

(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
2011 年 7 月 21 日 (21.07.2011)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2011/085602 A1

(51) 国际专利分类号:

C12P 21/06 (2006.01) A61K 38/02 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2010/077743

(22) 国际申请日: 2010 年 10 月 14 日 (14.10.2010)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201010019415.5 2010 年 1 月 14 日 (14.01.2010) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 华南理工大学 (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 李琳 (LI, Lin) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。李冰 (LI, Bing) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。田应娟 (TIAN, Yingjuan) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。陈玲 (CHEN, Ling) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。朱良 (ZHU, Liang) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。刘国琴 (LIU, Guoqin) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。苏健裕 (SU, Jianyu) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号,

Guangdong 510640 (CN)。李晓玺 (LI, Xiaoxi) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。

(74) 代理人: 广州市华学知识产权代理有限公司 (GUANGZHOU HUAXUE INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国广东省广州市天河区五山华南理工大学国家大学科技园 (北区) 1 号楼 N201-202 室, Guangdong 510640 (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于发明人身份(细则 4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))

[见续页]

(54) Title: PROTEIN HYDROLYSATE, POLYPEPTIDE SOLUTION AND POLYPEPTIDE, PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 蛋白水解液、多肽液和多肽及其制备方法和应用

(57) Abstract: Provided are a protein hydrolysate, a polypeptide solution and a polypeptide, and a preparation method and use thereof. The method comprises steps of: adding extraction agent to brewer's spent grain and obtaining a crude protein or a crude protein solution; preparing a crude protein solution from the crude protein, adjusting pH of the crude protein solution to 6.5-8.5; adding an alkaline protease and heating to 45-65°C to hydrolyze for 1-5 h, obtaining a protein hydrolysate; inactivating the protease in the protein hydrolysate, obtaining a polypeptide solution; separating the polypeptide solution by gel column, collecting peaks and pooling together, and obtaining an active polypeptide. The polypeptide has a hypoglycemic activity.

(57) 摘要:

提供了一种蛋白水解液、多肽溶液和多肽及其制备方法和应用。所述方法包括步骤: 向啤酒糟中加入提取剂, 获得粗蛋白或粗蛋白溶液; 由所述粗蛋白制得粗蛋白溶液, 调整所述粗蛋白溶液的 pH 值至 6.5-8.5; 加入碱性蛋白酶, 加热至 45-65°C 水解 1-5h, 得到蛋白水解液; 将蛋白水解液中的蛋白酶灭活, 得到多肽溶液; 将所述多肽液用凝胶柱分离, 收集峰后合并, 得到活性多肽。所述多肽具有降血糖活性。

WO 2011/085602 A1

- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))
 - 发明人资格(细则 4.17(iv))
- 本国际公布:**
- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

说明书

发明名称: 蛋白水解液、多肽液和多肽及其制备方法和应用

- [1] 技术领域
- [2] 本发明属于食品、保健品和药品领域，特别涉及一种蛋白水解液、多肽液和多肽，以及利用啤酒糟制备这三种物质的方法及其应用。
- [3] 背景技术
- [4] 啤酒糟是啤酒酿造生产的主要废弃物之一。据估计 2010 年我国的啤酒产量将达到 3000 万吨 / 年，啤酒糟产量也将达到 750 万吨 / 年（湿糟）。据测定，其蛋白质含量为 23% ~ 30%（干基），可见啤酒糟是一种很好的蛋白质资源。长期以来，大多数厂家主要是将湿糟作为粗饲料直接低价出售，其收益甚微；有少数厂家则是将啤酒糟直接排放，不仅造成严重的环境污染，还导致资源的浪费。因此开发综合利用啤酒糟成为研究人员的重要任务。
- [5] 生物活性多肽是指具有特殊生理活性的肽类，其消化吸收性能强于氨基酸，其营养和生理效果更为优越，不仅易于消化吸收，还具有抗过敏性，降低胆固醇、血压，增强免疫力等诸多生理功能。近年来，生物活性多肽以其独具的生理活性强、免疫原性低、疗效高等诸多优点，在人类疾病治疗中的地位日趋重要，目前已成为国际研究的热点之一。因此，以啤酒糟为原料，开发制备具有生物活性的多肽，将大大提高啤酒糟的利用率，以此为基础生产高附加值的产品，更会为市场注入广大的利润空间。
- [6] 开发利用啤酒糟的研究早有报道，大部分的研究仅限于利用啤酒糟生产动物饲料，只有少数报导有关于啤酒糟的综合利用，如日本麒麟株式会社开发出从啤酒糟中制取高蛋白的方法；专利文献'啤酒糟生产的生物蛋白'，以啤酒糟为原料，制备出高质量的生物蛋白，但都并未延伸到多肽及其生物活性方面。目前，虽然对天然多肽的生物活性的研究日益增多，但对来源丰富的啤酒糟多肽的制备及活性研究并未见报道。
- [7] 发明内容
- [8] 为了解决上述现有技术的不足之处，本发明的首要目的在于提供一种利用啤酒

糟制备蛋白水解液的方法。

[9] 本发明的另一目的在于提供一种利用啤酒糟制备多肽液的方法。

[10] 本发明的再一目的在于提供一种利用啤酒糟制备多肽的方法。

[11] 本发明的又一目的在于提供一种上述方法制备的蛋白水解液、多肽液或多肽，该多肽液或多肽具有较高的抑制 α - 葡萄糖苷酶即降血糖活性。

[12] 本发明的再一目的在于提供上述蛋白水解液、多肽液或多肽的应用。

[13] 本发明的目的通过下述技术方案实现：一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，包括以下操作步骤：

[14] (1) 在湿啤酒糟或干啤酒糟中加入抽提剂，制得粗啤酒糟蛋白或粗啤酒糟蛋白液；

[15] (2) 将步骤 (1) 所得粗啤酒糟蛋白制成粗啤酒糟蛋白溶液，调节 pH 值至 6.5 ~ 8.5；或将步骤 (1) 所得粗啤酒糟蛋白液，调节 pH 值至 6.5 ~ 8.5；然后加入蛋白酶，加热至 45 ~ 65 °C，在振荡条件下水解 1 ~ 5h，得到蛋白水解液。

[16] 步骤 (2) 所述粗啤酒糟蛋白溶液是向粗啤酒糟蛋白中加入缓冲溶液制备得到，所述缓冲溶液是磷酸氢二钠 - 柠檬酸、磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钾缓冲液、磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲液或磷酸二氢钾 - 氢氧化钠。

[17] 所述缓冲溶液的加入量为 10 ~ 30mL 每克粗啤酒糟蛋白。

[18] 步骤 (2) 所述蛋白酶优选为碱性蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶或木瓜蛋白酶。

[19] 步骤 (2) 所述蛋白酶的加入量优选为 0.1 ~ 0.25mL 每克粗啤酒糟蛋白。

[20] 步骤 (1) 所述抽提剂优选为乙醇 - 氢氧化钠混合液或碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲溶液或氢氧化钠 - 碳酸氢钠缓冲溶液。

[21] 所述乙醇 - 氢氧化钠混合液为体积比为 1 : 2 的乙醇和氢氧化钠溶液混合而成，所述乙醇的体积百分比浓度为 70% ~ 95%，所述氢氧化钠溶液的摩尔浓度为 0.01 ~ 0.10mol/L；所述碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲溶液的 pH 值为 9 ~ 10；所述氢氧化钠 - 碳酸氢钠缓冲溶液 pH 值为 9 ~ 10。

[22] 步骤 (1) 所述抽提剂的加入量优选为每 100g 啤酒糟（以干基计）中加入

1000 ~ 4000 mL 抽提剂，室温下搅拌，过滤去渣，离心，得到粗啤酒糟蛋白液。

- [23] 所述搅拌的时间为 60 ~ 120min；所述离心的转速为 2000 ~ 6000 rpm，时间为 10 ~ 30 min。
- [24] 步骤（1）所述干啤酒糟是将湿啤酒糟进行干燥脱水、粉碎和过筛得到。
- [25] 所述干燥脱水优选为冷冻干燥；所述粉碎采用万能粉碎机进行粉碎；所述过筛为过 100 目筛。
- [26] 步骤（1）所述粗啤酒糟蛋白是将粗啤酒糟蛋白液调节 pH 值至 4.0 ~ 5.0 进行沉淀，去上清液，真空冷冻干燥得到。
- [27] 所述调节 pH 值是采用摩尔浓度为 0.15 ~ 0.2mol/L 的柠檬酸进行调节。
- [28] 一种利用啤酒糟制备多肽液的方法，包括以下操作步骤：根据上述步骤（2）所得蛋白水解液灭酶，离心，得到多肽液。
- [29] 所述灭酶的温度优选为 85°C ~ 95°C，时间为 5 ~ 10min。
- [30] 所述离心的转速优选为 2000 ~ 6000 rpm，时间为 10 ~ 30 min。
- [31] 一种利用啤酒糟制备多肽的方法，包括以下操作步骤：根据上述所得多肽液分离，收集各峰后合并，得到多肽。
- [32] 所述多肽的分子量优选为 1000 ~ 5000。
- [33] 所述分离采用凝胶柱分离，所述凝胶柱为分离范围 < 1500 的葡聚糖凝胶柱或分离范围在 1000 ~ 5000 的葡聚糖凝胶柱。
- [34] 所述凝胶柱分离采用上样量为 0.2 ~ 0.8 克每 100 mL 凝胶柱床层体积，采用 pH 值为 7.0 的缓冲溶液或蒸馏水为洗脱液，洗脱流速 2.0 ~ 6.0 mL/min。
- [35] 所述缓冲溶液为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液或磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液。
- [36] 所述收集是收集 275 ~ 285nm 处有紫外吸收的组分。
- [37] 一种由上述方法制备得到的蛋白水解液。
- [38] 一种由上述方法制备得到的多肽液。
- [39] 一种由上述方法制备得到的多肽。
- [40] 上述蛋白水解液在制备降血糖药物、降血糖功能食品或降血糖功能保健品中

的用途。

[41] 上述多肽液在制备 降血糖药物、 降血糖 功能食品或 降血糖 功能保健品中的用途。

[42] 上述多肽在制备 降血糖药物、 降血糖 功能食品或 降血糖 功能保健品中的用途。

[43] 所述 降血糖 功能食品为 降血糖 功能饮料。

[44] 上述多肽在制备降血糖 功能食品、 降血糖 功能饮料或 降血糖 功能保健品中的用途。

[45] 一种降血糖药物，由上述蛋白水解液制备而成。

[46] 一种降血糖 功能食品，由上述蛋白水解液制备而成。

[47] 一种降血糖 功能保健品，由上述蛋白水解液制备而成。

[48] 一种降血糖药物，由上述多肽液制备而成。

[49] 一种降血糖 功能食品，由上述多肽液制备而成。

[50] 一种降血糖 功能保健品，由上述多肽液制备而成。

[51] 一种降血糖药物，由上述多肽制备而成。

[52] 一种降血糖 功能食品，由上述多肽制备而成。

[53] 一种降血糖 功能保健品，由上述多肽制备而成。

[54] 本发明的原理是：

[55] 1、将冷冻干燥后的啤酒糟分别经过处理 1：万能粉碎机粉碎后过 100 目筛和处理 2：超微粉碎处理，测定处理后原料蛋白质含量以及相同条件下醇 - 碱提取物的蛋白含量；利用凯氏定氮法测定蛋白含量，结果表明，处理 1 均优于处理 2，即啤酒糟的预处理采用万能粉碎机粉碎后过 100 目筛可显著提高目标产物啤酒糟蛋白的纯度至 50% 左右，因此本发明均采用此方法对啤酒糟进行初步蛋白分离。

[56] 2、本发明对蛋白酶水解啤酒糟蛋白条件的优化：考察酶的种类、水解温度、水解时间、液固比、加酶量、pH 值等因素对啤酒糟蛋白水解度 DH 值的影响；以正交试验确定蛋白酶水解啤酒糟蛋白质的优化条件，结果确定用碱性蛋白酶水解啤酒糟蛋白，其最佳条件为：pH8.0、缓冲液与粗啤酒糟蛋白比为 15 mL/g

、加酶量 0.15mL/g 粗啤酒糟蛋白、水解温度 50°C、水解时间 2h，进一步进行验证试验；试验结果显示，在此水解条件下，碱性蛋白酶水解啤酒糟蛋白水解度（以 DH 值表示）DH 值达到 18.54%。

[57] 本发明相对于现有技术，具有如下的优点及有益效果：本发明在制备过程中未引入有害物质，且产品取自天然，来源广泛，使所得天然活性物质经体外试验表明具有明显的降血糖活性，可以作为功能性因子添加到食品中，使其具有一定的降血糖功能。

[58] 附图说明

[59] 图 1 为本发明的工艺流程图。

[60] 图 2 为实施例 2 中粗多肽的 Sephadex G15 凝胶层析图谱。

[61] 具体实施方式

[62] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述，会使本发明的其他目的、特征和优点更为明显，但本发明的权利范围并不限于以下实施例，而且实施例中说明的特征的组合并不一定是本发明的必要特征。其中，附图 1 是工艺流程图，图 2 是粗多肽的 Sephadex G15 凝胶层析图谱。

[63] 实施例 1（工艺流程如图 1 所示）

[64] （1）将湿啤酒糟进行真空冷冻干燥，万能粉碎机粉碎后，过 100 目筛，得到干啤酒糟；按啤酒糟干基计，每 100 g 啤酒糟按固液比 1: 10 加入 1000 mL 抽提剂，所述抽提剂为 95% 乙醇: 0.01 mol/L NaOH = 1: 2（v: v），室温下搅拌 60 min，过滤去渣，用离心机在转速 2000 rpm 下离心 30 min，得到蛋白提取液；将所得蛋白提取液用 0.20 mol/L 柠檬酸调节 pH 为 4.5，进行蛋白质等电点沉淀，去上清液，真空冷冻干燥，得到粗啤酒糟蛋白；

[65] （2）在步骤（1）所得粗啤酒糟蛋白中加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液，调节 pH 值至 6.5；加入碱性蛋白酶，加热至 65°C，在振荡条件下水解 1 h，得到蛋白水解液；所述缓冲溶液的加入量为 10 mL 每克粗啤酒糟蛋白；所述蛋白酶的加入量为 0.15 mL 每克粗啤酒糟蛋白；

[66] （3）将步骤（2）所得蛋白水解液于 95°C 下灭酶 5 min，转速 2000 rpm 下离心 30 min，得到多肽液；

- [67] (4) 将步骤(3)所得多肽液用分离范围<1500的葡聚糖凝胶柱分离并脱盐, 上样量为0.2 g多肽液每100 mL 凝胶柱床层体积, 洗脱液为蒸馏水, 流速2.0 mL/min, 收集在275 nm处有紫外吸收的组分, 得到活性多肽。若要获得固体状活性多肽, 需进行常规的浓缩和冷冻真空干燥, 便得到固体状活性多肽。
- [68] 将所得活性多肽对 α -葡萄糖苷酶活性的影响试验结果表明, 0.3 mg/mL的多肽溶液在蔗糖底物浓度为0.1 mol/L时, 其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率达到最大值45.9%, 即制成具有降血糖活性的活性多肽。
- [69] 利用该方法制得的蛋白水解液、多肽液或活性多肽, 能广泛应用于食品、饮料、药物、保健品等中。该活性多肽具有降血糖的功能, 可广泛用于制得降血糖药物。
- [70] 实施例2
- [71] (1) 将湿啤酒糟进行真空冷冻干燥, 万能粉碎机粉碎后, 过100目筛, 得到干啤酒糟; 按啤酒糟干基计, 每100g啤酒糟按固液比1: 40加入4000mL抽提剂, 所述抽提剂pH9的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液, 室温下搅拌120min, 过滤去渣, 用离心机在转速6000 rpm下离心10min, 得到蛋白提取液; 将所得蛋白提取液用0.30 mol/L柠檬酸调节pH4.0进行蛋白质等电点沉淀, 去上清液, 真空冷冻干燥, 得到粗啤酒糟蛋白;
- [72] (2) 在步骤(1)所得粗啤酒糟蛋白中加入磷酸氢二钠-磷酸二氢钾, 调节pH值至8.5; 加入胰蛋白酶, 加热至45°C, 在振荡条件下水解2 h, 得到蛋白水解液; 所述缓冲溶液的加入量为20mL每克粗啤酒糟蛋白, 所述蛋白酶的加入量为0.25 mL每克粗啤酒糟蛋白;
- [73] (3) 将步骤(2)所得蛋白水解液于85°C下灭酶10 min, 6000 rpm离心10 min, 得到多肽液;
- [74] (4) 将步骤(3)所得多肽液用分离范围<1500的葡聚糖凝胶柱分离并脱盐, 上样量为0.6 g多肽每100 mL 凝胶柱床层体积, 洗脱液为pH值为7.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液, 流速3.0

mL/min, 收集在280 nm处有紫外吸收的组分, 得到活性多肽。若要获得固体状活性多肽, 需进行常规的浓缩和冷冻真空干燥, 便得到固体状活性多肽。层析图谱如图2所示, 多肽液经凝胶柱分离后, 在紫外检测器在280nm处检测, 出现两个明显的峰, 即两种物质, 峰I (洗脱时间为33.8min-52.5min) 和峰II (洗脱时间为52.5min-115.0min)。

[75] 将活性多肽对 α -葡萄糖苷酶活性的影响试验结果表明, 0.2 mg/mL的多肽溶液在蔗糖底物浓度为0.1 mol/L时, 其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率达到30.8%, 即制成具有降血糖活性的活性多肽。

[76] 利用该方法制得的蛋白水解液或多肽准或活性多肽, 能广泛应用于食品、药物、保健品等中。该蛋白水解液或多肽准或活性多肽具有降血糖的功能, 可广泛用于制得具有降血糖功效的保健品中。

[77] 实施例3

[78] (1) 每100 g干啤酒糟按固液比1: 30加入3000 mL抽提剂, 所述抽提剂为pH10的氢氧化钠-碳酸氢钠缓冲溶液, 室温下搅拌70 min, 过滤去渣, 用离心机在转速4000 rpm下离心20min, 得到蛋白提取液; 将所得蛋白提取液用0.15 mol/L柠檬酸调节pH 5.0进行蛋白质等电点沉淀, 去上清液, 真空冷冻干燥, 得到粗啤酒糟蛋白;

[79] (2) 在步骤(1)所得粗啤酒糟蛋白中加入磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液, 调节pH值至7.5; 加入风味蛋白酶, 加热至50°C, 在振荡条件下水解5 h, 得到蛋白水解液; 所述缓冲溶液的加入量为30 mL每克粗啤酒糟蛋白, 所述蛋白酶的加入量为0.10 mL每克粗啤酒糟蛋白;

[80] (3) 将步骤(2)所得蛋白水解液于90°C下灭酶8 min, 3000 rpm离心15 min, 得到多肽液;

[81] (4) 将步骤(3)所得多肽液用分离范围在1000~5000的葡聚糖凝胶柱分离并脱盐, 上样量为0.8 g多肽每100 mL凝胶柱床层体积, 洗脱液为pH值为7.0的磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲溶液, 流速4.0 mL/min, 收集在285 nm处有紫外吸收的组分, 得到活性多肽。若要获得固体状活性多肽, 需进行常规的浓缩和冷冻真空干燥, 便得到固体状活性多肽。

- [82] 将活性多肽对 α -葡萄糖苷酶活性的影响试验结果表明, 0.3 mg/mL的多肽溶液在蔗糖底物浓度为0.15 mol/L时, 其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率达到40.3%, 即制成具有降血糖活性的活性多肽。
- [83] 利用该方法制得的蛋白水解液或多肽液或活性多肽, 能广泛应用于食品、药物、保健品等中。该蛋白水解液或多肽液或活性多肽具有降血糖的功能, 可广泛用于制得功能性饮料。
- [84] 实施例4
- [85] (1) 每100 g干啤酒糟按固液比1: 20加入2000 mL抽提剂, 所述抽提剂为70%乙醇: 0.08 mol/L NaOH = 1: 2 (v: v), 室温下搅拌80 min, 过滤去渣, 用离心机在转速3000 rpm下离心15 min, 得到蛋白提取液; 将所得蛋白提取液用0.25 mol/L柠檬酸调节pH为4.7, 进行蛋白质等电点沉淀, 去上清液, 真空冷冻干燥, 得到粗啤酒糟蛋白;
- [86] (2) 在步骤(1)所得粗啤酒糟蛋白中加入磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲溶液, 调节pH值至7.0; 加入木瓜蛋白酶, 加热至55°C, 在振荡条件下水解3 h, 得到蛋白水解液; 所述缓冲溶液的加入量为25 mL每克粗啤酒糟蛋白, 所述蛋白酶的加入量为0.20 mL每克粗啤酒糟蛋白;
- [87] (3) 将步骤(2)所得蛋白水解液于88°C下灭酶7 min, 转速4000 rpm下离心20 min, 得到多肽液;
- [88] (4) 将步骤(3)所得多肽液用分离范围在1000~5000的葡聚糖凝胶柱分离并脱盐, 上样量为0.3 g多肽每100 mL凝胶柱床层体积, 洗脱液为pH值为7.0的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液, 流速8.0 mL/min, 收集在282 nm处有紫外吸收的组分, 得到活性多肽。若要获得固体状活性多肽, 需进行常规的浓缩和冷冻真空干燥, 便得到固体状活性多肽。
- [89] 将所得活性多肽对 α -葡萄糖苷酶活性的影响试验结果表明, 0.3 mg/mL的多肽溶液在蔗糖底物浓度为0.1 mol/L时, 其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率达到最大值42.3%, 即制成具有降血糖活性的活性多肽。
- [90] 利用该方法制得的蛋白水解液或多肽液或活性多肽, 能广泛应用于食品、药物

、保健品等中。该活性多肽具有降血糖的功能，可广泛用于制得降血糖药物。

[91] 实施例5

[92] (1) 将湿啤酒糟进行真空冷冻干燥，万能粉碎机粉碎后，过100目筛，得到干啤酒糟；按啤酒糟干基计，每100 g啤酒糟按固液比1: 25加入2500 mL抽提剂，所述抽提剂为pH 9的氢氧化钠-碳酸氢钠缓冲溶液，室温下搅拌90 min，过滤去渣，用离心机在转速2800 rpm下离心14 min，得到蛋白提取液；将所得蛋白提取液用0.22 mol/L柠檬酸调节pH为4.6，进行蛋白质等电点沉淀，去上清液，真空冷冻干燥，得到粗啤酒糟蛋白；

[93] (2) 在步骤(1)所得粗啤酒糟蛋白中加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液，调节pH值至7.2；加入碱性蛋白酶，加热至57°C，在振荡条件下水解4 h，得到蛋白水解液；所述缓冲溶液的加入量为15 mL每克粗啤酒糟蛋白，所述蛋白酶的加入量为0.18mL每克粗啤酒糟蛋白；

[94] (3) 将步骤(2)所得蛋白水解液于82°C下灭酶8 min，转速5000 rpm下离心25 min，得到多肽液；

[95] (4) 将步骤(3)所得多肽液用分离范围<1500的葡聚糖凝胶柱分离并脱盐，上样量为0.5 g多肽每100 mL凝胶柱床层体积，洗脱液为pH值为7.0的磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲溶液，流速6.0 mL/min，收集在277 nm处有紫外吸收的组分，得到活性多肽。若要获得固体状活性多肽，需进行常规的浓缩和冷冻真空干燥，便得到固体状活性多肽。

[96] 将所得活性多肽对 α -葡萄糖苷酶活性的影响试验结果表明，0.3 mg/mL的多肽溶液在蔗糖底物浓度为0.1 mol/L时，其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率达到最大值41.6%，即制成具有降血糖活性的活性多肽。

[97] 利用该方法制得的蛋白水解液或多肽液或活性多肽，能广泛应用于食品、药物、保健品等中。该蛋白水解液或多肽液或活性多肽具有降血糖的功能，可广泛用于制得降血糖饮料。

[98] 实施例6

[99] 将本发明利用啤酒糟制得的多肽进行体外降血糖活性的检测，其检测方法如下

，其活性检测结果表明，利用本发明制得的多肽，当多肽浓度在一定值时，具有最佳的降血糖效果。

[100] 1、活性检测方法

[101] 1.1、 α -葡萄糖苷酶活力的测定

[102] 在反应体系中依次加入：pH 6.8磷酸钾缓冲溶液0.6 mL， α -葡萄糖苷酶0.1 mL，蔗糖底物0.1 mL，混匀，在37°C条件下水浴反应10 min，加入0.1 mol/L碳酸钠溶液（Na₂CO₃）1mL终止反应；利用葡萄糖试剂盒测定葡萄糖的含量，设定5.5 mmol/l葡萄糖溶液为标准对照；将在37°C、pH 6.8的条件下，1 L反应体系中每分钟生成1 μ mol葡萄糖定义为一个酶活力单位。

[103] 1.2、啤酒糟多肽对 α -葡萄糖苷酶活性的影响

[104] 取经凝胶过滤层析分离纯化后的多肽液0.3 mL加入到反应体系中（空白对照组加入相同体积的蒸馏水），加pH 6.8磷酸缓冲液0.6 ml，加酶液0.1 ml，37°C水浴10 min，其他方法同酶活力测定；观察啤酒糟多肽对 α -糖苷酶的抑制作用。

[105] 抑制率=（空白组酶活力-抑制剂组酶活力）/空白组酶活力量 $\times$ 100%

[106] 2、活性检测结果

[107] 体外降糖活性检测表明：凝胶分离后两组物质，峰I和峰II，都具有一定的抑制 α -葡萄糖苷酶作用，即降血糖作用。考察多肽浓度对降血糖活性的结果表明，随着多肽浓度的增大，多肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制率先急剧升高，后又急剧降低，且在多肽浓度为0.2 mg/mL $\sim$ 0.4 mg/mL之间时，多肽呈现对 α -葡萄糖苷酶较高的抑制作用；同时，在蔗糖底物浓度逐渐增大的过程中，0.3 mg/mL的多肽溶液对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率均呈现一致减小的趋势。在蔗糖底物浓度为最小0.1 mol/L，啤酒糟多肽对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率达到最大值45.85%，蔗糖底物浓度0.35 mol/L，抑制率为最小，仅为5.56%。

[108] 因此，利用啤酒糟制得多肽后，将该方法制得的多肽应用于制食品、保健品、药品，具有很好的降血糖效果。

[109] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其它的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替

代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于包括以下操作步骤：
- （1）在湿啤酒糟或干啤酒糟中加入抽提剂，制得粗啤酒糟蛋白或粗啤酒糟蛋白液；
- （2）将步骤（1）所得粗啤酒糟蛋白制成粗啤酒糟蛋白溶液，调节 pH 值至 6.5 ~ 8.5；或将步骤（1）所得粗啤酒糟蛋白液，调节 pH 值至 6.5 ~ 8.5；然后加入蛋白酶，加热至 45 ~ 65 °C，在振荡条件下水解 1 ~ 5h，得到蛋白水解液。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于：步骤（2）所述粗啤酒糟蛋白溶液是向粗啤酒糟蛋白中加入缓冲溶液制备得到，所述缓冲溶液是磷酸氢二钠-柠檬酸、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液或磷酸二氢钾-氢氧化钠。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于：所述缓冲溶液的加入量为10~30mL每克粗啤酒糟蛋白。
- [权利要求 4] 根据权利要求1所述的一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于：步骤（2）所述蛋白酶是碱性蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶或木瓜蛋白酶。
- [权利要求 5] 根据权利要求1所述的一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于：步骤（2）所述蛋白酶的加入量为0.1~0.25mL每克粗啤酒糟蛋白。
- [权利要求 6] 根据权利要求1所述的一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于：步骤（1）所述抽提剂为乙醇-氢氧化钠混合液或碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液或氢氧化钠-碳酸氢钠缓冲溶液。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于：所述乙醇-氢氧化钠混合液为体积比为1：2的乙醇和氢

氧化钠溶液混合而成，所述乙醇的体积百分比浓度为70%~95%，所述氢氧化钠溶液的摩尔浓度为0.01~0.10mol/L；所述碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液的pH值为9~10；所述氢氧化钠-碳酸氢钠缓冲溶液pH值为9~10。

- [权利要求 8] 根据权利要求1所述的一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于：步骤（1）所述抽提剂的加入量以啤酒糟干基计，为每100g啤酒糟中加入1000~4000 mL抽提剂，室温下搅拌，过滤去渣，离心，得到粗啤酒糟蛋白液。
- [权利要求 9] 根据权利要求8所述的一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于：所述搅拌的时间为60~120min；所述离心的转速为2000~6000 rpm，时间为10~30 min。
- [权利要求 10] 根据权利要求1所述的一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于：步骤（1）所述干啤酒糟是将湿啤酒糟进行干燥脱水、粉碎和过筛得到。
- [权利要求 11] 根据权利要求10所述的一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于：所述干燥脱水为冷冻干燥；所述粉碎采用万能粉碎机进行粉碎；所述过筛为过100目筛。
- [权利要求 12] 根据权利要求1所述的一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于：步骤（1）所述粗啤酒糟蛋白是将粗啤酒糟蛋白液调节pH值至4.0~5.0进行沉淀，去上清液，真空冷冻干燥得到。
- [权利要求 13] 根据权利要求12所述的一种利用啤酒糟制备蛋白水解液的方法，其特征在于：所述调节pH值是采用摩尔浓度为0.15~0.2mol/L的柠檬酸进行调节。
- [权利要求 14] 一种利用啤酒糟制备多肽液的方法，其特征在于包括以下操作步骤：根据权利要求1步骤（2）所得蛋白水解液灭酶，离心，得到多肽液。
- [权利要求 15] 根据权利要求14所述的一种利用啤酒糟制备多肽液的方法，其特征在于：所述灭酶的温度为85°C~95°C，时间为5~10min。

- [权利要求 16] 根据权利要求14所述的一种利用啤酒槽制备多肽液的方法，其特征在于：所述离心的转速为2000~6000 rpm，时间为10~30 min。
- [权利要求 17] 一种利用啤酒槽制备多肽的方法，其特征在于包括以下操作步骤：根据权利要求14所得多肽液分离，收集各峰后合并，得到多肽。
- [权利要求 18] 根据权利要求17所述的一种利用啤酒槽制备多肽的方法，其特征在于：所述多肽的分子量为1000~5000。
- [权利要求 19] 根据权利要求17所述的一种利用啤酒槽制备多肽的方法，其特征在于：所述分离采用凝胶柱分离，所述凝胶柱为分离范围<1500的葡聚糖凝胶柱或分离范围在1000~5000的葡聚糖凝胶柱。
- [权利要求 20] 根据权利要求19所述的一种利用啤酒槽制备多肽的方法，其特征在于：所述凝胶柱分离采用上样量为0.2~0.8克每100mL凝胶柱床层体积，采用pH值为7.0的缓冲溶液或蒸馏水为洗脱液，洗脱流速2.0~6.0 mL/min。
- [权利要求 21] 根据权利要求20所述的一种利用啤酒槽制备多肽的方法，其特征在于：所述缓冲溶液为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液或磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液。
- [权利要求 22] 根据权利要求17所述的一种利用啤酒槽制备多肽的方法，其特征在于：所述收集是收集275~285nm处有紫外吸收的组分。
- [权利要求 23] 一种由权利要求1~13任一项所述方法制备得到的蛋白水解液。
- [权利要求 24] 一种由权利要求14~16任一项所述方法制备得到的多肽液。
- [权利要求 25] 一种由权利要求17~22任一项所述方法制备得到的多肽。
- [权利要求 26] 根据权利要求23所述的蛋白水解液在制备降血糖药物、降血糖功能食品或降血糖功能保健品中的用途。
- [权利要求 27] 根据权利要求26所述的蛋白水解液在制备中的用途，其特征在于：所述降血糖功能食品为降血糖功能饮料。
- [权利要求 28] 根据权利要求24所述的多肽液在制备降血糖药物、降血糖功能食

品或降血糖功能保健品中的用途。

[权利要求 29] 根据权利要求28所述的蛋白水解液在制备中的用途，其特征在于：
所述降血糖功能食品为降血糖功能饮料。

[权利要求 30] 根据权利要求25所述的多肽在制备降血糖药物、降血糖功能食品
或降血糖功能保健品中的用途。

[权利要求 31] 根据权利要求30所述的蛋白水解液在制备中的用途，其特征在于：
所述降血糖功能食品为降血糖功能饮料。

[权利要求 32] 一种降血糖药物，由权利要求23所述蛋白水解液制备而成。

[权利要求 33] 一种降血糖功能食品，由权利要求23所述蛋白水解液制备而成。

[权利要求 34] 一种降血糖功能保健品，由权利要求23所述蛋白水解液制备而成。
。

[权利要求 35] 一种降血糖药物，由权利要求24所述多肽液制备而成。

[权利要求 36] 一种降血糖功能食品，由权利要求24所述多肽液制备而成。

[权利要求 37] 一种降血糖功能保健品，由权利要求24所述多肽液制备而成。

[权利要求 38] 一种降血糖药物，由权利要求25所述多肽制备而成。

[权利要求 39] 一种降血糖功能食品，由权利要求25所述多肽制备而成。

[权利要求 40] 一种降血糖功能保健品，由权利要求25所述多肽制备而成。

说明书附图

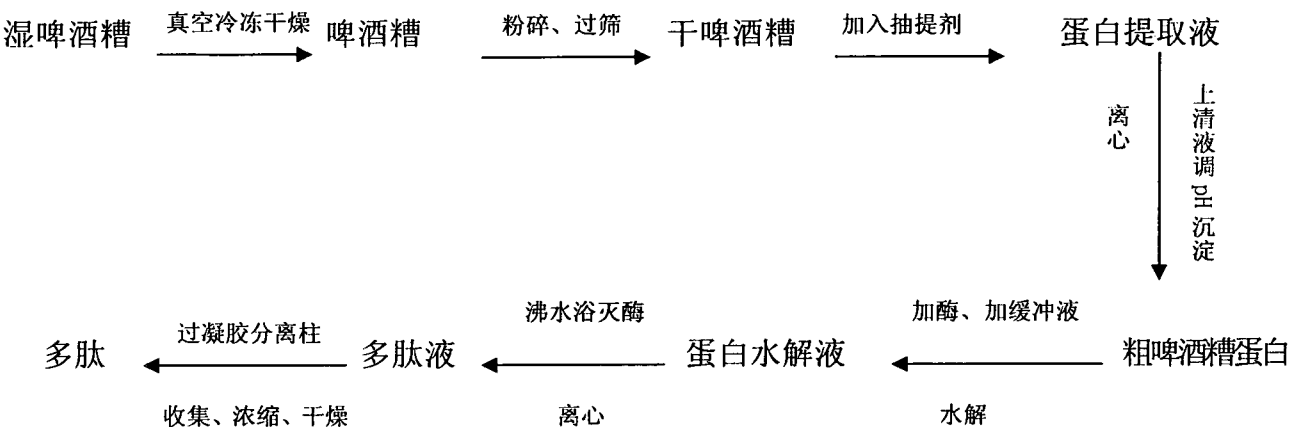


图 1

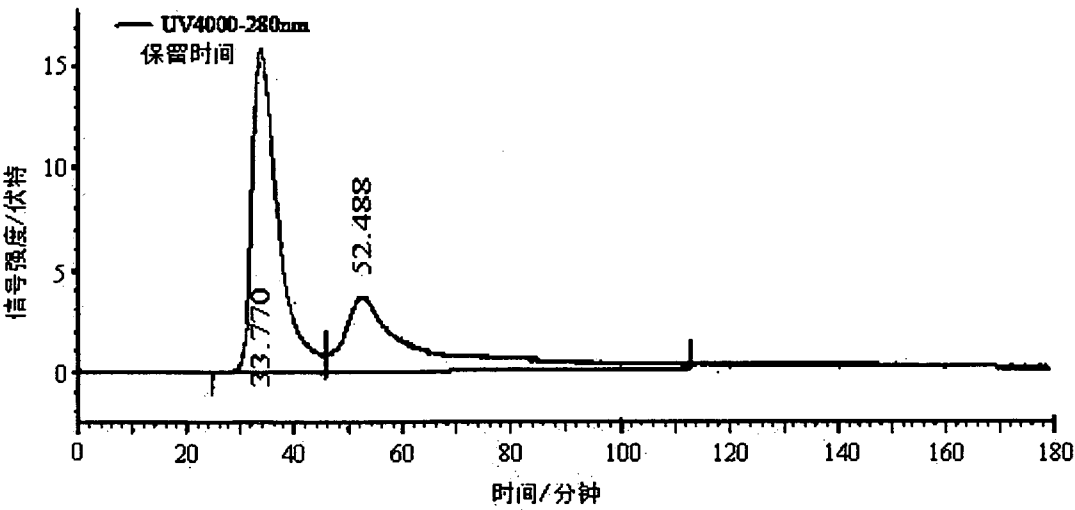


图 2

1/1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/077743

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

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)

IPC: C12P; C07K; A61K; A61P

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)

CPRS; CNKI; WPI; EPODOC; MEDLINE and keywords: beer, brewer, lees, distiller, spent, extract, hydrolysis, peptide, alcohol, alkali, etc., etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LI, Z.D. et al., Studies on extraction of protein from brewer's spent grain by alcohol-alkali method. Journal of Qingdao University of Science and Technology (Natural Science Edition). Feb. 2008, vol. 29, No. 1, pages 19-21	
	page 20, left column, lines 6-10, 16-17, 23 and 32, right column, line 9, page 21, left column, lines 3-4, right column, lines 2-5	1-21, 23-25
A		22, 26-40

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 11 Jan. 2011 (11.01.2011)	Date of mailing of the international search report 27 Jan. 2011 (27.01.2011)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer YANG, Zhenyu Telephone No. (86-10)62411111

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/077743

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LU, H. et al., Studies on extraction process of protein from brewer's spent grain by alcohol-alkali method. LIQUOR MAKING. Jul. 2001, vol. 28, No. 4, pages 106-107	1-21, 23-25
A	page 106, right column, lines 2, 10 and 17, page 107, left column, lines 5 and 17-19, right column, line 2	22, 26-40
Y	CAI J. et al., The hydrolysis of protein of brewer's spent grains with protmex. LIQUOR MAKING. Jan. 2001, vol. 28, No. 1, pages 52-53	1-21, 23-25
A	abstract, page 52, left column, lines 11-14, page 52, left column, section 1.3, page 53, right column, section 4	22, 26-40
Y	CAI J. et al., The hydrolysis of protein of brewer's spent grains with papain. CHINA WESTERN CEREALS & OILS TECHNOLOGY. Jun. 2002, No. 3, pages 38-40	1-21, 23-25
A	abstract, page 38, left column, section 1.3, page 40, right column, section 4	22, 26-40
Y	LU, H. et al., Study on hydrolyzing protein in beer distiller's grains with neutral protease and papoid. BREWAGE OF CHINA. Aug. 2001, No. 4, pages 22-25	1-21, 23-25
A	abstract, page 22, right column, section 1.4, page 24, left column, section 2.2.1-2.2.2	22, 26-40
P, X	CN 101736065 A (UNIV SOUTH CHINA TECHNOLOGY) 16 Jun. 2010 (16.06.2010) claims 1-10	1-21, 23-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2010/077743

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101736065 A	16.06.2010	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/077743

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 21/06 (2006.01) i

C07K 1/14 (2006.01) i

C07K 2/00 (2006.01) i

A61K 38/02 (2006.01) i

A61P 3/10 (2006.01) i

A. 主题的分类

见附加页

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. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12P; C07K; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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))

CPRS; CNKI 和关键词: 啤酒, 糟, 粕, 提取, 水解, 酶解, 肽, 醇, 碱, 等

WPI; EPODOC; MEDLINE 和关键词: beer, brewer, lees, distiller, spent, extract, hydrolysis, polypeptide, alcohol, alkali, etc.

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
Y	李志东 等, 醇-碱法提取啤酒糟中蛋白质. 青岛科技大学学报(自然科学版). 2 月 2008, 第 29 卷, 第 1 期, 第 19-21 页	1-21, 23-25
A	第 20 页左栏第 6-10、16-17、23、32 行, 右栏第 9 行, 第 21 页左栏第 3-4 行, 右栏第 2-5 行	22, 26-40

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“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)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“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

“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

“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

“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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

11.1 月 2011 (11.01.2011)

国际检索报告邮寄日期

27.1 月 2011 (27.01.2011)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

杨振宇

电话号码: (86-10) 62411111

C(续). 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
Y	卢虹 等, 醇-碱法提取啤酒糟中蛋白质工艺的研究. 酿酒. 7 月 2001, 第 28 卷, 第 4 期, 第 106-107 页	1-21, 23-25
A	第 106 页右栏第 2、10、17 行, 第 107 页左栏第 5、17-19 行, 右栏第 2 行	22, 26-40
Y	蔡俊 等, 碱性蛋白酶水解啤酒糟中蛋白质的研究. 酿酒. 1 月 2001, 第 28 卷, 第 1 期, 第 52-53 页	1-21, 23-25
A	摘要, 第 52 页左栏第 11-14 行, 第 52 页左栏第 1.3 节, 第 53 页右栏第 4 节	22, 26-40
Y	蔡俊 等, 木瓜蛋白酶水解啤酒糟中蛋白质的研究. 西部粮油科技. 6 月 2002, 第 3 期, 第 38-40 页	1-21, 23-25
A	摘要, 第 38 页左栏第 1.3 节, 第 40 页左栏第 4 节	22, 26-40
Y	卢虹 等, 中性蛋白酶和木瓜蛋白酶水解啤酒糟中蛋白质的研究. 中国酿造. 8 月 2001, 第 4 期, 第 22-25 页	1-21, 23-25
A	摘要, 第 22 页右栏第 1.4 节, 第 24 页第 2.2.1-2.2.2 节	22, 26-40
P, X	CN 101736065 A (华南理工大学) 16.6 月 2010 (16.06.2010) 权利要求 1-10	1-21, 23-40

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/077743

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 101736065 A	16.06.2010	无	

主题的分类

C12P 21/06 (2006.01) i

C07K 1/14 (2006.01) i

C07K 2/00 (2006.01) i

A61K 38/02 (2006.01) i

A61P 3/10 (2006.01) i