

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2019 年 5 月 16 日 (16.05.2019)



(10) 国际公布号  
**WO 2019/091471 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*C12P 21/06* (2006.01) *G01N 21/359* (2014.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/114949

(22) 国际申请日: 2018 年 11 月 12 日 (12.11.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

|                |                               |    |
|----------------|-------------------------------|----|
| 201711111381.0 | 2017 年 11 月 13 日 (13.11.2017) | CN |
| 201711111327.6 | 2017 年 11 月 13 日 (13.11.2017) | CN |
| 201711111354.3 | 2017 年 11 月 13 日 (13.11.2017) | CN |
| 201711111383.X | 2017 年 11 月 13 日 (13.11.2017) | CN |

(71) 申请人: 江苏大学 (JIANGSU UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

(72) 发明人: 马海乐 (MA, Haile); 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 李云亮 (LI, Yunliang); 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 任晓锋 (REN, Xiaofeng); 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 杨雪 (YANG, Xue); 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 黄姍芬 (HUANG, Shanfen); 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 王禹程 (WANG, Yucheng); 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

(54) **Title:** PREPARATION OF MACROMOLECULAR POLYPEPTIDE BASED ON GASTROINTESTINAL DIGESTION AND METHOD FOR IN SITU REAL-TIME MONITORING PROCESS OF SAME

(54) 发明名称: 一种基于胃肠消化的大分子多肽的制备及其过程原位实时监测方法

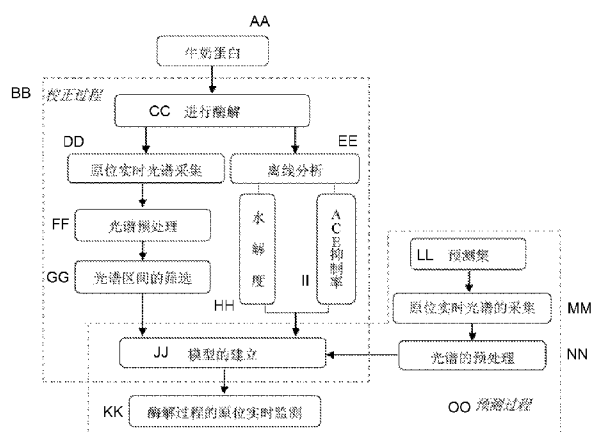


图 1

|    |                                        |    |                                                              |
|----|----------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------|
| AA | Cow milk protein                       | II | ACE Inhibition rate                                          |
| BB | Correction process                     | JJ | Establishment of model                                       |
| CC | Enzymatic hydrolysis                   | KK | In situ real-time monitoring of enzymatic hydrolysis process |
| DD | In situ real-time spectral acquisition | LL | Prediction set                                               |
| EE | Offline analysis                       | MM | In situ real-time spectral acquisition                       |
| FF | Spectral pretreatment                  | NN | Spectral pretreatment                                        |
| GG | Screening of spectral intervals        | OO | Prediction process                                           |
| HH | Degree of hydrolysis                   |    |                                                              |

(57) **Abstract:** Disclosed are the preparation of a macromolecular polypeptide based on gastrointestinal digestion and a method for in situ real-time monitoring the process of the same, relates to the fields of polypeptide preparation and online monitoring. In the preparation of the polypeptide, use a soluble technology to process a protein, add a specific protease to make the reaction system close to the optimal catalytic system, and maintain the reaction system to the predetermined degree of enzymatic hydrolysis, making

(74) 代理人: 北京德崇智捷知识产权代理有限公司  
(JW IP LAW FIRM); 中国北京市朝阳区酒仙桥路  
14号A5楼7层701, Beijing 100015 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家  
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,  
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,  
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,  
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,  
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区  
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,  
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,  
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

the content of the protein that has not been enzyme hydrolyzed significantly decreased, the homogeneity of enzymatic hydrolysate high, rapid absorbability after gastrointestinal digestion and biological activity significantly improved. The degree of hydrolysis and the antihypertensive activity of the enzymatic hydrolysate after gastrointestinal digestion are monitored online during the preparation process, and the prediction model is very close to the actually measured model and can achieve an effective in situ detection.

(57) 摘要: 一种基于胃肠消化的大分子多肽的制备及其过程原位实时监测方法, 涉及多肽制备及在线监测领域。在制备多肽时采用可溶化技术处理蛋白, 加入特定的蛋白酶, 使反应体系接近最佳催化体系, 维持至预定的酶解水解度, 使得未被酶解的蛋白含量显著下降, 酶解产物均一性高, 经胃肠消化后的可快速吸收性、生物学活性显著提高。在制备过程中在线监测水解度及酶解产物经胃肠消化后的降血压活性, 预测模型和实测模型非常接近, 可实现有效原位检测。

# 一种基于胃肠消化的大分子多肽的制备及其过程原位实时监测方法

## 技术领域

本发明涉及多肽制备和蛋白质酶解过程实时监测领域,特别是指一种基于胃肠消化的大分子多肽的制备及其过程原位实时监测方法。

## 背景技术

我国蛋白质资源丰富,每年有 9000 万吨的蛋白类农产品加工副产物,但是其综合利用率只有 40%,不到发达国家的一半,造成资源的浪费和经济损失。主要原因在于目前我国蛋白质的加工方式粗放,缺乏高集成度的相关技术。因此,开展蛋白资源精深综合加工产业提质增效的关键技术研究非常迫切,符合国家现代农业发展要求。

大量科学研究表明,通过选择适当的蛋白酶,水解的蛋白质可以得到大量的具有各种生物功能的生物活性肽,这些活性肽不仅具有极其广泛的活性和多样性,而且其来源丰富、成本低、安全性好。操作简单、便于工业化生产,因此已成为研究的新热点(庞广昌等,生物活性肽的研究进展理论基础与展望,2001)。其相关产品已广泛地应用于营养食品、特医食品、保健品、化妆品等领域。

目前酶解法制备活性肽,主要以制备小分子多肽为主(分子量小于 500~3000 Da),因为机体转运小肽通过小肠壁的速度比氨基酸更快,其制备工艺均是基于期望目标小分子多肽被体内消化道直接吸收为基本准则,即“小分子制备小分子吸收”的理念,由于其酶解程度过高(若以制备二、三肽为终极目标,其水解度达 33.3%以上),后续的离心、膜分离和浓缩等环节也致使其制备过程复杂,成本过高。另外小分子多肽经过胃肠道内的蛋白酶消化,还会产生过度降解的问题(Katherina Fernández, Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, 2013)。从该角度考虑,利用酶解法制备基于胃肠消化的大分子活性肽(分子量大于 6000 Da,水解度在 2%-20%)具有很大优势,该方案是基于“大分子制备小分子吸收”的理念,将蛋白在体外经过低程度酶解制备大分子多肽,口服进入肠胃后,利用体内胃肠的蛋白酶解能力,形成至少达到与传统“小分子制备小分子吸收”类似效果的小分子活性肽被机体吸收,同时还能起到类似缓释的效果。

目前酶解法制备的多肽的原料主要有牛奶蛋白、酪蛋白、玉米蛋白、大米蛋白、谷朊粉等,其中大部分蛋白在正常情况下水溶性均不理想,如果直接进行低程度短时间地酶解,不溶性的蛋白由于颗粒度较大,会导致颗粒内外蛋白水解程度不一,即颗粒外部蛋白被过度酶

解，内部蛋白未被酶解，造成酶解产物的均一度低。通常蛋白的水解程度对其产物的生物活性有显著的影响。因此，提高酶解产物的均一性提高大分子多肽产品质量具有重要意义。

提高蛋白溶解性的方法有很多，如：（1）改变温度，如大豆蛋白溶解于较高温度的水（pH 8.0）中，不仅溶解度大幅提高，而且蛋白溶液胶体化程度和粘稠度会显著下降；（2）改变 pH 值，如酪蛋白极难溶于中性或者酸性的水中，在 pH 大于 8 时，溶解较好；（3）改变非极性溶液比例，如玉米醇溶蛋白难溶于水中，但是易溶于 60%乙醇溶液。这些方法虽然能有效解决蛋白的溶解问题，但是这些方法对应的体系并不一定是常用蛋白酶的最佳催化体系，比如在一定温度范围内，大豆蛋白溶解度随温度升高而升高，但是温度超过蛋白酶最佳催化温度时，长时间酶解，会引起蛋白酶酶活大幅下降甚至会引起失活。综合考虑底物蛋白的溶解性和酶的催化活性，制备高均一性的基于胃肠消化的大分子活性多肽的研究还未见报道。

另外，大分子多肽的制备过程中蛋白水解程度低，可以大幅地缩短酶解时间、减少用酶量、简化工艺、降低能耗，达到显著降低制备成本的目的。但是目前基于胃肠消化的大分子多肽制备的检测指标仍然需要离线测定（在线取样后，经胃肠模拟消化后再测定其生物学活性），不仅耗时长、工作量大而且测定数据具有滞后性。因此需要一种快速、连续的方法获得基于胃肠消化的大分子多肽制备酶解反应中的重要参数，用以判断酶解反应终点。近年来，光谱监测手段已应用于多肽的制备过程中（基于原位实时光谱在线监测蛋白质酶解过程的装置和方法，公开号：CN105628644A）。原位实时在线光谱技术能对过程中化学成分的变化进行连续性测量，而且该技术由于采用了微小型光纤光谱仪，因此其具有方便携带，成本低廉，速度快，无污染，实时连续检测的优点。目前已实现光谱与酶解产物活性定量模型的建立，但是能否实现光谱与酶解产物经胃肠消化后的活性定量模型的建立还未见报道。

## 发明内容

本发明的目的为了克服传统技术的不足，是提供了一种高均一性的基于胃肠消化的大分子多肽的制备方法及其过程原位实时监测。

为了实现上述发明目的，其具体的技术方案如下：

称取蛋白，进行可溶化预处理，加入特定的蛋白酶，借助体系内部或外部因素控制，使反应体系随着酶解反应的进行接近（或达到）蛋白酶最佳催化体系，并维持至达到预定的酶解水解度，灭酶，冷却后干燥，制备成成品。

其中上述的蛋白，可以为不易溶于水的蛋白，如酪蛋白、玉米醇溶蛋白，和溶于水后凝

胶化程度和粘稠度较大的蛋白，如大豆分离蛋白，也可以是溶于水的蛋白，如牛奶蛋白。

其中上述的可溶化预处理手段包括且不局限于调节非极性溶剂比例、温度或 pH。

其中上述的蛋白如果可溶性较好凝胶化不严重，如乳清蛋白、卵清白蛋白等，可以不采用可溶化预处理。

其中上述的蛋白如果溶于水，可采用热和/或超声预处理蛋白。

其中上述的蛋白酶，优先为其蛋白水解位点与胃蛋白酶的水解位点（优先水解由两个疏水性氨基酸残基形成肽键，如 Phe-Phe）具有较强互补性的蛋白酶，如中性蛋白酶、胰蛋白酶、胰酶（主要为胰蛋白酶）、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶等。

其中酪蛋白大分子多肽制备方法，按照下述步骤进行：取一定量的酪蛋白，50℃水浴预热 10 min，调节 pH 至 8.0-8.5，使之完全溶解，调节蛋白浓度为 50 g/L，按 5%（E/S）加入中性蛋白酶，待 pH 下降至 6.5-7.5 时，不断滴加 NaOH 维持 pH 恒定，待反应到一定水解度（10%-20%），酶解结束，灭酶，冷却后干燥，制备成成品。

其中玉米醇溶蛋白大分子多肽制备方法，按照下述步骤进行：用 60%-70%的乙醇溶解玉米醇溶蛋白，50℃水浴预热 10 min，缓慢加入等温水，将溶液的乙醇浓度稀释为 15%-25%，蛋白浓度调节至 15 g/L，采用聚能式超声（细胞破碎仪）预处理玉米醇溶蛋白，超声处理参数如下：超声时间 5-60 min，超声功率 40-500 W/L。预处理结束后，调节温度和 pH，加入 5%（E/S）胰酶进行酶解，采用 1 mol/L 氢氧化钠溶液维持 pH 恒定，反应到一定水解度（5%-15%），酶解结束，调 pH 为 4-5，旋转蒸发掉乙醇后，补水灭酶，干燥，制备成成品。

其中大豆蛋白大分子多肽制备方法，按照下述步骤进行：取一定量的大豆分离蛋白，加水配成蛋白浓度为 50 g/L，63-68℃水浴预热 10 min，调节 pH 至 8.0-8.5，加入 5%（E/S）中性蛋白酶进行酶解，待 pH 下降 6.5-7.5 时，不断滴加 NaOH 维持 pH 恒定，再降低温度至 50-55℃。反应到一定水解度（10%-20%），酶解结束，灭酶，冷却后干燥，制备成成品。

其中牛奶蛋白大分子多肽制备方法，按照下述步骤进行：取牛奶，油浴加热变性，冷却至室温后，采用聚能式超声（细胞破碎仪）预处理牛奶（蛋白浓度 34 g/L），超声处理参数如下：超声时间 5~60 min，超声功率 40~500 W/L。预处理结束后，将温度调至 40~60℃，加入 2%~10%（E/S）中性蛋白酶，酶解至一定的水解度（2%~20%），酶解结束后，灭酶，冷却后干燥，制备成成品。

本发明一种基于胃肠消化的大分子多肽制备原位实时监测方法，按照下述步骤进行：

（1）对牛奶进行酶解，酶解过程中定时取样，并对所取的样品进行模拟胃肠消化，酶解过程指标为牛奶水解度及其酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性（以 ACE 抑制率为指

标)。

所述模拟胃肠消化按以下步骤进行：取酶解产物按照 2% (E/S) 加酶量加入胃蛋白酶，酶解 2 h，酶解结束后按照 4% (E/S) 加酶量加入胰酶，酶解 4 h，反应结束后于 100°C 灭酶 15 min。

(2) 制备牛奶大分子降血压肽酶解过程中，定时对酶解液进行快速采集原位实时近红外光谱，采用便携式微小型近红外光谱仪采集数据，采集的光谱波长范围：900-2500 nm)。

(3) 对光谱数据进行预处理，具体为采用多项式卷积平滑 (sg) 的方法对样品光谱数据进行预处理。

(4) 筛选最佳光谱区间，具体为采用联合区间偏最小二乘回归方法筛选牛奶水解度及其酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性的最佳光谱区间。也可以采用偏最小二乘法、区间偏最小二乘法等方法。

(5) 建立校正和预测模型，具体为采用联合区间最小二乘回归方法，将牛奶水解度及其酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性与原位实时光谱数据建立校正和预测模型，其中校正集 (70 个) 和预测集 (20 个)。

(6) 将上述预测模型应用于制备牛奶大分子降血压肽酶解过程中，利用上述预测模型，对建模外的制备牛奶大分子降血压肽的酶解过程进行原位实时在线监测，预测酶解过程中水解度及其酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性，并计算预测值和实测值的偏差。

以上所述的蛋白来源不限于牛奶，还包括一些可溶性较好的其他蛋白。例如大豆蛋白、蛋清或乳清蛋白等。

本发明的优点：

(1) 本发明与现有技术相比，一方面，使得蛋白底物的溶解性和酶的催化活性得到了统一，使得底物在酶解过程中始终处于溶解状态 (或者不形成大的颗粒沉淀或提高蛋白底物的均一性)，从而使产物的均一性得到提高，酶解体系中未被酶解的蛋白含量下降 9.34%-54.39% (与直接酶解蛋白制备小分子多肽相比)；另一方面，充分利用人体的胃肠消化功能，使大分子多肽在体内进一步降解，与直接酶解蛋白制备小分子多肽相比，降血压活性 (以 ACE 抑制率为指标) 提高了 19.74%-81.68%，并且所采用的中性蛋白酶 (其酶切点与胃蛋白酶互补)，其酶解产物经过胃肠消化之后的生物学活性优于碱性蛋白酶。

(2) 本发明是一种基于胃肠消化制备牛奶大分子多肽的原位实时监测方法，在线监测制备牛奶大分子降血压肽酶解过程中水解度及其酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性。以牛奶为样本，采集制备大分子降血压肽酶解过程中的原位实时光谱，采用联合区间偏最小二

乘法将检测指标和光谱图建立模型，以实测值和预测值的偏差为指标，评价牛奶水解度及其酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性的回归模型。牛奶酶解液的水解度预测模型的相关系数  $R$  为 0.962，标准偏差为 1.12%；酶解产物经胃肠消化后的降血压活性预测模型的相关系数  $R$  为 0.972，标准偏差为 2.88%，实现了对制备牛奶大分子多肽酶解过程中水解度、酶解产物经胃肠消化后生物活性的有效原位检测。

下面通过附图和实施例，对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

## 附图说明

图 1 为牛奶大分子多肽的酶解过程原位在线监测定量建模流程图。

图 2 为基于胃肠消化制备牛奶大分子多肽的原位实时监测的装置图。其中 1 为酸碱滴定管，2 为夹层烧杯，3 为磁力搅拌器，4 为浸入式光纤探头，5 为超级恒温箱，6 为钨灯光源，7 为微小型近红外光谱仪，8 为信息采集系统，9 为自动滴定仪。

## 具体实施方式

在本发明中所使用的术语，除非有另外说明，一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义。下面结合具体的实施例，并参照数据进一步详细地描述本发明。应理解，这些实施例只是，对本发明进行进一步说明，不能理解为对本发明保护范围的限定，该领域的技术工程师可根据上述发明的内容对本发明作出一些非本质的改进和调整。

在以下的实施例中，未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。所用试剂的来源、商品名以及有必要列出其组成成分者，均在首次出现时标明，其后所用相同试剂如无特殊说明，均以首次标明的内容相同。

本实施例和对照例的蛋白酶和酪蛋白均购于Sigma公司。

本实施例和对照例的水解度在加入中性蛋白酶开始酶解时至pH达到设定pH值之前，酪蛋白的水解度采用甲醛滴定法测定，在达到设定pH以后采用pH-stat法测定，总水解度为两者相加之和。

本实施例和对照例的体外模拟胃肠道消化均采用如下方法：取酶解产物两份，按照一定的 2% (E/S) 加酶量加入胃蛋白酶，酶解 2 小时，酶解结束后，一份用于灭酶，离心，测定胃消化产物的降血压活性。另一份按照 4% (E/S) 加酶量加入胰酶，酶解 4 小时，酶解结束后，灭酶，离心，测定胃肠消化产物的降血压活性。

本实施例和对照例的降血压活性测定均以血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 抑制率为指标，具体操作参照丁青芝 (脉冲超声辅助酶解法制备玉米黄粉

ACEI 活性肽的研究, 2008) 的方法。

本实施例和对照例中未被酶解的蛋白测定方法为: 采用三氯乙酸沉淀法(三氯乙酸的终浓度为 10%)。

#### **对照例1**

称取 20 g 酪蛋白, 加入 400 mL 蒸馏水, 调节温度至 50℃, 用 3 M NaOH 调节 pH 为 6.5, 平衡 15 min 后, 加入 1 mL 中性蛋白酶, 不断滴加 1 M NaOH 维持 pH 为 6.5, 水解度为 26%时, 酶解结束, 于 100℃条件下灭酶 15 min, 离心取上清, 并过 3000 Da 超滤膜, 将滤过液喷雾干燥, 制备成成品。

未酶解蛋白为 9.64 g, 测定其胃肠消化产物的降血压活性为 31.23%。

#### **对照例2**

称取 20 g 酪蛋白, 加入 400 mL 蒸馏水, 调节温度至 50℃, 用 3 M NaOH 调节 pH 为 6.5, 平衡 15 min 后, 加入 1 mL 中性蛋白酶, 不断滴加 1M NaOH 维持 pH 为 6.5, 水解度为 20%时, 酶解结束, 于 100℃条件下灭酶 15 min, 冷却后干燥, 制备成成品。

未酶解蛋白为 11.30 g, 测定其胃肠消化产物的降血压活性为 46.23%。

#### **对照例3**

称取 20 g 酪蛋白, 加入 400 mL 蒸馏水, 调节温度至 50℃, 用 3 M NaOH 调节 pH 为 6.5, 平衡 15 min 后, 加入 960 mL 碱性蛋白酶(与上述所加入的中性蛋白酶酶活相同), 不断滴加 1M NaOH 维持 pH 为 6.5, 水解度为 20%时, 酶解结束, 于 100℃条件下灭酶 15 min, 冷却后干燥, 制备成成品。

未酶解蛋白为 10.99 g, 测定其胃肠消化产物的降血压活性为 32.26%。

#### **实施例1**

称取 20 g 酪蛋白, 加入 400 mL 蒸馏水, 不断滴加 3 M NaOH 维持 pH 为 8.5, 在滴加的过程中不断搅拌, 待其全部溶解之后, 将温度调节至 50℃, 加入 1 mL 中性蛋白酶, 待 pH 降至 7.5 后, 不断滴加 1 M NaOH 维持 pH 为 7.5, 水解度为 10%时, 酶解结束, 于 100℃条件下灭酶 15 min, 冷却后干燥, 制备成成品。

未酶解蛋白为 8.74 g, 测定其胃肠消化产物的降血压活性为 51.37%,。

#### **实施例2**

称取 20 g 酪蛋白, 加入 400 mL 蒸馏水, 不断滴加 3 M NaOH 维持 pH 为 8.0, 在滴加的过程中不断搅拌, 待其全部溶解之后, 将温度调节至 50℃, 加入 1 mL 中性蛋白酶, 待 pH 降至 6.5 后, 不断滴加 1 M NaOH 维持 pH 为 6.5, 水解度为 20%时, 酶解结束, 于 100℃

条件下灭酶 15 min，冷却后干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 4.53 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 56.74%，。

#### **对照例 4**

称取玉米醇溶蛋白 6.75 g，加入 450 mL 水，50℃水浴预热 10 min，并调节 pH 为 8.0，加入 337.5 mg 的胰酶进行酶解，在酶解过程中不断滴加 1 mol/L NaOH 维持 pH 恒定，水浴温度恒定。反应到水解度为 28%，酶解结束，调 pH 为 4，旋转蒸发掉乙醇后，补水于 100℃条件下灭酶 15 min，离心取上清，并过 3000 Da 超滤膜，将滤过液喷雾干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 4.21 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 39.62%。

#### **对照例 5**

称取玉米醇溶蛋白 6.75 g，加入 450 mL 水，50℃水浴预热 10 min，并调节 pH 为 8.0，加入 337.5 mg 的胰酶进行酶解，在酶解过程中不断滴加 1 mol/L NaOH 维持 pH 恒定，水浴温度恒定。反应到水解度为 15%，酶解结束，调 pH 为 4，旋转蒸发掉乙醇后，补水于 100℃条件下灭酶 15 min，冷却后干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 4.76 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 44.35%。

#### **实施例 3**

称取玉米醇溶蛋白 6.75 g，加入 150 mL 60%乙醇完全溶解，50℃水浴预热 10 min，调节溶液中的乙醇浓度为 15%，体系为 450 mL。立即调节 pH 为 8.0，加入 337.5 mg 的胰酶进行酶解，在酶解过程中不断滴加 1 mol/L NaOH 维持 pH 恒定，水浴温度恒定。反应到水解度为 15%，酶解结束，调 pH 为 4，旋转蒸发掉乙醇后，补水后于 100℃条件下灭酶 15 min，冷却后干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 1.92 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 65.17%。

#### **实施例 4**

称取玉米醇溶蛋白 6.75 g，加入 150 mL 70%乙醇完全溶解，50℃水浴预热 10 min，调节溶液中的乙醇浓度为 25%，体系为 450 mL。立即调节 pH 为 8.0，加入 337.5 mg 的胰酶进行酶解，在酶解过程中不断滴加 1 mol/L NaOH 维持 pH 恒定，水浴温度恒定。反应到水解度为 5%，酶解结束，调 pH 为 5，旋转蒸发掉乙醇后，补水后于 100℃条件下灭酶 15 min，冷却后干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 3.47 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 54.68%。

#### **实施例 5**

称取玉米醇溶蛋白 6.75 g，加入 150 mL 60%的乙醇完全溶解，50℃水浴预热 10 min，

缓慢加入等温水，将溶液的乙醇浓度稀释为 15%，蛋白浓度调节至 15 g/L，采用聚能式超声（细胞破碎仪）预处理玉米醇溶蛋白，超声处理参数如下：超声时间 5 min，超声功率 40 W/L。预处理结束后，调节温度 37℃和 pH 7.5，加入 337.5 mg 胰酶进行酶解，采用 1 mol/L 氢氧化钠溶液维持 pH 恒定，水解度为 10%时，调 pH 为 5，旋转蒸发掉乙醇后，补水灭酶，喷雾干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 1.78 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 58.47%。

#### **实施例6**

称取玉米醇溶蛋白 6.75 g，加入 150 mL 60%的乙醇完全溶解，50℃水浴预热 10 min，缓慢加入等温水，将溶液的乙醇浓度稀释为 25%，蛋白浓度调节至 15 g/L，采用聚能式超声（细胞破碎仪）预处理玉米醇溶蛋白，超声处理参数如下：超声时间 60 min，超声功率 500 W/L。预处理结束后，调节温度 37℃和 pH 7.5，加入 337.5 mg 胰酶进行酶解，采用 1 mol/L 氢氧化钠溶液维持 pH 恒定，水解度为 10%时，调 pH 为 4，旋转蒸发掉乙醇后，补水灭酶，喷雾干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 1.69 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 58.47%。

#### **实施例7**

称取玉米醇溶蛋白 6.75 g，加入 150 mL 60%的乙醇完全溶解，50℃水浴预热 10 min，缓慢加入等温水，将溶液的乙醇浓度稀释为 25%，蛋白浓度调节至 15 g/L，采用聚能式超声（细胞破碎仪）预处理玉米醇溶蛋白，超声处理参数如下：超声时间 30 min，超声功率 100 W/L。预处理结束后，调节温度 37℃和 pH 7.5，加入 337.5 mg 胰酶进行酶解，采用 1 mol/L 氢氧化钠溶液维持 pH 恒定，水解度为 10%时，调 pH 为 4，旋转蒸发掉乙醇后，补水灭酶，喷雾干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 1.71 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 60.32%。

#### **对照例 6**

取 20 g 大豆分离蛋白，加入 400 mL 水，50℃水浴预热 10 min，并调节 pH 至 7.5，加入 1 mL 中性蛋白酶进行酶解，不断滴加 1 mol/L NaOH 维持 pH 恒定，反应到水解度为 25%，酶解结束，于 100℃条件下灭酶 15 min，离心取上清，并过 3000 Da 超滤膜，将滤过液喷雾干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 12.63 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 29.38%。

#### **对照例 7**

取 20 g 大豆分离蛋白，加入 400 mL 水，50℃水浴预热 10 min，并调节 pH 至 7.5，加

入 1 mL 中性蛋白酶进行酶解, 不断滴加 1 mol/L NaOH 维持 pH 恒定, 反应到水解度为 20%, 酶解结束, 于 100℃ 条件下灭酶 15 min, 冷却后干燥, 制备成成品。

未酶解蛋白为 14.21 g, 测定其胃肠消化产物的降血压活性为 31.47%。

#### **实施例 8**

取 20 g 大豆分离蛋白, 加入 400 mL 水, 63℃ 水浴预热 10 min, 并调节 pH 至 8.5, 加入 1 mL 中性蛋白酶进行酶解, 待 pH 下降 7.5 附近时, 不断滴加 1 mol/L NaOH 维持 pH 恒定, 再降低温度至 50℃ (降温速度为 5℃/min), 反应到水解度为 20%, 酶解结束, 于 100℃ 条件下灭酶 15 min, 冷却后干燥, 制备成成品。

未酶解蛋白为 6.41 g, 测定其胃肠消化产物的降血压活性为 36.97%。

#### **实施例 9**

取 20 g 大豆分离蛋白, 加入 400 mL 水, 68℃ 水浴预热 10 min, 并调节 pH 至 8.0, 加入 1 mL 中性蛋白酶进行酶解, 待 pH 下降 6.5 附近时, 不断滴加 1 mol/L NaOH 维持 pH 恒定, 再降低温度至 55℃ (降温速度为 5℃/min), 反应到水解度为 10%, 酶解结束, 于 100℃ 条件下灭酶 15 min, 冷却后干燥, 制备成成品。

未酶解蛋白为 7.28 g, 测定其胃肠消化产物的降血压活性为 35.18%。

#### **对照例 8**

量取 400 mL 牛奶, 将温度调节至 50℃, 加入 680 μL 中性蛋白酶, 酶解至水解度为 32% 时于 100℃ 条件下灭酶 15 min, 冷却后干燥, 制备成成品。

未酶解蛋白为 6.51 g, 测定其胃肠消化产物的降血压活性为 44.61%。

#### **对照例 9**

量取 400 mL 牛奶, 将温度调节至 50℃, 加入 680 μL 中性蛋白酶, 酶解至水解度为 18% 时于 100℃ 条件下灭酶 15 min, 冷却后干燥, 制备成成品。

未酶解蛋白为 7.17 g, 测定其胃肠消化产物的降血压活性为 52.30%。

#### **对照例 10**

量取 400 mL 牛奶, 采用聚能式超声预处理牛奶, 超声处理参数如下: 超声时间 20 min, 超声功率 300 W/L。将超声预处理后的牛奶放入水浴锅内, 将其温度调节至 50℃, 加入 680 μL 中性蛋白酶, 酶解至水解度为 18% 时于 100℃ 条件下灭酶 15 min, 冷却后干燥, 制备成成品。

未酶解蛋白为 6.83 g, 测定其胃肠消化产物的降血压活性为 60.2%。

#### **对照组 11**

量取 400 mL 牛奶，于 100℃油浴中加热 20 min 后，冷却至室温。将预处理后的牛奶放入水浴锅内，将其温度调节至 50℃，加入 680 μL 中性蛋白酶，酶解至水解度为 18%于 100℃条件下灭酶 15 min，冷却后干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 6.12 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 58.8%。

#### **对照组12**

量取 400 mL 牛奶，于 100℃油浴中加热 20 min，冷却至室温后，采用聚能式超声预处理牛奶，超声处理参数如下：超声时间 20 min，超声功率 300 W/L。将超声预处理后的牛奶放入水浴锅内，将其温度调节至 50℃，加入 680 μL 碱性蛋白酶，酶解至水解度为 18%时于 100℃条件下灭酶 15 min，冷却后干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 4.61 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 56.4%。

#### **实施例10**

量取 400 mL 牛奶，于 100℃油浴中加热 20 min，冷却至室温后，采用聚能式超声（细胞破碎仪）预处理牛奶（蛋白浓度 34 g/L），超声处理参数如下：超声时间 20 min，超声功率 300 W/L。将超声预处理后的牛奶放入水浴锅内，将其温度调节至 50℃，加入 680 μL 中性蛋白酶，酶解至水解度为 18%时于 100℃条件下灭酶 15 min，冷却后干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 3.90 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 64.6%。

#### **实施例11**

量取 400 mL 牛奶，于 100℃油浴中加热 20 min，冷却至室温后，采用聚能式超声（细胞破碎仪）预处理牛奶（蛋白浓度 34 g/L），超声处理参数如下：超声时间 5 min，超声功率 40 W/L。将超声预处理后的牛奶放入水浴锅内，将其温度调节至 40℃，加入 2.72 μL 中性蛋白酶，酶解至水解度为 20%时于 100℃条件下灭酶 15 min，冷却后干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 3.76 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 62.3%。

#### **实施例12**

量取 400 mL 牛奶，于 100℃油浴中加热 20 min，冷却至室温后，采用聚能式超声（细胞破碎仪）预处理牛奶（蛋白浓度 34 g/L），超声处理参数如下：超声时间 60 min，超声功率 500 W/L。将超声预处理后的牛奶放入水浴锅内，将其温度调节至 60℃，加入 1360 μL 中性蛋白酶，酶解至水解度为 2%时于 100℃条件下灭酶 15 min，冷却后干燥，制备成成品。

未酶解蛋白为 5.82 g，测定其胃肠消化产物的降血压活性为 57.51%。

#### **实施例13**

（1）取牛奶（蛋白浓度为34 g/L和30 g/L）400 mL于夹层烧杯中，在50℃恒温搅拌平衡

10 min, 用1 mol/L的NaOH调节到pH为7.0。随后加入5% (E/S) 的中性蛋白酶进行酶解, 整个酶解过程中pH保持恒定, 酶解时间90 min, 每间隔2 min取样, 同时采集光谱信息, 取样后迅速沸水浴灭酶, 冷却进行胃肠模拟消化实验。用3 mol/L的HCl调节pH为1.60。随后加入2% (E/S) 的胃蛋白酶, 酶解2 h, 整个酶解过程中pH保持在1.5-2.0之间。胃蛋白酶酶解结束后, 用1 mol/L的NaOH调节到pH为8.0, 随后加入2% (E/S) 胰酶, 酶解4 h, 整个酶解过程中pH保持恒定, 酶解结束后取样, 取样后迅速用沸水浴灭酶10 min, 冷却后10000 g离心10 min, 收集上清液储存于4℃待测。共计90个样品。

(3) 测定牛奶酶解产物经过胃肠蛋白酶消化后的降血压活性。降血压活性的测定方法参照丁青芝的方法并略作修改(丁青芝. 脉冲超声辅助酶解法制备玉米黄粉ACEI活性肽的研究[D]. 江苏大学, 2008.)。ACE、FAPGG各加50  $\mu$ L, HEPES缓冲液加100  $\mu$ L, 样品加100  $\mu$ L。

(4) 牛奶酶解过程中原位实时光谱的采集。经原位仪器如图2所示, 整个系统工作时, 在夹层烧杯2中进行牛奶的酶解, 开启自动滴定仪、磁力搅拌器、超级恒温箱。将浸入式光纤探头置于牛奶中并固定。由卤钨灯光源6将光源传入浸入式光纤探头4, 在酶解反应过程中采集到的相应光谱反映在微小型近红外光谱仪7中, 最终通过信息采集系统将光谱信息采集并存储。以InGaAs检测器采集900-2500 nm光谱(以50℃蒸馏水为背景, 采用透反射方式; 光程4 mm; 扫描次数为16次, 分辨率6.4 nm, 共含90个变量。每个样品连续采集3次光谱, 取其平均值作为该样本的原始光谱)。

(5) 牛奶酶解过程中原位实时光谱的预处理。采用多项式卷积平滑(sg)预处理方法对酶解过程中采集的原始光谱进行预处理。

(6) 校正模型的建立。将90个样品的光谱用sg预处理方法进行预处理, 分成校正集(70个)和预测集(20个)两个部分。采用偏最小二乘算法建立酶解过程中牛奶水解度及其酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性的定量模型, 包括校正模型和预测模型。

(7) 酶解过程的预测。牛奶(蛋白浓度34 g/L和30 g/L)400 mL, 按照(1)的方法采集光谱, 按照(1)、(2)和(3)的方法进行酶解。将采集的光谱带入(7)中所建立的预测模型中, 对牛奶水解度及其酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性进行预测, 并比较其预测值和实测值的残差。残差值小于实测值5%认为该模型预测准确。

表1 牛奶水解度及其酶解产物经胃肠消化后的降血压活性建模结果

| 监测指标   | $R_C$ | $RMSECV$ | $R_P$ | $RMSEP$ |
|--------|-------|----------|-------|---------|
| 水解度(%) | 0.977 | 0.686    | 0.962 | 1.12    |

|             |       |      |       |      |
|-------------|-------|------|-------|------|
| ACE 抑制率 (%) | 0.980 | 2.36 | 0.972 | 2.88 |
|-------------|-------|------|-------|------|

表 2 牛奶大分子肽酶解过程中水解度预测结果

| 样品编号 | 实测值   | 预测值   | 残差    |
|------|-------|-------|-------|
| 1    | 7.23  | 7.71  | -0.48 |
| 2    | 10.72 | 10.21 | 0.51  |
| 3    | 12.07 | 12.59 | -0.51 |
| 4    | 12.59 | 12.07 | 0.52  |
| 5    | 13.61 | 12.94 | 0.67  |
| 6    | 14.87 | 15.63 | -0.77 |
| 7    | 15.13 | 14.86 | 0.27  |
| 8    | 15.57 | 14.97 | 0.60  |
| 9    | 15.81 | 16.15 | -0.35 |
| 10   | 16.22 | 16.94 | -0.72 |
| 11   | 16.46 | 15.69 | 0.78  |
| 12   | 17.32 | 16.74 | 0.57  |
| 13   | 18.21 | 18.07 | 0.15  |
| 14   | 18.69 | 18.41 | 0.27  |
| 15   | 19.18 | 19.25 | -0.07 |
| 16   | 19.48 | 19.34 | 0.14  |
| 17   | 19.94 | 20.04 | -0.10 |
| 18   | 20.13 | 20.42 | -0.29 |
| 19   | 20.39 | 20.50 | -0.11 |
| 20   | 20.82 | 20.79 | 0.03  |

表3 牛奶酶解产物经胃肠消化后的降血压活性预测结果

| 样品编号 | 实测值   | 预测值   | 残差    |
|------|-------|-------|-------|
| 1    | 7.96  | 8.14  | -0.18 |
| 2    | 27.68 | 27.31 | 0.37  |
| 3    | 32.28 | 33.20 | -0.92 |
| 4    | 36.15 | 36.31 | -0.16 |
| 5    | 38.84 | 37.08 | 1.76  |
| 6    | 40.63 | 40.39 | 0.24  |
| 7    | 41.11 | 42.10 | -0.99 |
| 8    | 44.94 | 44.57 | 0.37  |
| 9    | 46.12 | 47.14 | -1.02 |
| 10   | 48.71 | 46.56 | 2.15  |
| 11   | 51.52 | 49.48 | 2.04  |
| 12   | 53.65 | 55.81 | -2.16 |
| 13   | 57.94 | 60.03 | -2.09 |
| 14   | 60.89 | 57.97 | 2.92  |
| 15   | 64.77 | 62.02 | 2.75  |
| 16   | 65.39 | 65.81 | -0.42 |
| 17   | 67.83 | 66.07 | 1.76  |
| 18   | 70.02 | 69.78 | 0.24  |
| 19   | 72.48 | 73.52 | -1.04 |
| 20   | 75.35 | 76.93 | -1.58 |

1、一种基于胃肠消化的大分子多肽的制备方法，特征在于，取一定量的酪蛋白，50℃水浴预热 10 min，调节 pH 至 8.0-8.5 使之完全溶解，中性蛋白酶，待 pH 下降 6.5-7.5 附近时，不断滴加 NaOH 维持 pH 恒定，待反应到一定水解度（10-20%），酶解结束，灭酶，冷却后干燥，制备成成品。

2、一种基于胃肠消化的大分子多肽的制备方法，特征在于，用 60%-70%的乙醇溶解玉米醇溶蛋白，50℃水浴预热 10 min，缓慢加入等温水，将溶液的乙醇浓度稀释为 15%-25%，蛋白浓度调节至 15 g/L，采用聚能式超声（细胞破碎仪）预处理玉米醇溶蛋白，超声处理参数如下：超声时间 5-60 min，超声功率 40-500 W/L。预处理结束后，调节温度和 pH，加入 5%（E/S）胰酶进行酶解，采用 1 mol/L 氢氧化钠溶液维持 pH 恒定，反应到一定水解度（5%-15%），酶解结束，调 pH 为 4-5，旋转蒸发掉乙醇后，补水灭酶，干燥，制备成成品。

3、一种基于胃肠消化的大分子多肽的制备方法，特征在于，取一定量的大豆分离蛋白，63-68℃水浴预热 10 min，调节 pH 至 8.0-8.5，加入中性蛋白酶进行酶解，待 pH 下降 6.5-7.5 附近时，不断滴加 NaOH 维持 pH 恒定，再降低温度至 50-55℃；反应到一定水解度（10%-20%），酶解结束，灭酶，冷却后干燥，制备成成品。

4、一种基于胃肠消化的大分子多肽的制备方法，特征在于，取牛奶，油浴加热变性，冷却至室温后，采用聚能式超声（细胞破碎仪）预处理牛奶（蛋白浓度 34 g/L），超声处理参数如下：超声时间 5~60 min，超声功率 40~500 W/L。预处理结束后，将温度调至 40~60℃，加入 2%~10%（E/S）中性蛋白酶，酶解至一定的水解度（2%~20%），酶解结束后，灭酶，冷却后干燥，制备成成品。

5、根据权利要求 1 所述一种基于胃肠消化的大分子多肽的制备过程原位实时监测方法，特征在于，按照下述步骤进行：

（1）对牛奶进行酶解，酶解过程中定时取样，并对所取的样品进行模拟胃肠消化，酶解过程指标为牛奶水解度及其酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性（以 ACE 抑制率为指标）；

所述模拟胃肠消化按以下步骤进行：取酶解产物按照 2%（E/S）加酶量加入胃蛋白酶，酶解 2 h，酶解结束后按照 4%（E/S）加酶量加入胰酶，酶解 4 h，反应结束后于 100℃灭酶 15 min；

（2）制备牛奶大分子降血压肽酶解过程中，定时对酶解液进行快速采集原位实时近红外光谱，采用便携式微小型近红外光谱仪采集数据，采集的光谱波长范围：900-2500 nm）；

（3）对光谱数据进行预处理，具体为采用多项式卷积平滑（sg）的方法对样品光谱数

据进行预处理；

(4) 筛选最佳光谱区间，具体为采用联合区间偏最小二乘回归方法筛选牛奶水解度及其酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性的最佳光谱区间；也可以采用偏最小二乘法、区间偏最小二乘法等方法；

(5) 建立校正和预测模型，具体为采用联合区间最小二乘回归方法，将牛奶水解度及其酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性与原位实时光谱数据建立校正和预测模型，其中校正集（70 个）和预测集（20 个）；

(6) 将上述预测模型应用于制备牛奶大分子降血压肽酶解过程中，利用上述预测模型，对建模外的制备牛奶大分子降血压肽的酶解过程进行原位实时在线监测，预测酶解过程中水解度及其酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性，并计算预测值和实测值的偏差。

6、根据权利要求 1 所述一种基于胃肠消化的大分子多肽的制备过程原位实时监测方法，其特征在于：将牛奶蛋白酶解过程中的在线光谱信息与牛奶蛋白酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性相关联，建立校正和预测模型。

7、根据权利要求 1 所述一种基于胃肠消化的大分子多肽的制备过程原位实时监测方法，其特征在于：利用上述预测模型对建模外的一个制备牛奶蛋白大分子肽的酶解过程进行原位光谱监测，预测酶解过程中牛奶蛋白酶解产物经过胃肠消化后的降血压活性，比较预测值和实测值的残差值。

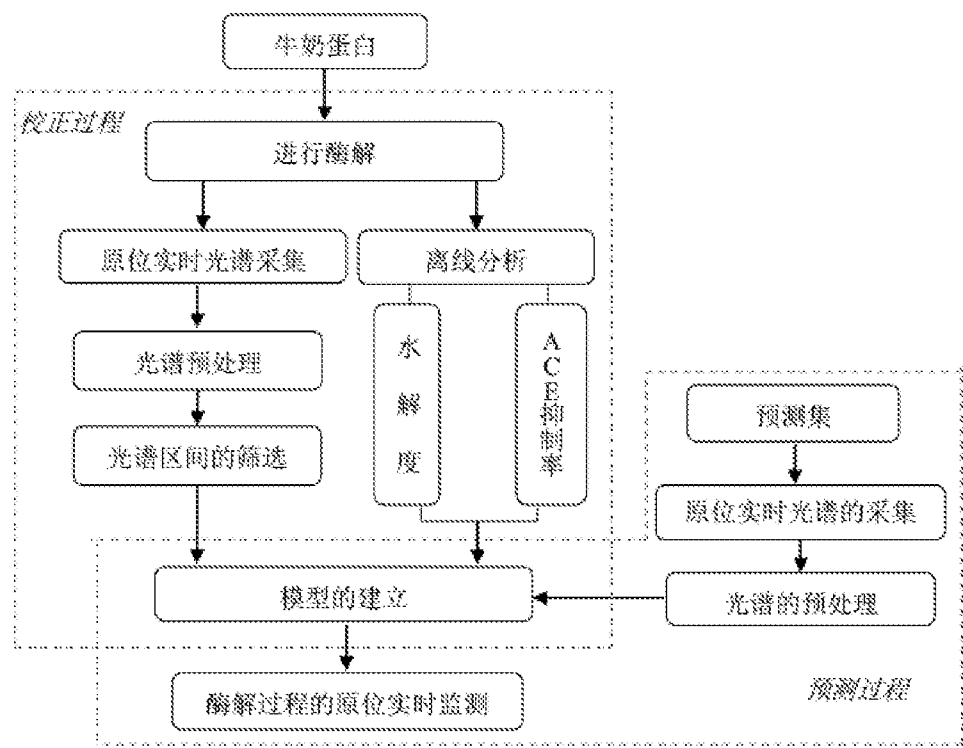


图 1

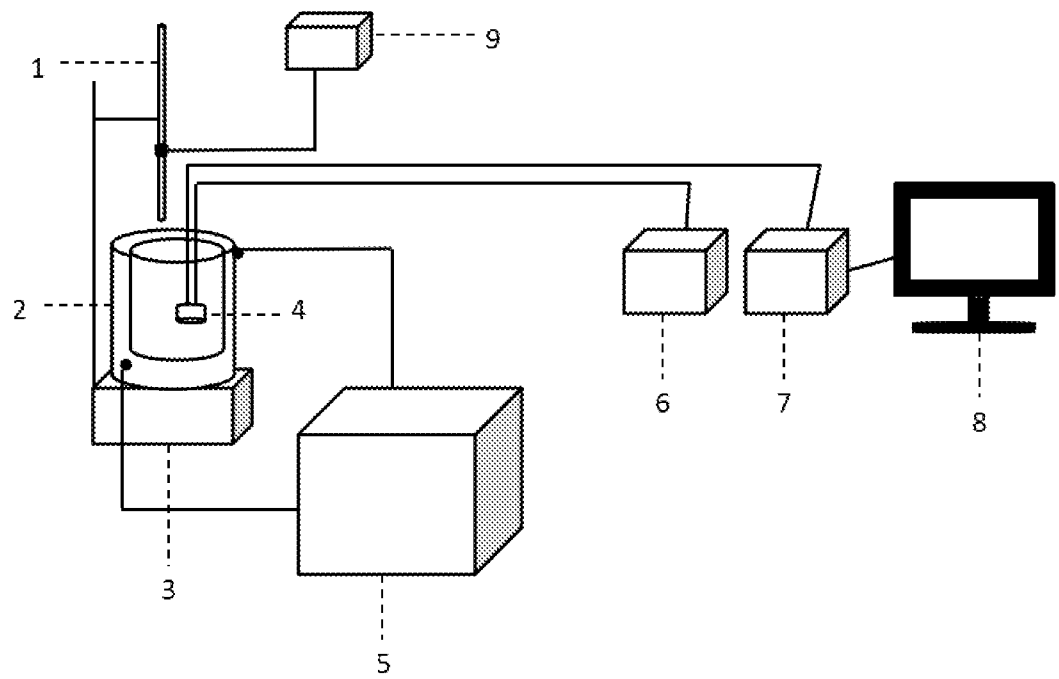


图 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/114949

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12P 21/06(2006.01)i; G01N 21/359(2014.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; CJFD; ISI Web of Science; 万方; WANFANG; 读秀; DUXIU; 江苏大学, 马海乐, 李云亮, 任晓锋, 杨雪, 黄姗芬, 王禹程, 酪蛋白, 玉米醇溶蛋白, 玉米蛋白, 米朊, 醇溶谷蛋白, 大豆分离蛋白, 大豆蛋白, 牛奶, 牛乳, 中性蛋白酶, 胰酶, 胰蛋白酶, 酶解, 水解, 热变性, 热处理, 超声预处理, University Jiangsu, Jiangsu University, Ma Haile, Li Yunliang, Ren Xiaofeng, Yang Xue, Huang Shanfen, Wang Yucheng, casein, zein, soybean protein isolate, soy protein isolate, soybean isolate protein, soy isolate protein, soybean protein, soy protein, milk, neutrase, neutral proteinase, neutral protease, pancreatin, pancreatic enzyme, trypsin, trypsase, trypsinase, enzymolysis, hydrolysis, heat denaturation, thermal denaturation, heat treatment, ultrasound pretreatment

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages              | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| PX        | CN 108004287 A (JIANGSU UNIVERSITY) 08 May 2018 (2018-05-08)<br>claims 5 and 7                  | 1, 3                  |
| PX        | CN 107858390 A (JIANGSU UNIVERSITY) 30 March 2018 (2018-03-30)<br>embodiment 1, and claims 1-15 | 2                     |
| PX        | CN 107858391 A (JIANGSU UNIVERSITY) 30 March 2018 (2018-03-30)<br>claims 1-5                    | 4                     |
| PX        | CN 108107018 A (JIANGSU UNIVERSITY) 01 June 2018 (2018-06-01)<br>claims 1-3                     | 5-7                   |
| X         | CN 1552891 A (NORTHEAST AGRICULTURAL UNIVERSITY) 08 December 2004<br>(2004-12-08)<br>claims 1-8 | 1                     |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&amp;” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 January 2019

Date of mailing of the international search report

30 January 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China (ISA/  
CN)  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing  
100088  
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/114949

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | CN 104970183 A (WILMAR (SHANGHAI) BIOTECHNOLOGY RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER CO., LTD.) 14 October 2015 (2015-10-14)<br>description, paragraphs 0054-0063                                                                                                                              | 3                     |
| X         | CN 105628644 A (JIANGSU UNIVERSITY) 01 June 2016 (2016-06-01)<br>claims 1-7, and figure 1                                                                                                                                                                                               | 5-7                   |
| Y         | 刘志国等 (LIU, Zhiguo et al.). "玉米醇溶蛋白酶解制备ACE抑制肽的研究 (Preparation of ACE Inhibitor from Enzyme-Degested Zein)"<br><i>食品研究与开发 (Food Research and Development)</i> ,<br>Vol. 27, No. 2, 31 December 2006 (2006-12-31),<br>pp. 138-141                                                          | 2                     |
| Y         | WANG, Kai et al. "聚能式逆流脉冲超声预处理对玉米蛋白酶解的影响 (Effect of Energy-Gathered Pulsed Ultrasonic Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis of Corn Gluten Meal)"<br><i>中国农业科技导报 (Journal of Agricultural Science and Technology)</i> ,<br>Vol. 17, No. 5, 31 December 2015 (2015-12-31),<br>pp. 127-133 | 2                     |
| Y         | CN 103329992 A (DALIAN POLYTECHNIC UNIVERSITY) 02 October 2013 (2013-10-02)<br>description, paragraphs 0008-0015                                                                                                                                                                        | 4                     |
| Y         | ULUKO, H. et al. "Effect of Power Ultrasound Pretreatment on Peptidic Profiles and Angiotensin Converting Enzyme Inhibition of Milk Protein Concentrate Hydrolysates"<br><i>J. Sci. Food Agric.</i> , Vol. 94, 11 March 2014 (2014-03-11),<br>pp. 2420-2428                             | 4                     |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2018/114949**

| Patent document cited in search report |           |   | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) |            |    | Publication date (day/month/year) |
|----------------------------------------|-----------|---|-----------------------------------|-------------------------|------------|----|-----------------------------------|
| CN                                     | 108004287 | A | 08 May 2018                       | None                    |            |    |                                   |
| CN                                     | 107858390 | A | 30 March 2018                     | None                    |            |    |                                   |
| CN                                     | 107858391 | A | 30 March 2018                     | None                    |            |    |                                   |
| CN                                     | 108107018 | A | 01 June 2018                      | None                    |            |    |                                   |
| CN                                     | 1552891   | A | 08 December 2004                  | CN                      | 1276090    | C  | 20 September 2006                 |
| CN                                     | 104970183 | A | 14 October 2015                   | None                    |            |    |                                   |
| CN                                     | 105628644 | A | 01 June 2016                      | WO                      | 2017107278 | A1 | 29 June 2017                      |
| CN                                     | 103329992 | A | 02 October 2013                   | CN                      | 103329992  | B  | 24 June 2015                      |

| <b>A. 主题的分类</b><br>C12P 21/06 (2006.01) i; G01N 21/359 (2014.01) i<br><br>按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                     |                                              |      |                   |         |    |                                                               |     |    |                                                                     |   |    |                                                                |   |    |                                                               |     |   |                                                                |   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------|-------------------|---------|----|---------------------------------------------------------------|-----|----|---------------------------------------------------------------------|---|----|----------------------------------------------------------------|---|----|---------------------------------------------------------------|-----|---|----------------------------------------------------------------|---|
| <b>B. 检索领域</b><br>检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)<br>C12P; G01N<br><br>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献<br><br>在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))<br>CNABS; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; CJFD; ISI Web of Science; 万方; 读秀; 江苏大学, 马海乐, 李云亮, 任晓峰, 杨雪, 黄姍芬, 王禹程, 酪蛋白, 玉米醇溶蛋白, 玉米蛋白, 米朮, 醇溶谷蛋白, 大豆分离蛋白, 大豆蛋白, 牛奶, 牛乳, 中性蛋白酶, 胰酶, 胰蛋白酶, 酶解, 水解, 热变性, 热处理, 超声预处理, University Jiangsu, Jiangsu University, Ma Haile, Li Yunliang, Ren Xiaofeng, Yang Xue, Huang Shanfen, Wang Yucheng, casein, zein, soybean protein isolate, soy protein isolate, soybean isolate protein, soy isolate protein, soybean protein, soy protein, milk, neutrase, neutral proteinase, neutral protease, pancreatin, pancreatic enzyme, trypsin, trypsinase, trypsinase, enzymolysis, hydrolysis, heat denaturation, thermal denaturation, heat treatment, ultrasound pretreatment |                                                                     |                                              |      |                   |         |    |                                                               |     |    |                                                                     |   |    |                                                                |   |    |                                                               |     |   |                                                                |   |
| <b>C. 相关文件</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 108004287 A (江苏大学) 2018年 5月 8日 (2018 - 05 - 08)<br/>权利要求5、7</td> <td>1、3</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 107858390 A (江苏大学) 2018年 3月 30日 (2018 - 03 - 30)<br/>实施例1、权利要求1-5</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 107858391 A (江苏大学) 2018年 3月 30日 (2018 - 03 - 30)<br/>权利要求1-5</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 108107018 A (江苏大学) 2018年 6月 1日 (2018 - 06 - 01)<br/>权利要求1-3</td> <td>5-7</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 1552891 A (东北农业大学) 2004年 12月 8日 (2004 - 12 - 08)<br/>权利要求1-8</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>                                                                                                                                                         |                                                                     |                                              | 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 | PX | CN 108004287 A (江苏大学) 2018年 5月 8日 (2018 - 05 - 08)<br>权利要求5、7 | 1、3 | PX | CN 107858390 A (江苏大学) 2018年 3月 30日 (2018 - 03 - 30)<br>实施例1、权利要求1-5 | 2 | PX | CN 107858391 A (江苏大学) 2018年 3月 30日 (2018 - 03 - 30)<br>权利要求1-5 | 4 | PX | CN 108107018 A (江苏大学) 2018年 6月 1日 (2018 - 06 - 01)<br>权利要求1-3 | 5-7 | X | CN 1552891 A (东北农业大学) 2004年 12月 8日 (2004 - 12 - 08)<br>权利要求1-8 | 1 |
| 类 型*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                   | 相关的权利要求                                      |      |                   |         |    |                                                               |     |    |                                                                     |   |    |                                                                |   |    |                                                               |     |   |                                                                |   |
| PX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | CN 108004287 A (江苏大学) 2018年 5月 8日 (2018 - 05 - 08)<br>权利要求5、7       | 1、3                                          |      |                   |         |    |                                                               |     |    |                                                                     |   |    |                                                                |   |    |                                                               |     |   |                                                                |   |
| PX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | CN 107858390 A (江苏大学) 2018年 3月 30日 (2018 - 03 - 30)<br>实施例1、权利要求1-5 | 2                                            |      |                   |         |    |                                                               |     |    |                                                                     |   |    |                                                                |   |    |                                                               |     |   |                                                                |   |
| PX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | CN 107858391 A (江苏大学) 2018年 3月 30日 (2018 - 03 - 30)<br>权利要求1-5      | 4                                            |      |                   |         |    |                                                               |     |    |                                                                     |   |    |                                                                |   |    |                                                               |     |   |                                                                |   |
| PX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | CN 108107018 A (江苏大学) 2018年 6月 1日 (2018 - 06 - 01)<br>权利要求1-3       | 5-7                                          |      |                   |         |    |                                                               |     |    |                                                                     |   |    |                                                                |   |    |                                                               |     |   |                                                                |   |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | CN 1552891 A (东北农业大学) 2004年 12月 8日 (2004 - 12 - 08)<br>权利要求1-8      | 1                                            |      |                   |         |    |                                                               |     |    |                                                                     |   |    |                                                                |   |    |                                                               |     |   |                                                                |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                     |                                              |      |                   |         |    |                                                               |     |    |                                                                     |   |    |                                                                |   |    |                                                               |     |   |                                                                |   |
| * 引用文件的具体类型:<br>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件<br>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利<br>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)<br>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件<br>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件<br>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件<br>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性<br>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性<br>“&” 同族专利的文件                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                     |                                              |      |                   |         |    |                                                               |     |    |                                                                     |   |    |                                                                |   |    |                                                               |     |   |                                                                |   |
| 国际检索实际完成的日期<br><br>2019年 1月 9日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                     | 国际检索报告邮寄日期<br><br>2019年 1月 30日               |      |                   |         |    |                                                               |     |    |                                                                     |   |    |                                                                |   |    |                                                               |     |   |                                                                |   |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中国国家知识产权局 (ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10) 62019451                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                     | 受权官员<br><br>李黎<br><br>电话号码 (86-512) 88996459 |      |                   |         |    |                                                               |     |    |                                                                     |   |    |                                                                |   |    |                                                               |     |   |                                                                |   |

## C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件，必要时，指明相关段落                                                                                                                                                                                                                               | 相关的权利要求 |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| X    | CN 104970183 A (丰益上海生物技术研发中心有限公司) 2015年 10月 14日 (2015 - 10 - 14)<br>说明书第0054-0063段                                                                                                                                                            | 3       |
| X    | CN 105628644 A (江苏大学) 2016年 6月 1日 (2016 - 06 - 01)<br>权利要求1-7, 图1                                                                                                                                                                             | 5-7     |
| Y    | 刘志国 等. "玉米醇溶蛋白酶解制备ACE抑制肽的研究"<br>食品研究与开发, 第27卷, 第2期, 2006年 12月 31日 (2006 - 12 - 31),<br>第138-141页                                                                                                                                              | 2       |
| Y    | 王凯 等. "聚能式逆流脉冲超声预处理对玉米蛋白酶解的影响"<br>中国农业科技导报, 第17卷, 第5期, 2015年 12月 31日 (2015 - 12 - 31),<br>第127-133页                                                                                                                                           | 2       |
| Y    | CN 103329992 A (大连工业大学) 2013年 10月 2日 (2013 - 10 - 02)<br>说明书第0008-0015段                                                                                                                                                                       | 4       |
| Y    | ULUKO, H. 等. "Effect of Power Ultrasound Pretreatment on Peptidic Profiles and Angiotensin Converting Enzyme Inhibition of Milk Protein Concentrate Hydrolysates"<br>J. Sci. Food Agric., 第94卷, 2014年 3月 11日 (2014 - 03 - 11),<br>第2420-2428页 | 4       |

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/114949

| 检索报告引用的专利文件 |           |   | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利          | 公布日<br>(年/月/日)  |
|-------------|-----------|---|----------------|---------------|-----------------|
| CN          | 108004287 | A | 2018年 5月 8日    | 无             |                 |
| CN          | 107858390 | A | 2018年 3月 30日   | 无             |                 |
| CN          | 107858391 | A | 2018年 3月 30日   | 无             |                 |
| CN          | 108107018 | A | 2018年 6月 1日    | 无             |                 |
| CN          | 1552891   | A | 2004年 12月 8日   | CN 1276090    | C 2006年 9月 20日  |
| CN          | 104970183 | A | 2015年 10月 14日  | 无             |                 |
| CN          | 105628644 | A | 2016年 6月 1日    | WO 2017107278 | A1 2017年 6月 29日 |
| CN          | 103329992 | A | 2013年 10月 2日   | CN 103329992  | B 2015年 6月 24日  |