

(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
2016年11月3日 (03.11.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/172979 A1

- (51) 国际专利分类号:
A23J 3/16 (2006.01) A23J 3/34 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/078137
- (22) 国际申请日: 2015年4月30日 (30.04.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 中国食品发酵工业研究院 (CHINA NATIONAL RESEARCH INSTITUTE OF FOOD AND FERMENTATION INDUSTRIES) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。
- (72) 发明人: 蔡木易 (CAI, Muyi); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。谷瑞增 (GU, Ruizeng); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。鲁军 (LU, Jun); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。马涛 (MA, Tao); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。潘兴昌 (PAN, Xingchang); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。董哲 (DONG, Zhe); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。马勇 (MA, Yong); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。徐亚光 (XU, Yaguang); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。马永庆 (MA, Yongqing); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。金振涛 (JIN, Zhentao); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。陈亮 (CHEN, Liang); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。陆路 (LU, Lu); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。刘文颖 (LIU, Wenyang); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。魏颖 (WEI, Ying); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。张海欣 (ZHANG, Haixin); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。刘艳

(LIU, Yan); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。曹珂璐 (CAO, Kelu); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。王憬 (WANG, Jing); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。李国明 (LI, Guoming); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。周明 (ZHOU, Ming); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。陈辉 (CHEN, Hui); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。李佳弄 (LI, Jiaji); 中国北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼, Beijing 100015 (CN)。

- (74) 代理人: 北京同立钧成知识产权代理有限公司 (LEADER PATENT & TRADEMARK FIRM); 中国北京市海淀区西直门北大街32号枫蓝国际A座8F-6, Beijing 100082 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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:

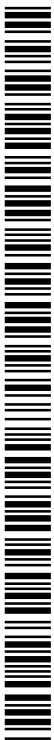
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) Title: HYPOALLERGENIC, BITTERNESS-REDUCED SOYBEAN OLIGOPEPTIDE, PREPARATION METHOD FOR SAME, AND APPLICATIONS THEREOF

(54) 发明名称: 一种低致敏低苦味大豆低聚肽及其制备方法和应用

(57) Abstract: Provided in the present invention are a hypoallergenic, bitterness-reduced soybean oligopeptide, a preparation method for same, and applications thereof. The preparation method comprises: 1) heat denaturing a soybean protein solution; 2) when the pH value is adjusted to 6-9, adding a neutral protease and papaya proteinase for a first enzymolysis; 3) adding an alkaline protease and a flavourzyme for a second enzymolysis; and 4) producing the hypoallergenic, bitterness-reduced soybean oligopeptide by means of centrifugation and membrane filtration.

(57) 摘要: 本发明提供一种低致敏低苦味大豆低聚肽及其制备方法和应用。该制备方法包括: 1) 将大豆蛋白溶液进行热变性; 2) 调节pH值至6-9后, 加入中性蛋白酶和木瓜蛋白酶进行第一酶解; 3) 加入碱性蛋白酶和风味蛋白酶进行第二酶解; 4) 离心, 膜过滤, 得到低致敏低苦味大豆低聚肽。



WO 2016/172979 A1

一种低致敏低苦味大豆低聚肽及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及一种大豆低聚肽，特别是涉及一种低致敏低苦味大豆低聚肽及其制备方法和应用。

背景技术

大豆蛋白是一种植物性蛋白，其氨基酸组成与牛奶蛋白相近，各种必需氨基酸含量均较为丰富，在营养价值上可与动物蛋白等同，在基因结构上也最接近人体氨基酸，是最具营养的植物蛋白。然而，大豆蛋白中存在多种致敏原，例如大豆球蛋白、 β -伴球蛋白、P34、GlymBd 28K 等，其中大豆球蛋白和 β -伴球蛋白是大豆中蛋白质的主要构成成分，二者约占到 70%；而有些大豆蛋白例如大豆胰蛋白酶抑制剂（STI）在常规生产过程中（例如高温条件下）结构依然保持稳定，因此常常被用作检测大豆过敏蛋白的指示剂。目前，大约有 1~6%的婴儿会受到大豆致敏原的影响而产生呼吸、皮肤、胃肠道症状等大豆过敏反应，并且随着大豆产品越来越多，成年人大豆过敏的发病率也在不断上升。

对大豆蛋白进行脱敏的方法包括热处理、化学处理、发酵法、酶法等。热处理是最常用的大豆致敏原脱敏方法，其能改变大豆蛋白的结构并降低抗原蛋白的致敏活性，然而由于 P34 蛋白中表面抗原决定簇结构的复杂性，不可能仅依靠加热使蛋白质变性而较为彻底地消除其致敏作用。化学处理主要是利用化学试剂来降低胰蛋白酶抑制剂的活性，然而其不可避免地会产生化学残留等食品安全问题。

发酵法主要利用霉菌、枯草芽孢杆菌等微生物来降解大豆制品中的抗原蛋白，尽管发酵可将大豆蛋白水解成致敏性较低的小分子肽，然而水解蛋白中是否保留被抗体识别的必要构象仍成问题。例如公开号为 CN101990984A 的专利公开了一种饲用高抗氧化低致敏性发酵豆粕制备方法，采用米曲霉对豆粕发酵基料进行发酵，尽管发酵后大分子蛋白被明显降解，然而其并未对发酵产品的致敏性进行检测，因此无法确定发酵产品中是否仍然存在致敏大豆片段；此外该方法没有对发酵产品的口感进行评价。Herian 等人用放射变应原吸附测定法（RAST）检测了五种传统的大豆发酵制品的致敏性，其中包括豆芽、酸水解酱油、霉菌水解酱油、豆豉和豆酱，结果表明五种大豆发酵制品与过敏患者血清 IgE 结合的能力相当，由此说明尽管大豆蛋白被水解为小分子肽，然而在某种程度上仍然存在致敏大

豆蛋白或片段。

酶法是通过特定的酶来水解大豆中的抗原蛋白，其作用效果受到酶的种类、水解前处理方式、水解程度等诸多因素的影响；特别是，大豆蛋白中存在多种致敏原，并且其表面抗原决定簇结构复杂，如何能够同时对多种致敏原进行降解以彻底地消除其致敏作用也成问题。此外，酶水解虽然可有效破坏大豆抗原蛋白的抗原表位，但也存在使一些隐藏在蛋白三维结构内部或疏水区的线性抗原表位暴露出来而使酶解产物具有新的致敏性的担忧。同时，酶法降解过程中还会导致大豆蛋白中的苦味涩味成分释放，从而影响产品的口感和实际应用。

10 发明内容

本发明提供一种低致敏低苦味大豆低聚肽及其制备方法和应用，用于解决现有技术中无法彻底消除大豆蛋白的致敏性以及产品口感不佳等技术缺陷。

本发明提供的低致敏低苦味大豆低聚肽的制备方法，包括如下步骤：

- 1) 将大豆蛋白粉与水混合制成大豆蛋白溶液后，对大豆蛋白溶液进行热变性，制得变性蛋白溶液；
- 2) 调节所述变性蛋白溶液的 pH 值至 6~9 后，加入中性蛋白酶和木瓜蛋白酶进行第一酶解，制得第一酶解液；
- 3) 向所述第一酶解液中加入碱性蛋白酶和风味蛋白酶进行第二酶解，灭酶后，制得第二酶解液；
- 4) 将所述第二酶解液离心后，对离心上清液进行膜过滤，制得低致敏低苦味大豆低聚肽。

本发明采用的大豆蛋白粉中蛋白质的质量含量 >60%，进一步为 60~95%；在制备大豆蛋白溶液时，可控制大豆蛋白粉与水的质量体积比为 1: (5~10)，即：1kg 的大豆蛋白粉与 5~10L 的水进行混合制备大豆蛋白溶液。大豆蛋白溶液的浓度过高（质量体积比 >1: 5）时溶液较为粘稠，其流动性差，易导致酶解效率降低；而浓度过低（质量体积比 <1: 10）时反应体积过大，会影响后续处理（例如膜过滤、浓缩等），此外成本也会相应增加。

进一步地，所述热变性包括：将大豆蛋白溶液加热至 70~90℃ 后，保温并持续搅拌 20~60min。该热变性处理能够破坏大豆蛋白的空间结构，从而降低大豆蛋白的致敏性；同时还可解决大豆蛋白溶液流动性差，溶液粘稠的问题，有利于后续酶解的进行。

5 本发明人对于采用酶法彻底消除大豆蛋白的致敏性同时抑制酶解产物中苦味涩味物质的产生做了大量的研究，结果发现大多数的蛋白酶无法较为彻底消除大豆蛋白的致敏性和/或抑制酶解产物中苦味涩味物质的产生。例如，菠萝蛋白酶对消除大豆蛋白致敏性作用不明显；中性蛋白酶在一定程度上能够消除大豆蛋白的致敏性，然而酶解产物中出现苦味物质并且无法去除。发明人在研究过程中意外地发现，只有首先采用由中性蛋白酶和木瓜蛋白酶组成的复合酶进行第一酶解，随后采用由碱性蛋白酶和风味蛋白酶组成的复合酶进行后续酶解（第二酶解）才能够较为彻底地消除大豆蛋白的致敏性同时抑制酶解产物中苦味涩味物质的产生。

10 特别是，在本发明的第一酶解中，所述中性蛋白酶的用量为 10~100U/g，所述木瓜蛋白酶的用量为 10~100U/g，所述第一酶解在 30~60℃ 的温度下进行，并且控制第一酶解的时间为 1~3h。进一步地，所使用中性蛋白酶与木瓜蛋白酶的用量比为 1: (1~3)，例如中性蛋白酶的用量为 10 U/g 时，木瓜蛋白酶的用量为 10~30U/g。中性蛋白酶与木瓜蛋白酶的结合使用有利于在充分降解大豆蛋白以消除其致敏性的同时控制苦味涩味成分的释放，并改善酶解产物的口感。

15 在本发明的第二酶解中，所述碱性蛋白酶的用量为 10~100U/g，所述风味蛋白酶的用量为 10~100U/g，所述第二酶解在 30~60℃ 的温度下进行，并且控制第二酶解的时间为 1~3h。进一步地，控制第二酶解在 pH 值为 5~8 的条件下进行，即，如果第一酶解液的 pH 值不在 5~8 的范围内，调节第一酶解液的 pH 值至 5~8 后加入碱性蛋白酶和风味蛋白酶进行第二酶解；并且，所使用的碱性蛋白酶与风味蛋白酶的用量比为 1: (1~4)，
20 例如碱性蛋白酶的用量为 10 U/g 时，风味蛋白酶的用量为 10~40U/g。第一酶解或第二酶解的时间过短 (<1h) 均不利于蛋白的降解，而时间过长 (>3h) 可能导致苦味涩味物质的产生。

在第一酶解后同时采用碱性蛋白酶和风味蛋白酶继续进行酶解有利于进一步对第一酶解产物进行降解以消除大豆蛋白的致敏性，同时可控制苦味涩味成分的释放并改善酶解
25 产物口感，两步酶解可将大豆蛋白中的主要致敏蛋白（包括大豆球蛋白和 β -伴球蛋白）以及胰蛋白酶抑制剂的总含量降低 99% 以上。此外，两步酶解有利于将大豆蛋白充分降解为分子量较小的低聚肽（例如分子量小于 1000Da 的肽），从而有利于提高大豆蛋白的利用率。

在本发明中，各酶的用量是基于大豆蛋白粉的重量，即，在采用 1g 大豆蛋白粉制备大豆蛋白溶液时，使用 10~100U 的中性蛋白酶。进一步地，在 110~120℃ 的温度下进行
30 所述灭酶，并且控制灭酶的时间为 10~30min。

进一步地，可控制步骤 4) 中所述离心的转速为 2000~6000 r/min，离心可采用常规设备进行，例如卧螺离心机、管式离心机等。此外，可采用孔径为 1~200nm 的滤膜进行所述膜过滤，孔径进一步可为 1~50nm；膜过滤时，可控制膜过滤的绝对压力为 0.2~0.4MPa，温度为 30~80℃。对第二酶解液的离心上清液进行膜过滤，可进一步地截留分子量较大的成分，从而最大限度地去除酶解液中的大分子致敏蛋白组分。

在本发明中，在膜过滤后，可对滤液进行脱色和浓缩。具体地，可以采用常规脱色剂进行脱色，脱色剂例如可以为活性碳粉，脱色剂与滤液的质量配比可以为 (5~10): 100，脱色的温度可控制在 70~90℃，例如 80℃，脱色时间可以为 20~40 min，脱色可在搅拌下进行。在脱色后，可通过过滤等常规方式去除脱色剂，例如板框过滤。进一步地，可对去除脱色剂的滤液进行蒸发以浓缩滤液，例如可采用双效降膜蒸发器进行蒸发浓缩，并且可控制蒸发时的蒸汽压为 $0.1\pm 0.02\text{MPa}$ ，蒸发温度为 40~80℃，经浓缩后，浓缩液的体积可降至原体积的 1/3~1/2。进一步地，在浓缩后可进行灭菌和干燥，从而制得低致敏低苦味大豆低聚肽粉，干燥例如可以为喷雾干燥。

本发明还提供一种低致敏低苦味大豆低聚肽，按照上述任一所述制备方法制得，所述低致敏低苦味大豆低聚肽中大豆球蛋白的含量 $< 200\text{mg/kg}$ ， β -伴球蛋白的含量 $< 150\text{mg/kg}$ ，大豆胰蛋白酶抑制剂的含量 $< 100\text{mg/kg}$ ；进一步地，所述低致敏低苦味大豆低聚肽中大豆球蛋白的含量 $< 125\text{ mg/kg}$ ， β -伴球蛋白的含量 $< 90\text{ mg/kg}$ ，大豆胰蛋白酶抑制剂的含量 $< 50\text{ mg/kg}$ 。

进一步地，所述低致敏低苦味大豆低聚肽中分子量小于 5000Da 的肽的质量含量 $> 85\%$ ，分子量小于 1000Da 的肽的质量含量 $> 60\%$ ；更进一步地，所述低致敏低苦味大豆低聚肽中分子量小于 5000Da 的肽的质量含量 $> 95\%$ ，分子量小于 1000Da 的肽的质量含量 $> 85\%$ 。

本发明还提供上述低致敏低苦味大豆低聚肽在奶粉或保健食品中的应用。其中，所述奶粉可包括婴幼儿奶粉、成人奶粉、中老年奶粉等。

本发明的方法在对大豆蛋白热变性后利用四种特定的蛋白酶分两步进行酶解，不仅克服了大豆蛋白致敏原种类多且表面抗原决定簇结构复杂而无法较为彻底消除其致敏作用的问题，大豆蛋白的主要致敏蛋白大豆球蛋白、 β -伴球蛋白和大豆胰蛋白酶抑制剂的总含量降低 99%以上；此外，该方法避免了大豆蛋白中的苦味涩味成分的释放，从而保证了产品的口感。本发明的方法工艺简单，适合大规模生产，所制得的低致敏低苦味大豆低聚肽应用范围广泛。

具体实施方式

为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明的实施例，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本发明一部分实
5 施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

本发明采用的各蛋白酶均购自诺维信生物技术有限公司。

实施例 1

1、热变性

10 将 500 kg 蛋白含量为 60%左右的大豆蛋白粉加入反应罐后，向反应罐中加入 4000L 水，搅拌混匀制成大豆蛋白溶液后，将大豆蛋白溶液加热至 80℃左右，保温并持续搅拌约 40min，制得变性蛋白溶液。

2、第一酶解

15 待上述变性蛋白溶液的温度降至 50℃左右后，调节其 pH 值至 7 左右，向变性蛋白溶液中加入中性蛋白酶和木瓜蛋白酶，其中中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的用量均为 50U/g 大豆蛋白粉左右，维持在 50℃左右的温度下进行第一酶解，第一酶解约 3h 后，制得第一酶解液。

3、第二酶解

20 向上述第一酶解液中继续加入碱性蛋白酶和风味蛋白酶，其中碱性蛋白酶的用量为 50U/g 大豆蛋白粉左右，风味蛋白酶的用量为 100U/g 大豆蛋白粉左右，维持在 50℃左右的温度下进行第二酶解，第二酶解约 2h 后，将酶解液加热至 120℃灭酶 20 min，制得第二酶解液。

4、离心、膜过滤

在 4000 r/min 的转速下对第二酶解液进行离心，收集离心上清液备用；

25 采用孔径为 50nm 左右的陶瓷膜对离心上清液进行过滤，控制过滤的绝对压力为 0.3MPa 左右，温度 50℃左右，得到滤液。

5、脱色、浓缩、灭菌

向滤液中加入活性碳粉，活性碳粉与滤液的质量配比为 10: 100，在 80℃左右的温度下搅拌 30min 左右进行脱色，脱色后板框过滤去除活性碳粉，得到脱色液；

30 对脱色液进行蒸发浓缩，控制蒸汽压为 0.1MPa 左右，蒸发温度为 60℃左右，使脱色

液浓缩至原体积的 1/2 后，浓缩液经灭菌、喷雾干燥后，制得低致敏低苦味大豆低聚肽。

6、质量检测及口感评价

采用 Glycincin ELISA Kit (Unibiotest 公司) 和 β -conglycinin ELISA Kit (Unibiotest 公司) 分别检测低致敏低苦味大豆低聚肽中大豆球蛋白和 β -伴球蛋白的含量，采用 Soy Allergens 试剂盒 (ELISASYSTEM 公司) 检测低致敏低苦味大豆低聚肽中大豆胰蛋白酶抑制剂的含量，同时以未经任何处理的大豆蛋白溶液作为空白对照，质量检测结果见表 1。

参照 GB/T 22729-2008 对上述制备的低致敏低苦味大豆低聚肽中各组分的分子量分布进行检测，结果见表 2。

将上述制备的低致敏低苦味大豆低聚肽溶于水中，制成质量含量为 10% 的低致敏低苦味大豆低聚肽溶液；组织 20 人评定小组（男女各半）对低致敏低苦味大豆低聚肽溶液进行苦味评价，评价方法为：取 1mL 低致敏低苦味大豆低聚肽溶液，对其进行梯度稀释至刚好尝出苦味为止，将稀释倍数计为苦味值，计算 20 人的平均苦味值，结果见表 3。

实施例 2

15 1、热变性

将 500 kg 蛋白含量为 65% 左右的大豆蛋白粉加入反应罐后，向反应罐中加入 5000L 水，搅拌混匀制成大豆蛋白溶液后，将大豆蛋白溶液加热至 90℃ 左右，保温并持续搅拌约 20min，制得变性蛋白溶液。

20 2、第一酶解

待上述变性蛋白溶液的温度降至 40℃ 左右后，调节其 pH 值至 8 左右，向变性蛋白溶液中加入中性蛋白酶和木瓜蛋白酶，其中中性蛋白酶的用量为 10U/g 大豆蛋白粉左右，木瓜蛋白酶的用量为 30U/g 大豆蛋白粉左右，维持在 40℃ 左右的温度下进行第一酶解，第一酶解约 2h 后，制得第一酶解液。

25 3、第二酶解

向上述第一酶解液中继续加入碱性蛋白酶和风味蛋白酶，其中碱性蛋白酶和风味蛋白酶的用量均为 75U/g 大豆蛋白粉左右，维持在 40℃ 左右的温度下进行第二酶解，第二酶解约 3h 后，将酶解液加热至 110℃ 灭酶 30 min，制得第二酶解液。

4、离心、膜过滤

在 3500 r/min 的转速下对第二酶解液进行离心，收集离心上清液备用；

30 采用孔径为 200nm 左右的滤膜对离心上清液进行过滤，控制过滤的绝对压力为

0.4MPa 左右，温度 80℃左右，得到滤液。

5、脱色、浓缩、灭菌

向滤液中加入活性碳粉，活性碳粉与滤液的质量配比为 5: 100，在 80℃左右的温度下搅拌 30min 左右进行脱色，脱色后板框过滤去除活性碳粉，得到脱色液；

- 5 对脱色液进行蒸发浓缩，控制蒸汽压为 0.1MPa 左右，蒸发温度为 80℃左右，使脱色液浓缩至原体积的 1/3 后，浓缩液经灭菌、喷雾干燥后，制得低致敏低苦味大豆低聚肽；该低致敏低苦味大豆低聚肽的质量检测结果、分子量分布和口感评价结果分别见表 1 至表 3。

10 实施例 3

1、热变性

将 500 kg 蛋白含量为 70%左右的大豆蛋白粉加入反应罐后，向反应罐中加入 2500L 水，搅拌混匀制成大豆蛋白溶液后，将大豆蛋白溶液加热至 70℃左右，保温并持续搅拌约 60min，制得变性蛋白溶液。

15 2、第一酶解

待上述变性蛋白溶液的温度降至 60℃左右后，调节其 pH 值至 6 左右，向变性蛋白溶液中加入中性蛋白酶和木瓜蛋白酶，其中中性蛋白酶的用量为 50U/g 大豆蛋白粉左右，木瓜蛋白酶的用量为 100U/g 大豆蛋白粉左右，维持在 60℃左右的温度下进行第一酶解，第一酶解约 1h 后，制得第一酶解液。

20 3、第二酶解

向上述第一酶解液中继续加入碱性蛋白酶和风味蛋白酶，其中碱性蛋白酶的用量为 40U/g 大豆蛋白粉左右，风味蛋白酶的用量为 160U/g 大豆蛋白粉左右，维持在 60℃左右的温度下进行第二酶解，第二酶解约 1h 后，将酶解液加热至 120℃灭酶 20 min，制得第二酶解液。

25 4、离心、膜过滤

在 4000 r/min 的转速下对第二酶解液进行离心，收集离心上清液备用；

采用孔径为 50nm 左右的滤膜对离心上清液进行膜过滤，控制膜过滤的绝对压力为 0.2MPa 左右，温度 30℃左右，得到滤液。

5、脱色、浓缩、灭菌

- 30 向滤液中加入活性碳粉，活性碳粉与滤液的质量配比为 8: 100，在 80℃左右的温度

下搅拌 30min 左右进行脱色，脱色后板框过滤去除活性碳粉，得到脱色液；

对脱色液进行蒸发浓缩，控制蒸汽压为 0.1MPa 左右，蒸发温度为 60℃左右，使脱色液浓缩至原体积的 1/3 后，浓缩液经灭菌、喷雾干燥后，制得低致敏低苦味大豆低聚肽；该低致敏低苦味大豆低聚肽的质量检测结果、分子量分布和口感评价结果分别见表 1 至表 5 3。

对照例 1

将实施例 1 制备的变性蛋白溶液降至 40℃左右后，调节其 pH 值至 8 左右，按照用量 100U/g 大豆蛋白粉左右向变性蛋白溶液中加入中性蛋白酶，维持在 40℃左右的温度下酶解约 5h 后，将酶解液按照实施例 1 方法依次进行离心、浓缩、灭菌、干燥，制得大豆肽，其质量检测结果和口感评价结果分别见表 1 和表 3。

对照例 2

将实施例 1 制备的变性蛋白溶液降至 50℃左右后，调节其 pH 值至 7 左右，按照用量 250U/g 大豆蛋白粉左右向变性蛋白溶液中加入菠萝蛋白酶，维持在 50℃左右的温度下酶解约 5h 后，将酶解液按照实施例 1 方法依次进行离心、浓缩、灭菌、干燥，制得大豆肽，其质量检测结果和口感评价结果分别见表 1 和表 3。

对照例 3

将实施例 1 制备的第二酶解液，不经过膜过滤和脱色而直接按照实施例 1 方法依次进行离心、浓缩、灭菌、干燥，制得大豆肽，其质量检测结果和口感评价结果分别见表 1 和表 3。

表 1 各大豆肽的质量检测结果

试验例	大豆球蛋白含量	β-伴球蛋白含量	大豆胰蛋白酶抑制剂含量
空白对照	3.78×10 ⁵ mg/kg	2.98×10 ⁵ mg/kg	1.57×10 ⁴ mg/kg
实施例 1	124.72mg/kg	79.95mg/kg	46.74mg/kg
实施例 2	56.84mg/kg	68.69mg/kg	31.97mg/kg
实施例 3	117.48mg/kg	85.85mg/kg	46.53mg/kg

对照例 1	$6.78 \times 10^4 \text{mg/kg}$	$4.11 \times 10^4 \text{mg/kg}$	$8.24 \times 10^3 \text{mg/kg}$
对照例 2	$3.52 \times 10^4 \text{mg/kg}$	$2.45 \times 10^4 \text{mg/kg}$	$5.42 \times 10^3 \text{mg/kg}$
对照例 3	$6.80 \times 10^3 \text{mg/kg}$	$5.82 \times 10^3 \text{mg/kg}$	708.42mg/kg

由表 1 结果可知：

1、本发明制备的低致敏低苦味大豆低聚肽中，致敏蛋白大豆球蛋白、 β -伴球蛋白以及大豆胰蛋白酶抑制剂的含量显著降低，三种蛋白的总质量含量可降低 99%以上，说明本发明方法能够较为彻底地消除大豆蛋白的致敏性，脱敏效果良好。

5 2、采用菠萝蛋白酶对大豆蛋白进行处理时消除大豆蛋白致敏性作用不明显；采用中性蛋白酶对大豆蛋白进行处理时能够在一定程度上能够消除大豆蛋白的致敏性，但脱敏效果一般。

3、仅通过酶解工艺无法完全消除大豆的过敏原蛋白组分，而只有在本发明的复合酶解工艺的基础上结合特定的膜过滤以及脱色等工艺才能够最大限度地消除大豆过敏原。

10 由此说明：并非任意的蛋白酶或其组合对大豆蛋白进行处理时均可降低或消除大豆蛋白的致敏性，而只有采用特定组成的蛋白酶并采用特定工艺（例如预变性、分步酶解、膜过滤、脱色等工艺）才能够较为彻底地消除大豆蛋白的致敏性。

表 2 低致敏低苦味大豆低聚肽的分子量分布

分子量范围	实施例 1	实施例 2	实施例 3
5000 以上	2.34	1.13	2.23
1000-5000	5.20	10.24	9.69
500-1000	22.78	27.02	29.64
140-500	65.32	56.51	54.85
140 以下	4.22	5.09	3.49
5000 以下	97.66	98.87	97.77
1000 以下	92.32	88.62	87.98

15 由表 2 结果可知：

本发明制备的低致敏低苦味大豆低聚肽中分子量小于 5000Da 的肽的质量含量 >95%，分子量小于 1000Da 的肽的质量含量 >85%。

表 3 各大豆肽口感评价结果

试验例	平均苦味值
实施例 1	3
实施例 2	2
实施例 3	2
对照例 1	6
对照例 2	7
对照例 3	6

由表 3 结果可知：

本发明制备的低致敏低苦味大豆低聚肽中苦味成分少，口感较好，说明本发明方法
5 能够有效抑制酶解产物中苦味物质的产生；而采用菠萝蛋白酶、中性蛋白酶等蛋白酶对大豆蛋白进行处理时无法有效避免大豆蛋白中的苦味涩味成分的释放。

最后应说明的是：以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对其限制；尽管
10 参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

权利要求书

1. 一种低致敏低苦味大豆低聚肽的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

1) 将大豆蛋白粉与水混合制成大豆蛋白溶液后，对大豆蛋白溶液进行热变性，制得变性蛋白溶液；

5 2) 调节所述变性蛋白溶液的 pH 值至 6~9 后，加入中性蛋白酶和木瓜蛋白酶进行第一酶解，制得第一酶解液；

3) 向所述第一酶解液中加入碱性蛋白酶和风味蛋白酶进行第二酶解，灭酶后，制得第二酶解液；

10 4) 将所述第二酶解液离心后，对离心上清液进行膜过滤，制得低致敏低苦味大豆低聚肽。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述大豆蛋白粉与水的质量体积比为 1: (5~10)。

3. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述热变性包括：将大豆蛋白溶液加热至 70~90℃后，保温并持续搅拌 20~60min。

15 4. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述中性蛋白酶的用量为 10~100U/g，所述木瓜蛋白酶的用量为 10~100U/g，所述第一酶解在 30~60℃的温度下进行，并且控制第一酶解的时间为 1~3h。

20 5. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述碱性蛋白酶的用量为 10~100U/g，所述风味蛋白酶的用量为 10~100U/g，所述第二酶解在 30~60℃的温度下进行，并且控制第二酶解的时间为 1~3h。

6. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，在 110~120℃的温度下进行所述灭酶，并且控制灭酶的时间为 10~30min。

7. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，采用孔径为 1~200nm 的滤膜进行所述膜过滤。

25 8. 一种低致敏低苦味大豆低聚肽，其特征在于，按照权利要求 1 至 7 中任一所述制备方法制得，所述低致敏低苦味大豆低聚肽中大豆球蛋白的含量<200mg/kg，β-伴球蛋白的含量<150mg/kg，大豆胰蛋白酶抑制剂的含量<100mg/kg。

30 9. 根据权利要求 8 所述的低致敏低苦味大豆低聚肽，其特征在于，所述低致敏低苦味大豆低聚肽中分子量小于 5000Da 的肽的质量含量>85%，分子量小于 1000Da 的肽的质量含量>60%。

10. 权利要求 8 或 9 所述的低致敏低苦味大豆低聚肽在奶粉或保健食品中的应用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/078137

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23J 3/16 (2006.01) i; A23J 3/34 (2006.01) 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)

A23J; C12P

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)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE and Search Words: sensitize, soybean, peptide, neutrase, alcalase, papain, flavourzyme, allergenic, bitter etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103981244 A (NANCHANG UNIVERSITY), 13 August 2014 (13.08.2014), the whole document, particularly claim 1	1-10
A	CN 103014112 A (GUANGZHOU HONSEA INDUSTRY CO., LTD.), 03 April 2013 (03.04.2013), the whole document, particularly claims 1-10	1-10
A	CN 103652315 A (NANCHANG UNIVERSITY), 26 March 2014 (26.03.2014), the whole document, particularly claim 1	1-10
A	CN 104286856 A (CHANGCHUN UNIVERSITY), 21 January 2015 (21.01.2015), the whole document	1-10
A	CN 102511648 A (TIANJIN BINHAI NOAO ENZYMES SCIENCE AND TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.), 27 June 2012 (27.06.2012), the whole document	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
20 January 2016 (20.01.2016)

Date of mailing of the international search report
28 January 2016 (28.01.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
LI, Chen
Telephone No.: (86-10) **62411100**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/078137

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103981244 A	13 August 2014	None	
CN 103014112 A	03 April 2013	CN 103014112 B	06 May 2015
CN 103652315 A	26 March 2014	CN 103652315 B	26 November 2014
CN 104286856 A	21 January 2015	None	
CN 102511648 A	27 June 2012	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/078137

<p>A. 主题的分类</p> <p>A23J 3/16(2006.01)i; A23J 3/34(2006.01)i</p> <p>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</p>																														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A23J; C12P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE和检索词:大豆, 肽, 中性蛋白酶, 碱性蛋白酶, 木瓜蛋白酶, 风味蛋白酶, 致敏, 苦, soybean, peptide, neutrase, alcalase, papain, flavourzyme, allergenic, bitter等</p>																														
<p>C. 相关文件</p> <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>A</td> <td>CN 103981244 A (南昌大学) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文, 特别是权利要求1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103014112 A (广州合诚实业有限公司) 2013年 4月 3日 (2013 - 04 - 03) 全文, 特别是权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103652315 A (南昌大学) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 全文, 特别是权利要求1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104286856 A (长春大学) 2015年 1月 21日 (2015 - 01 - 21) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102511648 A (天津滨海诺奥酶工程技术有限公司) 2012年 6月 27日 (2012 - 06 - 27) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table> <p><input 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。</p> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <table border="0"> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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)</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td>“&” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 103981244 A (南昌大学) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文, 特别是权利要求1	1-10	A	CN 103014112 A (广州合诚实业有限公司) 2013年 4月 3日 (2013 - 04 - 03) 全文, 特别是权利要求1-10	1-10	A	CN 103652315 A (南昌大学) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 全文, 特别是权利要求1	1-10	A	CN 104286856 A (长春大学) 2015年 1月 21日 (2015 - 01 - 21) 全文	1-10	A	CN 102511648 A (天津滨海诺奥酶工程技术有限公司) 2012年 6月 27日 (2012 - 06 - 27) 全文	1-10	“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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	“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)	“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	“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件	“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	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																												
A	CN 103981244 A (南昌大学) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文, 特别是权利要求1	1-10																												
A	CN 103014112 A (广州合诚实业有限公司) 2013年 4月 3日 (2013 - 04 - 03) 全文, 特别是权利要求1-10	1-10																												
A	CN 103652315 A (南昌大学) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 全文, 特别是权利要求1	1-10																												
A	CN 104286856 A (长春大学) 2015年 1月 21日 (2015 - 01 - 21) 全文	1-10																												
A	CN 102511648 A (天津滨海诺奥酶工程技术有限公司) 2012年 6月 27日 (2012 - 06 - 27) 全文	1-10																												
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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																													
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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																													
“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)	“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																													
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件																													
“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																														
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																													
2016年 1月 20日	2016年 1月 28日																													
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																													
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	李晨																													
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62411100																													

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/078137

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103981244	A	2014年 8月 13日	无			
CN	103014112	A	2013年 4月 3日	CN	103014112	B	2015年 5月 6日
CN	103652315	A	2014年 3月 26日	CN	103652315	B	2014年 11月 26日
CN	104286856	A	2015年 1月 21日	无			
CN	102511648	A	2012年 6月 27日	无			