

# T/GXAQ

## 广西质量协会团体标准

T/GXAQ 001 —2024

### 玉足海参低聚肽生产规程

Production procedure of oligopeptide from *Holothuria leucospilota*

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2025.03.21）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2024-XX-XX 发布

2024-XX-XX 实施

广西质量协会 发布

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西医科大学提出。

本文件由广西质量协会归口。

本文件起草单位：广西医科大学、桂林医学院、北海黑珍珠海洋生物科技有限公司。

本文件主要起草人：黄照权、卢覃培、郭宏伟、陈健、苏志恒、毛鑫、齐广莹、李应坤、叶雨、宋方茗、冯超

# 玉足海参低聚肽生产规程

## 1 范围

本文件规定了玉足海参来源低聚肽酶解工艺的设备、原料、工艺以及质量等方面技术要求。

本文件适用于以玉足海参(*Holothuria leucospilota*)为原料生产分子质量小于2000道尔顿(Da)的低聚肽(短肽)为主要成分的酶解法工艺控制。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 31645 胶原蛋白肽

GB/T 22729 海洋鱼低聚肽粉

NY/T 1514 绿色食品 海参及制品

NY/T 391 绿色食品 产地环境质量标准

GB/T 23527.1 酶制剂质量要求 第1部分:蛋白酶制剂

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 玉足海参

为来源于海参科海参属的一种海参,拉丁名为*Holothuria leucospilota* (Brandt, 1835)。

### 3.2 玉足海参低聚肽

以玉足海参(*Holothuria leucospilota*)为原料,用酶解法生产的、分子质量小于2000道尔顿(Da)的低聚肽为主要成分的粉末状产品。

### 3.3 酶解工艺

在一定适宜条件下,利用蛋白酶水解蛋白质作用,将蛋白质分子量降低的工艺。

## 4 要求

### 4.1 原料要求

4.1.1 海参应符合NY/T 1514 的规定。国内天然捕捞海参应来源于无污染的海域,养殖海参的产地环境应符合NY/T 391 的要求;进口海参应具有进口检验检疫证明。

4.1.2 所使用蛋白酶等酶制剂应符合GB/T 23527.1 的规定。

4.1.3 所使用纯化水应符合《中华人民共和国药典》(2020 年版)的规定。

### 4.2 设备要求

4.2.1 酶解反应釜具有混合、加热、保温功能,且具备清洗和消毒条件。

4.2.2 干燥设备应根据原料、半成品特性和产品要求选择,包括真空冷冻干燥设备等。

4.2.3 离心设备应根据产品要求选择,包括管式离心机、卧式螺旋离心机等。

5 原料

5.1 酶解原料

酶解原料主要为经过预处理后，去除内脏的玉足海参体壁。

5.2 酶制剂

酶制剂以碱性蛋白酶进行选择，产品规格要求酶活力不低于20万U/g。

6 酶解工艺

6.1 工艺

玉足海参低聚肽酶解工艺流程见图1。



图1 玉足海参低聚肽酶解工艺流程

6.2 预处理

采集玉足海参后尽快用热水进行氽烫处理，并分离体壁和内脏，体壁放入-80冰箱保存，备用。

6.3 匀浆

将玉足海参体壁粉碎后和纯化水进行混合，按1: 10~1: 11的固液比（g/mL），得到9%~10%质量浓度的海参匀浆。

6.4 酶解

蛋白酶酶解温度应控制在60℃~70℃之间，pH值控制在9.0~10.0，酶解时间为2h~4h。

6.5 灭酶

酶解结束后，要对酶解物料进行灭酶处理，灭酶温度≥95℃，灭酶时间10min~15min。

6.6 过滤

采用筛网除去酶解物料中固形物。

6.7 脱色脱腥

对过滤后酶解液，加入0.2%~0.4%质量分数的粉末活性炭，温度控制在40℃~60℃之间，最宜脱色脱腥时间控制在60min左右。

6.8 离心分离

对脱色酶解液采用离心机3500~4000r/min，离心10~15min，除去大部分活性炭后，再使用高速离心机8000r/min，离心15~20min，提取离心后上清液。

6.9 浓缩干燥

浓缩后的脱色样品放入真空冷冻干燥机中干燥，最终控制水分≤12%。

## 7 质量要求

### 7.1 酶解指标及其检测方法

#### 7.1.1 多肽得率

低聚肽含量按GB/T 22729的规定执行，酶解过程多肽得率不得少于40%（以干基计）。

#### 7.1.2 低聚肽分子量范围

低聚肽分子量范围按GB 31645的规定执行，<2000 Da分子量肽段分布不得小于90%。

### 7.2 脱色脱腥指标及其检测方法

#### 7.2.1 脱色率

脱色率按附录A的规范执行，活性炭的脱色率不得小于30%

#### 7.2.2 肽回收率

脱色率按附录A的规范执行，肽回收率不得小于70%。

#### 7.2.3 腥味指标

产品不得出现刺鼻性气味。

## 附录A (规范性)

### 玉足海参低聚肽粉末活性炭脱色脱腥工艺中脱色率/肽回收率的测定方法 紫外分光光度法

#### A.1 范围

本部分规定了玉足海参低聚肽粉末活性炭脱色脱腥工艺中脱色率/肽回收率的紫外分光光度计测定方法。

本部分适用于玉足海参低聚肽粉末活性炭脱色脱腥工艺中脱色率/肽回收率的测定。

#### A.2 原理

本法预先采用紫外分光光度计在200-800 nm波长范围扫描脱色前酶解物料和脱色后酶解物料，在最大吸收波长460 nm处，测得OD值，计算脱色率。

本法用 10%TCA 除去脱色前酶解物料和脱色后酶解物料中的酸不溶性高分子质量蛋白，依据玉足海参低聚肽分子中含有的两个以上肽键在碱性溶液中与  $\text{Cu}^{2+}$  形成紫红色络合物，在一定范围内其颜色深浅与肽键浓度呈正比，以低聚肽对照品溶液作标准曲线，再乘以对应的稀释倍数即可采用紫外分光光度测定粉末活性炭脱色前后酶解物料中低聚肽的含量，即可得到脱色后的肽回收率。本法测定范围通常为 1~10mg。

#### A.3 试剂和材料

1、双缩脲试液

2、低聚肽对照品溶液

3、5%、10% TCA

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

#### A.4 试剂配制

双缩脲试液的配制 取硫酸铜 1.5 g、酒石酸钾钠 6.0 g，加水 500 ml 使溶解，边搅拌边加入 10%氢氧化钠溶液 300 ml，用水稀释至 1000 ml，混匀，即得。

低聚肽对照品溶液的配制 除另有规定外，取甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸对照品或其他纯度符合要求的多肽标准品，加水溶解并制成每 1ml 中含 10 mg 的溶液，再用水不断稀释至不同浓度。

#### A.5 仪器和设备

紫外可见分光光度计 Gary 3500

分析天平

#### A.6 样品检测步骤

## 1、脱色率

取脱色前酶解物料上清液和脱色后酶解物料上清液 5 mL 试管各 3 支，以蒸馏水为空白校正，之后用紫外可见分光光度计 Gary 3500 在 460 nm 波长，光径长度为 1cm 的比色皿中测定其吸光度，脱色前酶解物料上清液的吸光度为  $OD_0$ ，脱色后酶解物料上清液的吸光度为  $OD_1$ ，计算脱色率。

脱色率可按式（1）计算：

$$\text{脱色率}\% = (OD_0 - OD_1) / OD_0 * 100 \quad \text{式（1）}$$

## 2、肽回收率

### 2.1 标准曲线绘制

以甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸为标准品，采用双缩脲法制作标曲，称取对照品配成 10 mg/mL，精密量取对照品溶液 0 ml、0.1ml、0.15 ml、0.2ml、0.25 ml、0.3 ml、0.35 ml、0.4ml、0.45ml、0.5ml，分别置具塞试管中，各加水至 1.0 ml，再分别加入双缩脲试液 4.0ml，立即混匀，室温放置 30 分钟，照紫外-可见分光光度法，在 540 nm 的波长处测定吸光度；同时以 0 号管作为空白。以对照品溶液浓度与其相对应的吸光度值计算线性回归方程。

### 2.2 多肽含量测定

取脱色前酶解物料上清液和脱色后酶解物料上清液 5 mL 试管各 3 支，加入等体积的 10%TCA，摇匀放置 10 分钟，4℃ 4000 r/min 离心 20 min，得上清。取 1mL 上清液至试管，加入双缩脲试剂 4 mL，摇匀放置 30 分钟，2000 r/min 离心 10 分钟，取上清液用双缩脲法在 540nm 处测多肽浓度，以 5%TCA 加双缩脲试剂为空白，平行测定 3 次。通过标准曲线计算酶解液中多肽浓度(mg/mL)，再乘相应得稀释倍数，三次平行实验测定多肽含量。

### 2.3 肽回收率计算

用 2.2 多肽含量测定中测得脱色前酶解物料上清液和脱色后酶解物料上清液中多肽含量计算肽回收率。脱色前酶解物料上清液中多肽含量为  $A_1$ ，脱色后酶解物料上清液中多肽含量为  $A_2$ 。计算肽回收率。

肽回收率可按式（2）计算：

$$\text{肽回收率}(\%) = A_2 / A_1 * 100 \quad \text{式（2）}$$