限公司)。

[0033] 1.3 方法

[0034] 1.3.1 鳄鱼骨胶原蛋白酶解

[0035] 称取 200g 鳄鱼骨,进行修整、清洗并破碎成小的颗粒状,大小约为 2mm,加入等质量的清水,煮沸后维持 15min,之后置 4℃环境下冷却,将冷却后凝固于上层的油脂去除,反复两次,获得实验用骨泥。然后将骨泥 200g 加入至蒸馏水中,置于恒温水浴中进行酶解。采用 7 种蛋白酶(复合动物蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶)酶解。各蛋白酶酶解鳄鱼骨所采用的 pH 值和温度条件如表 1 所示,酶解所用的骨水质量比例为 1:1。反应过程中要不断加入酸碱以维持溶液的 pH 值。酶解结束后,在 80℃水浴中保温 20min 使酶失活。

[0036] 表 1 各蛋白酶酶解鳄鱼骨的 pH 值和温度条件

[0037]

酶种类	pH	温度 /℃
动物复合蛋白酶	7.0	55
风味蛋白酶	7.4	50
碱性蛋白酶	8.5	60
中性蛋白酶	7.0	50
胃蛋白酶	3.0	37
木瓜蛋白酶	7.0	50
胰蛋白酶	8.0	37

[0038] 1.3.2 各蛋白酶酶解时间的确定

[0039] 在骨水质量比为 1:1,所用酶用量(占骨质量的百分比)为 0.5% 的条件下,确定 7 种蛋白酶的最佳酶解时间。

[0040] 1.3.3 各蛋白酶酶用量的确定

[0041] 在骨水质量比为 1:1 和各蛋白酶的酶解时间为 4h 的条件下,比较酶用量(占骨的百分比)为 0.50%、0.75%、1.00%、1.25%、1.50% 时的水解度,确定 7 种酶酶解鳄鱼骨胶原蛋白

所用的最佳酶用量。

[0042] 1.3.4 分离干燥

[0043] 将灭酶后的酶解液冷却至室温,去除未水解的骨粒,然后在 4℃、10000r/min 离心分离 15min,除去固体物质,收集上清液,利用真空冷冻干燥机冻干成粉末备用。

[0044] 1-3.5 蛋白质含量测定方法

[0045] 采用 GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》凯氏定氮法。

[0046] 1.3.6 氨基酸态氮的测定

[0047] 移取 5g 酶解上清液两份,分别置于 250mL 锥形瓶中,加水 40mL;其中一份加 3 滴中性红指示剂,用 0.100mol/L NaOH 溶液滴定至琥珀色为终点,此时消耗 NaOH 溶液的体积记为 V1。另一份加入中性甲醛 10mL 及 3 滴百里酚酞指示剂,摇匀,静置 1 min。再用 0.100mol/L NaOH 溶液滴定至淡蓝色,消耗 NaOH 溶液体积记为 V2。

[0048] 滴定完成后用公式 (1) 计算。

[0049] 氨基酸态氮含量 /% = $(V_2 - V_1) \times N \times 0.014 \times 100 / m(1)$

[0050] 式中 :N 为 NaOH 标准溶液当量浓度 ;m 为样品溶液相当样品的质量, g。

[0051] 1.3.7 水解度的测定

[0052] 水解度 (DH) 作为筛选酶解液的一个指标,用公式 (2) 计算 DH。

[0053] $DH / \% = \text{酶解液中游离氨基酸态含量} \times 100 / \text{酶解液中总氮含量} \quad (2)$

[0054] 1-3.8 菌悬液的制备

[0055] 将保存的菌种接种到营养肉汤琼脂培养基中,在 37℃ 条件下培养 24h,连续活化两次,将活化后的菌种用生理盐水逐次稀释到 10^{-5} ,制备成菌悬液。

[0056] 1.3.9 抑菌活性的测定

[0057] 采用牛津杯法测定酶解液的抑菌活性。将培养基倒入平皿中,吸取 0.1mL 菌悬液加入到平板中,涂布均匀。每个平板放 3 个牛津杯。将溶解后的酶解液用 0.45um 的滤膜过滤除菌,然后在每个牛津杯中加入 1.50um 适宜浓度的酶解液,另设空白对照。放入 37℃ 培养箱,24h 后测定抑菌圈的大小。每组实验均重复 3 次。

[0058] 2 结果与分析

[0059] 2.1 各蛋白酶酶解鳄鱼骨的最佳酶解时间的确定

[0060] 由图 1 可知,在 7 种酶的作用下,随着时间的延长,水解度基本上都呈现出一个先上升后趋于平稳的趋势,其原因可能是随着水解时间的延长,一方面酶作用的底物胶原蛋白的含量减少,另一方面是酶的活力下降。在骨水质量比为 1:1,所用酶用量(占骨质量的百分比)为 0.50% 的条件下,动物复合蛋白酶、胃蛋白酶和碱性蛋白酶具有较高的水解度。动物复合蛋白酶、胃蛋白酶、风味蛋白酶和胰蛋白酶的水解度 4h 后基本上不再增加,确定 4h 为这 4 种酶的最佳水解时间;碱性蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解度在 5h 后基本上不再增加,因此确定 5h 为这 3 种酶的最佳水解时间。

[0061] 2.2 各蛋白酶用量的确定

[0062] 由图 2 可知,在底物浓度一定,酶的添加量不能饱和底物时,随着酶添加量的增加,水解度逐渐增加;酶的添加量饱和底物后,随着酶的添加量增加,水解度基本上不再变化。在相同的底物浓度和水解时间下,动物复合蛋白酶具有最高的水解度,胃蛋白酶次之。动物复合蛋白酶、胃蛋白酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶在添加量为 1.25% 之后,水解度

变化趋于平稳,确定 1.25% 为这 4 种酶的最佳添加量;碱性蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶在添加量为 1.00% 之后,水解度变化趋于平稳,因此确定 1.00% 为这 3 种酶的最佳添加量。

[0063] 通过图 1、2 的比较,可以看出,在相同的水解条件下,动物复合蛋白酶具有最高的水解度,胃蛋白酶和碱性蛋白酶的水解度也较高,而中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解度偏低。

[0064] 2.3 不同酶解液的抑菌肽的抑菌效果

[0065] 在 7 种酶最适的酶解时间和添加量下对鳄鱼骨胶原蛋白进行水解,水解液经离心过滤,并冷冻干燥后,测定其对金黄色葡萄球菌和肠炎沙门氏菌的抑菌效果。不同蛋白酶酶解得到的多肽的抑菌活性实验结果见表 2。

[0066] 表 2 各种蛋白酶的酶解度对两种菌的抑菌活性大小

[0067]	酶解液种类	对金黄色葡萄球菌的 抑菌圈直径/mm	肠炎沙门氏菌的抑 菌圈直径/mm
	动物复合蛋白酶	无	8.67±0.47
	风味蛋白酶	6.03±0.21	9.10±0.63
	碱性蛋白酶	无	无
	中性蛋白酶	6.03±0.21	无
	胃蛋白酶	无	无
	木瓜蛋白酶	无	无
	胰蛋白酶	无	9.03±0.38

[0068] 由表 2 可知,风味蛋白酶和中性蛋白酶的酶解液对金黄色葡萄球菌具有抑菌效果,其抑菌圈直径分别为 6.03mm 和 7.97mm;动物复合蛋白酶、风味蛋白酶和胰蛋白酶对肠炎沙门氏菌具有抑菌效果,其抑菌圈直径分别为 8.67、9.10、9.03mm,可见,风味蛋白酶的酶解液对此菌具有最高的抑菌活性。

[0069] 关于抗菌肽的抑菌机理,一般认为是抗菌肽会破坏细菌的细胞膜或是细胞壁,造成细胞中内容物的溢出而使细菌死亡^[m]。本研究使用的金黄色葡萄球菌属于革兰氏阳性细菌,肠炎沙门氏菌属于革兰氏阴性细菌,因此,可以判断,动物复合蛋白酶和胰蛋白酶水解鳄鱼骨胶原蛋白得到的抑菌肽可能只对革兰氏阴性细菌起作用;中性蛋白酶水解鳄鱼骨胶原蛋白得到的抑菌肽可能只对革兰氏阳性细菌起作用;而风味蛋白酶得到的抑菌肽可能对革兰氏阳性细菌和阴性细菌都起作用。

[0070] 3 结论

[0071] 本研究采用生物酶解方式来获得抗菌肽,在酶的最适温度和 pH 值,骨水质量比为 1:1 的条件下,采用动物复合蛋白酶进行酶解,得到的酶解液的水解度最高,最佳的酶解时间为 4h,最适宜的酶添加量(占骨质量的百分比)为 1.25%。中性蛋白酶解鳄鱼骨胶原蛋白得到的酶解液对金黄色葡萄球菌具有最高的抑菌活性,风味蛋白酶酶解鳄鱼骨胶原蛋白

得到的酶解液对肠炎沙门氏菌具有最高的抑菌活性。

[0072] 本研究为天然保鲜剂的开发提供了理论参考,并且为今后胶原蛋白源抗菌肽的抑菌谱实验、分离纯化以及结构分析提供了可靠的依据。

[0073] D-氨基葡萄糖:

[0074] 最新医学研究发现,人体内缺乏氨糖会直接导致各种骨关节疾病的发生,而氨糖流失的过程在人们 35 岁左右就已经开始了。氨糖不仅控制着人体骨关节的健康,还控制着关节软骨滑膜的代谢平衡。氨糖能为人体大量催生和补充关节滑液,从而不断润滑关节软骨面,减少磨损,使关节部位灵活自如。补充足量的关节滑液,也为关节软骨提供了,足够的物质载体。氨糖通过强烈的刺激软骨细胞,合成人体中的胶原蛋白和透明质酸,不断修复已被磨损的关节软骨,并能够生成新的关节软骨和滑膜,从而恢复关节部位的正常生理功能和无能无力功能。同时,对于长期服用消炎镇痛类药物而造成的关节软骨细胞的损伤,也具有很好的修复作用。氨糖是关节腔内的“清道夫”,不仅能抑制非特异性因子的炎性反应,解除疼痛,而且能消除关节腔内有害酶类,提高关节和机体的免疫力。通过补充氨糖带来免疫力的提高,是消除关节炎症的重要前提。原料可以从青岛绿萃生物科技有限公司、浙江澳兴生物科技有限公司等国内众多公司采购。

[0075] 硫酸软骨素:

[0076] 硫酸软骨素是糖胺聚糖的一种,由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基半乳糖以 β -1,4-糖苷键连接而成的重复二糖单位组成的多糖,并在 N-乙酰氨基半乳糖的 C-4 位或 C-6 位羟基上发生硫酸酯化。

[0077] 硫酸软骨素是提取于动物软骨的黏多糖类物质,在心血管疾病、关节病的防治等方面具有重要的作用;硫酸软骨素同时对骨骼起到保护作用,可以预防骨骼变硬变脆,防止钙化加剧,使得僵硬的骨骼恢复柔韧性,对骨质增生的恢复有较大帮助,一定范围的缩小变硬变脆呈现扩张状态的骨骼轮廓。

[0078] 作为健康食品应用,在美国已经风行多年。经过多年的应用,已经证明硫酸软骨素对改善老年退行性关节炎、风湿性关节炎有一定的效果,因此市场仍呈快速上升的势头。仅在美国的销量每年就可达 600 吨左右。

[0079] 中国是硫酸软骨素最大原料生产国,国内山东、河北为最大的集散地。原料可以从嘉兴恒杰生物、河北三鑫集团、烟台东诚生化、青岛绿萃生物、青岛九龙生物、中化(青岛)实业等公司采购。

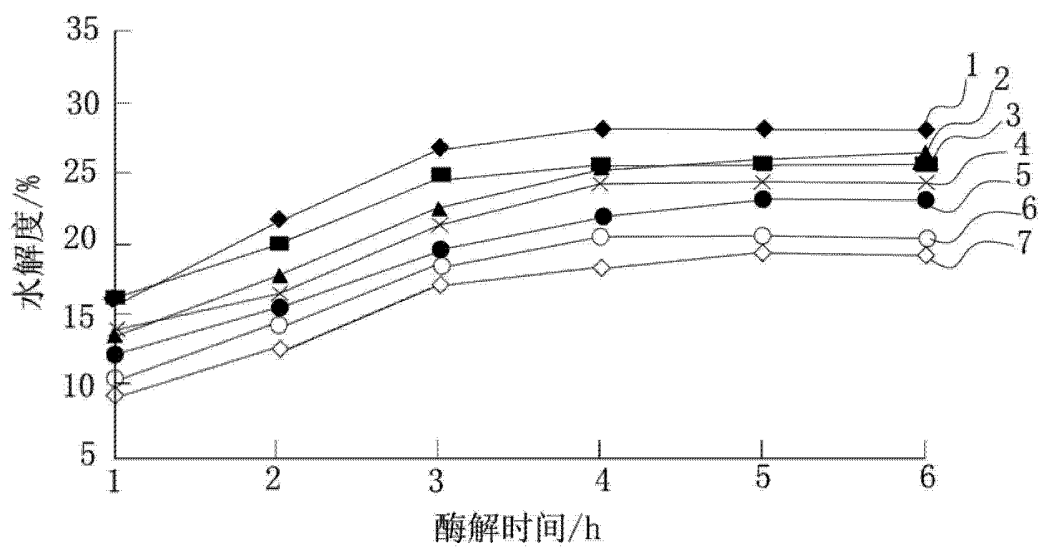


图 1

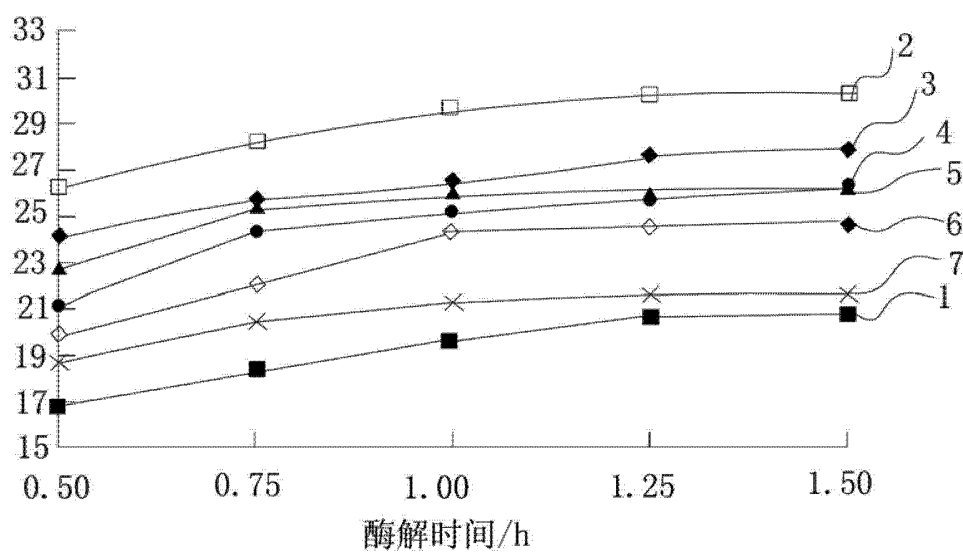


图 2