

(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
2020 年 9 月 3 日 (03.09.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/173112 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12P 21/06 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/113571
- (22) 国际申请日: 2019 年 10 月 28 日 (28.10.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910150621.0 2019年2月28日 (28.02.2019) CN
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。
- (72) 发明人: 刘元法(LIU, Yuanfa); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 郑召君(ZHENG, Zhaojun); 中国江苏省无

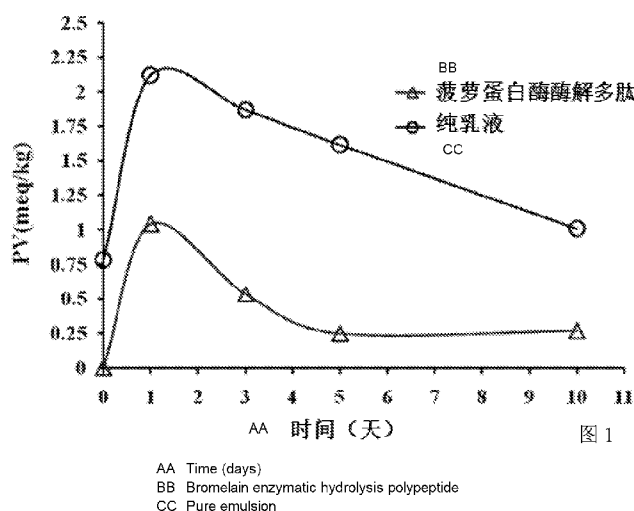
锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 李嘉欣(LI, Jiaxin); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 李进伟(LI, Jinwei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 徐勇将(XU, Yongjiang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E 区 501 张勇, Heilongjiang 150028 (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,

(54) **Title:** ACTIVE PEPTIDE HAVING ANTI-OIL OXIDATION FUNCTION, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种具有抗油脂氧化功能的活性肽及其制备方法和应用



(57) **Abstract:** An active peptide having an anti-oil oxidation function, a preparation method therefor and use thereof belong to the technical field of bioactive peptides of vegetable origin. An anti-oil oxidation peptide having functional properties such as clearing DPPH radicals, chelating metal ions, inhibiting peroxidation of lipids, extending induction time of oxidation of vegetable oils, and enhancing stability of emulsions is prepared by selecting an oil processing by-product, i.e. an oil crop after oil extraction, as a raw material, and performing steps of protein extraction, infrared pretreatment, proteolysis, freeze-drying, extraction of lipophilic parts and vacuum concentration and drying. The peptide can be used as a natural antioxidant in the storage and preservation of oils and other oil-containing food products, solving the problem of product deterioration and harmful product generation caused by oil oxidation and extending the shelf life of foods. The method is of great practical and social significance for curbing oil oxidation, ensuring food safety, and promoting technological progress.

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))。

(57) 摘要: 一种具有抗油脂氧化功能的活性肽及其制备方法和应用, 属于植物源性的生物活性肽技术领域。其选用油料加工副产物即提油后油料作物作为原料, 经过蛋白提取、红外预处理、蛋白酶解、冷冻干燥、提取亲脂部分和真空浓缩并干燥等步骤, 制备得到了具有清除DPPH自由基、金属离子螯合、抑制脂质过氧化、延长植物油氧化诱导时间、增强乳液稳定性等功能特性的抗油脂氧化肽, 可以作为天然抗氧化剂应用在油脂及其他含油脂食品的贮藏和保鲜中, 解决油脂氧化致使产品劣变、产生有害产物的问题, 延长食品货架期; 该方法对于遏制油脂氧化、保障食品安全、促进技术进步具有重大的现实意义和社会意义。

一种具有抗油脂氧化功能的活性肽及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物源性的生物活性肽技术领域，具体涉及一种具有抗油脂氧化功能的活性肽及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 油脂在人们日常生活和化学工业上都占有十分重要的地位，而且随着食用油脂生产及加工技术的不断进步，油脂的应用范围已越来越广泛。作为食品工业的主要原料之一，其品质及抗氧化稳定性直接影响到食品质量的好坏。随着人民生活的不改善，对食品质量的要求也日益提高。因此，深入了解和认识油脂的氧化作用过程，研究和开发延续油脂氧化作用的方法就显得十分重要。

[0003] 近年来，抗氧化肽因其来源广且安全性高成为备受瞩目的天然抗氧化剂。自从Pokorn提出“一些肽和蛋白水解物能降低自动氧化速率及脂肪过氧化物含量”后，抗氧化肽的研究引起了食品领域的广泛关注。与具毒副作用而被限量限制添加的合成抗氧化剂(BHA、BHT等)相比，抗氧化肽具有稳定性高、活性强、高营养、易吸收、安全低毒等诸多优势。

[0004] 目前抗氧化肽在食品系统的应用主要集中于肉质品，通过抑制或延缓脂质过氧化从而达到抗氧化保鲜的目的。目前研究的抗氧化肽由于其低油溶性使得其无法应用于油脂体系，无法解决植物油氧化带来的安全隐患与经济损失。

[0005] 国内外关于抗氧化肽在油脂中的应用研究较少，抗氧化肽对植物油影响的研究尚停留在抗氧化的初级阶段，通过研究分子供氢能力与金属离子螯合作用表明其抗油脂氧化能力，如何提取能够用于油脂中的抗氧化肽以及抗氧化肽在植物油体系中的作用机制仍有待进一步研究探讨。

[0006] 发明内容

[0007] 【技术问题】

[0008] 为了解决现有技术中的抗氧化肽无法用于油脂抗氧化的问题。

[0009] 【技术方案】

[0010] 为解决上述问题，本发明提供了一种具有抗油脂氧化功能的生物活性肽及其制备方法，以富含疏水性蛋白的豆类为主要原料，制备得到的抗氧化肽能够用于油脂抗氧化，且具有较强的抗氧化功能。

[0011] 首先，本发明提供了一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，所述方法包括如下步骤：

[0012] (1) 准备蛋白质：从提取了油之后的油料作物中提取蛋白质，干燥得到蛋白干粉，备用；

[0013] (2) 红外预处理：将步骤(1)得到的蛋白干粉进行红外预处理，预处理的温度为50~150°C，时间为5~45 min；

[0014] (3) 蛋白酶酶解处理：将步骤(2)得到的预处理后的蛋白干粉配置成溶液，然后利用蛋白酶进行酶解处理；

[0015] (4) 冷冻干燥：将酶解上清液冷冻干燥得到多肽粉；

[0016] (5) 提取亲脂性多肽：将冻干后的多肽粉溶于有机溶剂中，温度30~60°C下在10~100 Hz的超声波中处理20~120min，随后在0~5°C下离心，收集上清液；

[0017] (6) 真空浓缩并干燥：将步骤(5)得到的上清液真空浓缩并除去残留有机溶剂，即可得到具有抗油脂氧化功能的活性肽。

[0018] 在本发明的一种实施方式中，所述油料作物已经过提油处理。

[0019] 在本发明的一种实施方式中，步骤(1)中，所述油料作物优选富含疏水性氨基酸的作物。

[0020] 在本发明的一种实施方式中，步骤(1)中，所述油料作物为黄豆、黑豆或绿豆中的一种或几种。

[0021] 在本发明的一种实施方式中，步骤(1)中所述提取出蛋白质的方法为碱溶酸沉法，具体的为：将提油后的油料作物重悬于pH为7~10的稀碱溶液中0.5~5h，离心取上清液后再用酸将pH调至3~6，经分离后将沉淀重悬于水中并中和至pH为6~8，干燥得到蛋白干粉，备用。

[0022] 在本发明的一种实施方式中，步骤(1)中，所述用酸调pH优选调节至蛋白质的等电点附近。

[0023] 在本发明的一种实施方式中，步骤(1)中，所述稀碱溶液为氢氧化钠、氢氧

化钾、碳酸氢钠等中的任一种。

[0024] 在本发明的一种实施方式中，步骤（1）中，所述酸为盐酸、醋酸、柠檬酸或乳酸等。

[0025] 在本发明的一种实施方式中，步骤（1）中，所述离心为8000~12000 rpm下离心8~15 min。

[0026] 在本发明的一种实施方式中，步骤（1）中，所述干燥优选为冷冻干燥，温度为-100~-50°C，真空度为1~15 Pa，干燥时间为1~5 d；具体的冷冻干燥的操作为：将调回中性的蛋白溶液于-100~-50°C冷冻成固态，进行真空冷冻干燥，真空1~15 Pa，温度-100~-50°C，干燥1~5 d。

[0027] 在本发明的一种实施方式中，步骤（2）中，所述预处理的条件优选温度为90~120°C，时间15~25 min；与传统热处理利用热传导与热对流加热样品不同，红外热处理过程中，电磁波碰撞物料表面后，物料吸收能量而使内部分子发生机械振动，由内向外产热，从而达到加热的目的，热量分布均匀。通过红外预处理，使得球状蛋白变性，肽链展开有利于增大其与蛋白酶的接触面积，其次，红外预处理使得蛋白质的功能特性得到明显改善，且有利于生物活性物质的释放。

[0028] 在本发明的一种实施方式中，步骤（3）中，所述蛋白干粉配置成溶液，其质量体积比浓度为5~20%（w/v，g/mL），优选为5~13%。

[0029] 在本发明的一种实施方式中，步骤（3）中，所述酶解处理在蛋白酶的最适酶解条件下，保温震荡反应0.5~15h，灭酶，冷却，调节浆液pH至6~8，分离得到的酶解上清液。

[0030] 在本发明的一种实施方式中，所述灭酶为热水浴、红外等灭酶方法，优选70~100°C水浴灭酶。

[0031] 在本发明的一种实施方式中，步骤（3）中，所述分离为5000~10000 rpm条件下离心5~20 min。

[0032] 在本发明的一种实施方式中，步骤（3）中，所述蛋白酶为能够特异性切割疏水性氨基酸的蛋白酶，优选为碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶或无花果蛋白酶中的任一种或几种。

- [0033] 在本发明的一种实施方式中，步骤（3）中，所述蛋白酶的浓度为1.5~2.5 wt%。
- [0034] 在本发明的一种实施方式中，步骤（3）中，针对不同的蛋白酶，其最适酶解条件为：碱性蛋白酶的最佳酶解条件为温度40~60℃，pH 8.0~11.0，反应时间1~7 h；菠萝蛋白酶的最佳酶解条件是温度40~60℃，pH 6.0~8.0，反应时间2~8 h；无花果蛋白酶的最佳酶解条件为温度40~60℃，pH 4.0~7.0，反应时间2~8 h；胰蛋白酶的最佳酶解条件为温度25~45℃，pH 7.0~9.0，反应时间0~5 h；胰凝乳蛋白酶的最佳酶解条件为温度20~50℃，pH 7.0~10.0，反应时间0~5 h；弹性蛋白酶的最佳酶解条件为温度15~50℃，pH 6.0~9.0，反应时间0~5 h；木瓜蛋白酶的最佳酶解条件为温度40~60℃，pH 6.0~8.0，反应时间1~8 h。
- [0035] 在本发明的一种实施方式中，步骤（3）中，所述酶解上清液于0~9℃暂存；此外，酶解上清液若不能及时使用，则需进行冷冻保存，冷冻温度为-50~0℃，冷冻原料液在使用时，需进行低温解冻，尽量减少冷冻解冻过程对蛋白的破坏。
- [0036] 在本发明的一种实施方式中，步骤（3）中，所述冷却优选为快速冷却。
- [0037] 在本发明的一种实施方式中，步骤（4）中，所述冷冻干燥的具体操作为：将酶解上清液置于-100~0℃冷冻成固态，进行真空冷冻干燥，真空度为1~15 Pa，温度为-100~-50℃，干燥1~5 d，得到的多肽粉。
- [0038] 在本发明的一种实施方式中，步骤（5）中，所述有机溶剂为正己烷、石油醚、甲醇、乙醇、正丁醇或二氯甲烷中的任一种或两种。
- [0039] 在本发明的一种实施方式中，步骤（5）中，所述离心为5000~10000 rpm下离心5~20 min。
- [0040] 在本发明的一种实施方式中，所述真空浓缩为20~50℃下真空离心浓缩，将浓缩的多肽溶液在20~50℃干燥，除去残留有机溶剂。
- [0041] 在本发明的一种实施方式中，所述方法具体为：
- [0042] （1）蛋白提取：将提油后的油料作物重悬于pH为7~10的稀碱溶液中0.5~5h，离心取上清液后再用酸将pH调至3~6，经分离后将沉淀重悬于水中并中和至pH为6~8，干燥得到蛋白干粉；

- [0043] (2) 红外预处理: 将步骤(1)得到的蛋白干粉进行红外预处理, 预处理的温度为50~150°C, 时间为5~45 min;
- [0044] (3) 蛋白酶解: 将步骤(2)得到的预处理后的蛋白干粉配置为浓度为5~20%的溶液, 调节溶液至最适pH范围, 预热至蛋白酶的最适温度范围并保温5~30min, 加入蛋白酶, 在最适酶解条件下保温震荡反应0.5~15h, 灭酶, 冷却, 调节浆液pH至6~8, 5000~10000 rpm条件下离心5~20 min, 得到的酶解上清液;
- [0045] (4) 冷冻干燥: 将酶解上清液冷冻干燥得到多肽粉;
- [0046] (5) 提取亲脂多肽: 利用超声辅助溶剂法分离亲脂组分, 即将冻干后的多肽粉溶于有机溶剂中, 温度30~60°C下在10~100 Hz的超声波中处理20~120min, 随后在5000~10000 rpm、0~5°C下离心5~20min, 收集上清液;
- [0047] (6) 真空浓缩并干燥: 将上述溶液在20~50°C下真空离心浓缩, 将浓缩的多肽溶液在20~50°C干燥, 除去残留有机溶剂, 即可得到具有抗油脂氧化功能的活性肽。
- [0048] 本发明还提供了上述方法制备得到的具有抗油脂氧化功能的活性肽。
- [0049] 最后, 本发明还提供了上述具有抗油脂氧化功能的活性肽在油脂抗氧化中的应用, 以及包含上述具有抗油脂氧化功能的活性肽的油脂。
- [0050] 本发明取得的有益技术效果:
- [0051] (1) 本发明所得的天然抗氧化剂(抗氧化肽)具有清除DPPH自由基、金属离子螯合、抑制脂质过氧化、延长植物油氧化诱导时间、增强水包油乳液稳定性等功能特性, 能代替具有安全隐患的合成抗氧化剂而被广泛应用于食品工业, 本发明得到的具有抗油脂氧化功能的活性肽还具有稳定性高、安全性高、活性强的优点, 对保障食品安全具有重要意义。
- [0052] (2) 本发明制备的肽产品可很好地溶于油脂体系, 可以作为天然抗氧化剂应用在油脂及其他含油脂食品的贮藏和保鲜中。少量添加本发明的抗油脂氧化肽, 即可使得植物油等油脂达到延长氧化诱导时间8%~50%的效果, 解决油脂氧化致使产品劣变、产生有害产物的问题, 延长食品货架期。
- [0053] (3) 我国油料加工过程中副产物多, 加工和再利用少, 本发明选用油料加工副产物(即提油后的油料作物)作为原料生产高附加值的抗油脂氧化肽产品,

对粮油企业技术进步，加强竞争力具有重大意义，有较高的经济效益和社会效益。

- [0054] (4) 本发明反应条件温和，可连续大批量生产，为开发新型抗油脂氧化剂奠定了坚实的基础。本发明提供的抗油脂氧化肽的开发与研制，对于遏制油脂氧化、保障食品安全、促进技术进步具有重大的现实意义和社会意义。

发明概述

对附图的简要说明

附图说明

- [0055] 图1黑豆多肽对水包油乳液过氧化值的影响。
- [0056] 图2黑豆多肽对TBARS值的影响。
- [0057] 具体实施方式
- [0058] 以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。在不背离本发明精神和实质的情况下，对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换，均属于本发明的范围。
- [0059] 菠萝蛋白酶、碱性蛋白酶、无花果蛋白酶均购自诺维信公司。
- [0060] 胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、木瓜蛋白酶均购自Sigma公司。
- [0061] 若未特别指明，本发明实施例中所用的实验材料、试剂和仪器等均可市售获得，若未具体指明，实施例中所用的技术手段均为本领域技术人员所熟知的常规手段。
- [0062] 1、测定酶解上清液的DH、DPPH自由基清除能力和金属离子螯合能力
- [0063] (1) **DH**的测定方法为邻苯二甲醛法（o-Phthalaldehyde, OPA），所述方法如下：
- [0064] ①OPA试剂（现配现用）：首先完全溶解7.620g十水合四硼酸钠和200mg十二烷基硫酸钠（Sodium Dodecyl Sulfate, SDS）至150mL去离子水中，之后将160mg OPA（≥97%）溶于4mL无水乙醇中，然后将OPA溶液转移到上述溶液中，再将176mg的二硫苏糖醇（Dithiothreitol, DTT）加入溶液中，最后用去离子水定容到200mL；

[0065] ②丝氨酸标准溶液的制备：50mg丝氨酸溶于500 mL的去离子水（0.9516 meqv/L）；

[0066] ③样品溶液的制备：用去离子水将酶解上清液稀释5~50倍（使测得的吸光度在0.2~0.8之间），混合均匀；

[0067] ④标准测定：400 μ L丝氨酸标准液加入含有3mL OPA试剂的具塞试管中，摇匀，室温下精确反应2min，然后用紫外分光光度计在340nm下测其吸光度；

[0068] ⑤空白测定：向含有3mL OPA试剂的具塞试管中加入400 μ L去离子水，摇匀，室温下精确反应2min，然后在340nm下测其吸光度；

[0069] ⑥样品检测：400 μ L的待测样品中加入3mL OPA试剂混合均匀，在室温下放置2min，然后在340nm下测其吸光度。

[0070] ⑦计算：

[0071]

$$DH(\%) = \frac{NH_2 \cdot \beta}{\alpha \times l_{tot}} \quad \text{meqv/g}$$

[0072]

$$NH_2$$

$$=$$

$$\frac{(OD_{415} - OD_{215})}{(OD_{415} - OD_{215})} \times 0.9516 \text{ meqv/l} \times X \times \frac{1}{\beta}$$

[0073] 式中，

$$NH_2$$

：每克蛋白质含有的

$$NH_2$$

的毫克当量；

[0074] X: 稀释倍数; P: 蛋白粉末的蛋白质含量(%);

[0075] 豆类的

12

,

12

分别为常数0.970和0.342, h_{tot}

为常数7.8; 典型的OD标准值为0.8; OD空白值为0.07。

[0076] (2) **DPPH**自由基清除能力测定, 所述方法如下:

[0077] 用95%乙醇溶液配置0.1 mM DPPH, 在96孔板中每孔加入50 μ L酶解液和50 μ L DPPH, 震荡10s后在室温下反应30min, 于517nm波长下测定得到的吸光值为 A_{sample} ; 以50 μ L酶解液和50 μ L 95%乙醇作为对照组, 同条件测定其吸光值为 $A_{sample\ blank}$; 以50 μ L DPPH和50 μ L去离子水作为空白组, 同条件下测定其吸光值为 $A_{control}$, 每个样品作3个平行, 震荡30s后在室温下反应30min, 于517nm波长下测定样品的吸光度。利用等比倍比稀释法梯度稀释酶解液测定DPPH清除率, 计算 IC_{50} 。

[0078] 清除率 (%) = (1

$$\frac{A_{sample} - A_{sample\ blank}}{A_{control}}$$

)

$\times 100\%$

[0079] (3) 金属离子螯合能力测定, 所述方法如下:

[0080] 取50 μ L酶解液于96孔板, 依次加入100 μ L 20 μ M氯化亚铁溶液, 100 μ L 0.5 mM菲洛嗪溶液混匀, 室温静置10min后, 于562nm处测定吸光值 A_{sample} ; 以50 μ L去离子水代替酶解液作为参比, 同条件下测得吸光值 $A_{sample\ blank}$; 以50 μ L酶解液与200 μ L去离子水作为空白, 同条件下测得吸光值 $A_{control}$, 每个样品作3个平行。利用等比倍比稀释法梯度稀释酶解液并测其金属离子螯合能力, 计算 IC_{50} 。

[0081] 螯合率 (%) =

$$\left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100\%$$

。

[0082] 2、对步骤（4）中得到多肽粉测定其对亚油酸过氧化抑制能力和对氧化诱导时间的影响，对步骤（6）中得到的脂溶性多肽粉末测定其对氧化诱导时间的影响

[0083] 亚油酸过氧化分析，所述方法如下：

[0084] ①样品溶液的制备：1.5mg多肽粗溶1mL去离子水，加入2 mL 50mM磷酸缓冲溶液(pH7.0)，加入1mL 2.5%亚油酸，再加入1mL去离子水，在混匀器上混合均匀，加盖密封，放在60°C恒温培养箱中避光保温，每 24h测定吸光度；

[0085] ②空白试剂的制备：用1mL去离子水代替酶解液；

[0086] ③阳性对照：用0.1mg/mLα-生育酚溶液代替酶解液；

[0087] ④吸光度的测定：取反应液5μL，依次加入235μL75%的乙醇溶液，5μL 30%硫氰酸铵溶液和5μL 硫酸亚铁溶液(含3.5%HCl)，混合均匀3min后在500nm处测定吸光度(A_{sample})，每天测定一次吸光度，以不添加酶解物的为空白对照(A_{sample blank})。

[0088] 抑制率(%)=

$$\frac{A_{\text{sample blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{sample blank}}} \times 100\%$$

。

[0089] 氧化诱导时间的测定，所述方法如下：

[0090] Rancimat油脂氧化稳定仪测定氧化诱导时间，以葵花籽油为实验对象。参数设定：100~150°C，气流速度0.5~1.5 L/h，肽添加量为0.05~2%。

[0091] 3、测定多肽粉在水包油乳液体系中的抗油脂氧化能力

[0092] 测定脂质氧化的初级氧化产物（过氧化值，PV）和次级氧化产物含量（TBARS法）。

[0093] 过氧化值（PV）测定，所述方法如下：

[0094] ①乳液的制备：30%（v/v，mL/mL）菜籽油、1%（mL/mL）吐温80与69%（m

L/mL) 超纯水制备乳液, 磁力搅拌30 min, 剪切2min, 均质。

[0095] ②PV值的测定: 通过添加氯仿 (1:2, w/v, g/mL, 下同) 和硫酸钠使乳液失稳。剧烈振荡2分钟后, 将去稳定化的乳液离心 (3000g / 5min, 4°C), 向脂质组分中加入乙酸 (3:2, v/v mL/mL, 下同) 和0.5mL 碘化钾饱和溶液后, 重复以下步骤三次: 剧烈摇晃20 s, 在黑暗中静置10s。以淀粉 (1%w/v溶液) 为指示剂, 用硫代硫酸钠滴定法测定PV。

[0096] $PV(\text{meq/kg}) = M \times V \times 1000 / m$

[0097] 其中, PV: 过氧化值 (meq / kg); M: 硫代硫酸钠溶液的摩尔浓度 (mol / L); V: 硫代硫酸钠溶液的体积 (mL); m: 样品质量 (g)

[0098] **TBARS**法测定, 所述方法如下:

[0099] 取1.5mL乳液, 加入1mL1%硫代巴比妥酸溶液、2.5mL10%三氯醋酸溶液 (TCA), 混匀后沸水浴中反应30 min, 取出于冰水浴中冷却5min, 移取2.5mL样液加入等体积三氯甲烷, 4500rpm下离心10min, 取上清于532nm下测定吸光度。

[0100] 实施例1制备黑豆抗油脂氧化肽AOP1

[0101] 黑豆富含疏水性氨基酸, 其疏水性氨基酸比例高达45%, 而含疏水性氨基酸的肽段更易与脂溶性物质反应, 而且疏水性氨基酸增大了肽在油脂体系的溶解度, 故选择黑豆作为原料。

[0102] (1) 蛋白提取: 提油后的黑豆粉以1:8 (w/v, g/mL, 下同) 重悬于去离子水, 搅拌60 min, 用0.015 M的NaOH将pH调至8.0左右, 搅拌2 h, 8000 rpm离心15 min, 取上清后再用2 M HCl调节至pH 4.5左右, 8000 rpm离心15 min左右的蛋白沉淀, 重悬于去离子水后用0.015 M NaOH将pH调回中性, 最后冷冻干燥即可得到黑豆蛋白;

[0103] (2) 红外预处理: 将冻干得到的黑豆蛋白粉进行红外加热处理, 处理温度100°C, 时间20min;

[0104] (3) 蛋白酶解: 取步骤(2)得到的蛋白粉, 按照1:10 (w/v) 的比例加入去离子水, 震荡混合, 调节溶液pH 7.0左右, 预热至55°C并保温10 min, 加入所选菠萝蛋白酶 (浓度为2%, w/v, g/mL, 下同), 调节溶液pH 7.0, 在55°C保温震荡反应4 h, 95°C水浴钝化灭酶15 min, 迅速冷却, 调节浆液pH 7.0左右, 8000

rpm条件下离心15 min，过滤得到酶解上清液，酶解上清液于4°C暂存；

[0105] (4) 冷冻干燥：将酶解液置于-80°C冷冻成固态，进行真空冷冻干燥，真空1 Pa，温度-70°C，干燥3 d，得到的多肽粉干燥保存；

[0106] (5) 提取亲脂多肽：利用超声辅助溶剂法分离亲脂组分，将冻干后的多肽粉末溶于乙醇和正己烷混合溶液，超声波80 Hz且温度45°C处理30min，随后8000 rpm，4°C条件下离心15 min，收集上清液；

[0107] (6) 真空浓缩并干燥：将上述溶液在45°C下真空离心浓缩至一定体积，将浓缩的多肽溶液在45°C真空干燥，除去残留有机溶剂，即可得到具有抗油脂氧化功能的活性肽。

[0108] 其中，测定步骤(3)中得到的酶解上清液的DH、DPPH自由基清除能力和金属离子螯合能力，测定的结果为：DH为21.74%，DPPH自由基清除能力的IC₅₀值为21.23 μg/mL，金属离子螯合能力的IC₅₀值为14.12 μg/mL，由实验结果可知，此多肽捕捉过氧化自由基以及螯合金属离子的能力极强，具有很高的抗氧化能力，是极佳的天然抗氧化剂。

[0109] 测定步骤(4)中得到的多肽粉（即未对脂溶性多肽粉末进行提取的多肽粉）在纯油体系中的抗油脂氧化能力。测定其对亚油酸过氧化抑制能力和在葵花籽油体系中的氧化诱导时间。添加纯油质量的0.5%的多肽粉，测定结果为：前5 d，亚油酸过氧化抑制率在80%~95%（以0.1mg/mL α-生育酚为对照，前5 d，其抑制率在80%~95%左右），在葵花籽油体系中的氧化诱导时间延长了10.40%，延长约26天（以0.5% α-生育酚为对照，其延长氧化诱导时间14.92%，延长约37天）。

[0110] 测定步骤(6)中得到的具有抗油脂氧化功能的活性肽在葵花籽油体系中对氧化诱导时间的影响，仅添加纯油质量的0.5%具有抗油脂氧化功能的活性肽即可延长氧化诱导时间49.25%，约123天（以0.5% α-生育酚为对照，其延长氧化诱导时间14.92%，约37天）。

[0111] 测定步骤(4)中得到的多肽粉在水包油乳液体系中的抗油脂氧化能力，测定结果见图1和图2，可见，前7 d，黑豆肽明显抑制脂质初级氧化产物和次级氧化产物的生成量，本发明指标得到的多肽粉在水包油乳液体系中的有效成分主要

为脂溶性多肽，见解证明了本发明的脂溶性多肽 also 具有良好的抗脂质氧化功能。

[0112] 实施例2 制备绿豆抗油脂氧化肽AOP2

[0113] (1) 蛋白提取：脱脂的绿豆粉以1:8 (w/v) 重悬于去离子水，搅拌60 min，用0.015 M的NaOH将pH调至9.0左右，搅拌2 h，8000 rpm离心15 min，取上清后再用2 M HCl调节至pH 4.0左右，8000 rpm离心15 min左右的蛋白沉淀，重悬于去离子水后用0.015 M NaOH将pH调回中性，最后冷冻干燥即可得到绿豆蛋白；

[0114] (2) 红外预处理：将冻干得到的绿豆蛋白粉进行红外加热处理，处理温度100 °C，时间20min；

[0115] (3) 蛋白酶解：取步骤(2)得到的蛋白粉，按照1:10 (w/v) 的比例加入去离子水，震荡混合，调节溶液pH 7.0左右，预热至55°C并保温10 min，加入所选菠萝蛋白酶（浓度为2%），调节溶液pH 7.0，在55°C保温震荡反应5 h，95°C水浴钝化灭酶15 min，迅速冷却，调节浆液pH 7.0左右，8000 rpm条件下离心15 min，过滤得到酶解上清液，酶解上清液于4°C暂存；

[0116] (4) 冷冻干燥：将酶解液置于-80°C冷冻成固态，进行真空冷冻干燥，真空1 Pa，温度-70°C，干燥3 d，得到的多肽粉干燥保存；

[0117] (5) 提取亲脂多肽：利用超声辅助溶剂法分离亲脂组分，将冻干后的多肽粉末溶于乙醇和正己烷混合溶液，超声波80 Hz且温度45°C处理30min，随后8000 rpm，4°C条件下离心15 min，收集上清液；

[0118] (6) 真空浓缩并干燥：将上述溶液在45°C下真空离心浓缩至一定体积，将浓缩的多肽溶液在45°C真空干燥，除去残留有机溶剂，即可得到具有抗油脂氧化功能的活性肽。

[0119] 其中，对步骤(3)中得到的酶解上清液测定DH、DPPH自由基清除能力和金属离子螯合能力，测定的结果为：DH为19.22%，DPPH自由基清除能力的IC₅₀值为8.67 μg/mL，金属离子螯合能力的IC₅₀值为15.33 μg/mL。由实验结果可知，此多肽捕捉过氧化自由基以及螯合金属离子的能力极强，具有很高的抗氧化能力，是极佳的天然抗氧化剂。

- [0120] 测定步骤（4）中得到的多肽粉末在纯油体系中的抗油脂氧化能力。测定亚油酸过氧化抑制能力、葵花籽油体系中的氧化诱导时间。测定结果为：前5d，亚油酸过氧化抑制率均维持在90%左右（以0.1mg/mL α -生育酚为对照，其抑制率在80%~95%左右），氧化诱导时间延长10.37%，约26天。
- [0121] 测定步骤（6）中得到的具有抗油脂氧化功能的活性肽在葵花籽油体系中对氧化诱导时间的影响，仅添加纯油质量的0.5%的具有抗油脂氧化功能的活性肽即可延长43.30%的氧化诱导时间，约108天（以0.5% α -生育酚为对照，其延长氧化诱导时间14.92%，约37天）。
- [0122] 实施例3
- [0123] 选择绿豆作为原料
- [0124] （1）蛋白提取：提油后的绿豆以1:8（w/v，g/mL，下同）重悬于去离子水，搅拌60 min，用0.015 M的NaOH将pH调至9.0左右，搅拌2 h，8000 rpm离心15 min，取上清后再用2 M HCl调节至pH 4左右，8000 rpm离心15 min左右的蛋白沉淀，重悬于去离子水后用0.015 M NaOH将pH调回中性，最后冷冻干燥即可得到绿豆蛋白。
- [0125] （2）红外预处理：将冻干得到的绿豆蛋白粉进行红外加热处理，处理温度100 °C，时间20min；
- [0126] （3）蛋白酶解：取步骤（2）得到的蛋白粉，按照1:10（w/v）的比例加入去离子水，震荡混合，调节溶液pH 5.7左右，预热至65°C并保温10 min，加入所选无花果蛋白酶（浓度为2%），调节溶液pH 5.7，在65°C保温震荡反应2 h，95 °C水浴钝化灭酶15 min，迅速冷却，调节浆液pH 7.0左右，8000 rpm条件下离心15 min，过滤得到酶解上清液，酶解上清液于4°C暂存；
- [0127] （4）冷冻干燥：将酶解液置于-80°C冷冻成固态，进行真空冷冻干燥，真空1 Pa，温度-70°C，干燥3 d，得到的多肽粉干燥保存；
- [0128] （5）提取亲脂多肽：利用超声辅助溶剂法分离亲脂组分，将冻干后的多肽粉末溶于乙醇和正己烷混合溶液，超声波80 Hz且温度45°C处理30min，随后8000 rpm，4°C条件下离心15 min，收集上清液；
- [0129] （6）真空浓缩并干燥：将上述溶液在45°C下真空离心浓缩至一定体积，将浓

缩的多肽溶液在45℃真空干燥，除去残留有机溶剂，即可得到具有抗油脂氧化功能的活性肽。

[0130] 其中，测定步骤（3）中得到的酶解上清液测定DH、DPPH自由基清除能力和金属离子螯合能力，测定的结果为：水解度（DH）为6.47%，DPPH自由基清除能力的IC₅₀值为9.45 μg/mL，金属离子螯合能力的IC₅₀值为7.63 μg/mL。由实验结果可知，此多肽捕捉过氧化自由基以及螯合金属离子的能力极强，具有很高的抗氧化能力，是极佳的天然抗氧化剂。

[0131] 测定步骤（4）中得到的多肽粉（即未对脂溶性多肽粉末进行提取）在纯油体系中的抗油脂氧化能力，并测定亚油酸过氧化抑制能力、葵花籽油体系中的氧化诱导时间。添加纯油质量的0.5%的多肽粉，测定结果为：前5 d，亚油酸过氧化抑制率在90%左右（以0.1mg/mL α-生育酚为对照，其抑制率80%~95%左右），氧化诱导时间延长12.10%，约30天。

[0132] 对步骤（6）中得到的具有抗油脂氧化功能的活性肽，测定其在葵花籽油体系中对氧化诱导时间的影响，仅添加纯油质量的0.5%的具有抗油脂氧化功能的活性肽即可延长氧化诱导时间45.50%，约113天（以0.5% α-生育酚为对照，其延长氧化诱导时间14.92%，约37天）。

[0133] 对比例1

[0134] 当删除步骤（2），即不进行红外预处理时，其余步骤和条件和实施例1相同，制备得到具有抗油脂氧化功能的活性肽。

[0135] 对其性能进行测定，酶解上清液水解度（DH）为14.37%，DPPH自由基清除能力的IC₅₀值为108.05 μg/mL，金属离子螯合能力的IC₅₀值为235.80 μg/mL；

[0136] 测定对比例1得到的多肽粉对亚油酸过氧化的抑制能力、在葵花籽油体系中对氧化诱导时间的影响（添加纯油质量的0.5%的多肽粉），测定结果为：前5d，亚油酸过氧化抑制率均维持在60%左右（以0.1mg/mL α-生育酚为对照，其抑制率在80%~95%左右），氧化诱导时间延长2.95%，约7天；

[0137] 测定对比例1得到的具有抗油脂氧化功能的活性肽在葵花籽油体系中对氧化诱导时间的影响，添加纯油质量的0.5%的具有抗油脂氧化功能的活性肽可延长氧化诱导时间10.23%，约25天（以0.5%α-生育酚为对照，其延长氧化诱导时间14.9

2%，约37天）。

[0138] 对比例2

[0139] 步骤（2）中预处理为微波（600 W，2 min）时，其余步骤和条件与实施例1相同，制备得到具有抗油脂氧化功能的活性肽。

[0140] 对其性能进行测定，酶解上清液水解度（DH）为16.21%，DPPH自由基清除能力的IC₅₀值为83.41μg/mL，金属离子螯合能力的IC₅₀值为135.48μg/mL；

[0141] 测定对比例2步骤（4）中得到的多肽粉末对亚油酸过氧化的抑制能力、在葵花籽油体系中对氧化诱导时间的影响（添加纯油质量的0.5%的多肽粉），测定结果为：前5d，亚油酸过氧化抑制率均维持在80%左右（以0.1mg/mL α-生育酚为对照，其抑制率在80%~95%左右），氧化诱导时间延长4.65%，约11天；

[0142] 测定对比例2步骤（6）中得到的具有抗油脂氧化功能的活性肽在葵花籽油体系中对氧化诱导时间的影响，添加纯油质量的0.5%的具有抗油脂氧化功能的活性肽可延长氧化诱导时间28.46%，约71天（以0.5%α-生育酚为对照，其延长氧化诱导时间14.92%，约37天）。

[0143] 对比例3

[0144] 步骤（2）红外预处理改为烘箱加热，处理温度100℃，时间20min，其余步骤和条件和实施例1相同，制备得到具有抗油脂氧化功能的活性肽。

[0145] 对其性能进行测定，酶解上清液水解度（DH）为14.05%，DPPH自由基清除能力的IC₅₀值为85.44μg/mL，金属离子螯合能力的IC₅₀值为205.41μg/mL；

[0146] 测定对比例3步骤（4）中得到的多肽粉末对亚油酸过氧化的抑制能力、在葵花籽油体系中对氧化诱导时间的影响（添加纯油质量的0.5%的多肽粉），测定结果为：前5d，亚油酸过氧化抑制率在60%~75%（以0.1mg/mL α-生育酚为对照，其抑制率80%~95%左右），氧化诱导时间延长3.43%，约9天；

[0147] 测定对比例3步骤（6）中得到的具有抗油脂氧化功能的活性肽在葵花籽油体系中对氧化诱导时间的影响，添加纯油质量的0.5%的具有抗油脂氧化功能的活性肽可延长氧化诱导时间15.67%，约39天（以0.5%α-生育酚为对照，其延长氧化诱导时间14.92%，约37天）。

[0148] 对比例4

- [0149] 步骤（5）中的提取亲脂方法改变，将冻干后的多肽粉末溶于80%乙醇溶液，加热溶解，温度45℃处理30min，随后8000 rpm，4℃条件下离心15 min，收集上清液；真空浓缩干燥后制得脂溶性多肽粉末。
- [0150] 测定对比例4步骤（6）中得到的具有抗油脂氧化功能的活性肽在葵花籽油体系中对氧化诱导时间的影响，发现该粉末在葵花籽油体系中无法稳定分散且抗油脂氧化能力较低。添加纯油质量的0.5%的具有抗油脂氧化功能的活性肽即可延长氧化诱导时间18.55%约46天（以0.5% α -生育酚为对照，其延长氧化诱导时间14.92%，约37天）。
- [0151] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：
- (1) 准备蛋白质：从提取了油之后的油料作物中提取蛋白质，干燥得到蛋白干粉，备用；
 - (2) 红外预处理：将步骤（1）得到的蛋白干粉进行红外预处理，预处理的温度为50~150℃，时间为5~45 min；
 - (3) 蛋白酶酶解处理：将步骤（2）得到的预处理后的蛋白干粉配置成溶液，然后利用蛋白酶进行酶解处理；
 - (4) 冷冻干燥：将酶解产物的上清液进行冷冻干燥得到多肽粉；
 - (5) 提取亲脂性多肽：将冻干后的多肽粉溶于有机溶剂中，温度30~60℃下在10~100 Hz的超声波中处理20~120 min，随后在0~5℃下离心，收集上清液；
 - (6) 真空浓缩并干燥：将步骤（5）得到的上清液真空浓缩并除去残留有机溶剂，即可得到具有抗油脂氧化功能的活性肽。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，所述油料作物为富含疏水性氨基酸的作物。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，步骤（1）中所述提取出蛋白质的方法为碱溶酸沉法，具体为：将提油后的油料作物重悬于pH为7~10的稀碱溶液中0.5~5h，离心取上清液后再用酸将pH调至3~6，经分离后将沉淀重悬于水中并中和至pH为6~8，干燥得到蛋白干粉，备用。
- [权利要求 4] 根据权利要求2所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，步骤（1）中所述提取出蛋白质的方法为碱溶酸沉法，具体为：将提油后的油料作物重悬于pH为7~10的稀碱溶液中0.5~5h，离心取上清液后再用酸将pH调至3~6，经分离后将沉淀重悬于水中并中和至pH为6~8，干燥得到蛋白干粉，备用。
- [权利要求 5] 根据权利要求1所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法

，其特征在于，所述蛋白酶为能够特异性切割疏水性氨基酸的蛋白酶，包括碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶或无花果树蛋白酶中的任一种或几种。

[权利要求 6] 根据权利要求2所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，所述蛋白酶为能够特异性切割疏水性氨基酸的蛋白酶，包括碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶或无花果树蛋白酶中的任一种或几种。

[权利要求 7] 根据权利要求3所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，所述蛋白酶为能够特异性切割疏水性氨基酸的蛋白酶，包括碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶或无花果树蛋白酶中的任一种或几种。

[权利要求 8] 根据权利要求1所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，步骤（3）中，所述蛋白酶的浓度为1.5~2.5 wt%；所述蛋白干粉配置成质量体积比g/mL浓度为5~20%的溶液。

[权利要求 9] 根据权利要求2所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，步骤（3）中，所述蛋白酶的浓度为1.5~2.5 wt%；所述蛋白干粉配置成质量体积比g/mL浓度为5~20%的溶液。

[权利要求 10] 根据权利要求3所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，步骤（3）中，所述蛋白酶的浓度为1.5~2.5 wt%；所述蛋白干粉配置成质量体积比g/mL浓度为5~20%的溶液。

[权利要求 11] 根据权利要求5所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，步骤（3）中，所述蛋白酶的浓度为1.5~2.5 wt%；所述蛋白干粉配置成质量体积比g/mL浓度为5~20%的溶液

[权利要求 12] 根据权利要求1~11任一所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，步骤（5）中，所述有机溶剂为正己烷、石油醚、甲醇、乙醇、正丁醇或二氯甲烷中的任意一种。

[权利要求 13] 根据权利要求1~11任一所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，所述方法具体为：

(1) 蛋白提取：将提油后的油料作物重悬于pH为7~10的稀碱溶液中0.5~5h，离心取上清液后再用酸将pH调至3~6，经分离后将沉淀重悬于水中并中和至pH为6~8，干燥得到蛋白干粉；

(2) 红外预处理：将步骤（1）得到的蛋白干粉进行红外预处理，预处理的温度为50~150°C，时间为5~45 min；

(3) 蛋白酶解：将步骤（2）得到的预处理后的蛋白干粉配置为浓度为5~20%的溶液，调节溶液至最适pH范围，预热至蛋白酶的最适温度范围并保温5~30min，加入蛋白酶，在最适酶解条件下保温震荡反应0.5~15h，灭酶，冷却，调节浆液pH至6~8，分离得到的酶解上清液；

(4) 冷冻干燥：将酶解上清液冷冻干燥得到多肽粉；

(5) 提取亲脂多肽：利用超声辅助溶剂法分离亲脂组分，即将冻干后的多肽粉溶于有机溶剂中，温度30~60°C下在10~100 Hz的超声波中处理20~120min，随后在0~5°C下分离收集上清液；

(6) 真空浓缩并干燥：将上述溶液在20~50°C下真空离心浓缩0.5~2 mL，将浓缩的多肽溶液在20~50°C干燥，除去残留有机溶剂，即可得到具有抗油脂氧化功能的活性肽。

[权利要求 14] 根据权利要求12所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法，其特征在于，所述方法具体为：

(1) 蛋白提取：将提油后的油料作物重悬于pH为7~10的稀碱溶液中0.5~5h，离心取上清液后再用酸将pH调至3~6，经分离后将沉淀重悬于水中并中和至pH为6~8，干燥得到蛋白干粉；

(2) 红外预处理：将步骤（1）得到的蛋白干粉进行红外预处理，预处理的温度为50~150°C，时间为5~45 min；

(3) 蛋白酶解：将步骤（2）得到的预处理后的蛋白干粉配置为浓度为5~20%的溶液，调节溶液至最适pH范围，预热至蛋白酶的最适温度范围并保温5~30min，加入蛋白酶，在最适酶解条件下保温震荡反应0.5~15h，灭酶，冷却，调节浆液pH至6~8，分离得到的酶解上清液

;

(4) 冷冻干燥: 将酶解上清液冷冻干燥得到多肽粉;

(5) 提取亲脂多肽: 利用超声辅助溶剂法分离亲脂组分, 即将冻干后的多肽粉溶于有机溶剂中, 温度30~60°C下在10~100 Hz的超声波中处理20~120min, 随后在0~5°C下分离收集上清液;

(6) 真空浓缩并干燥: 将上述溶液在20~50°C下真空离心浓缩0.5~2 mL, 将浓缩的多肽溶液在20~50°C干燥, 除去残留有机溶剂, 即可得到具有抗油脂氧化功能的活性肽。

[权利要求 15] 根据权利要求1~11任一所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法制备得到抗油脂氧肽。

[权利要求 16] 根据权利要求12所述的一种具有抗油脂氧化功能的活性肽的制备方法制备得到抗油脂氧肽。

[权利要求 17] 包含权利要求15或16所述的具有抗油脂氧化功能的活性肽的油脂。

[权利要求 18] 权利要求15或16所述的具有抗油脂氧化功能的活性肽在油脂抗氧化中的应用。

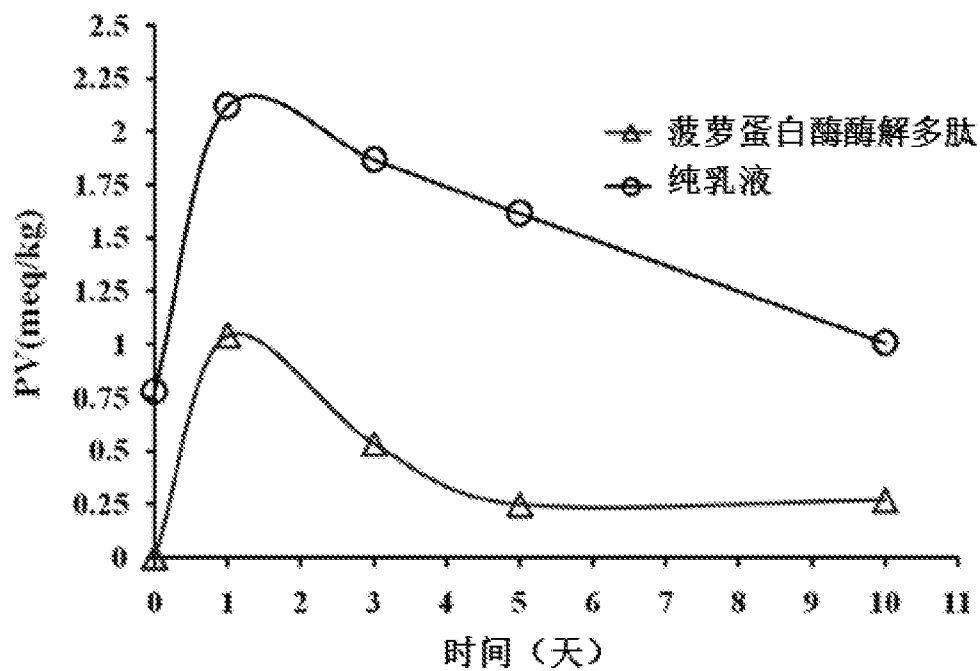


图 1

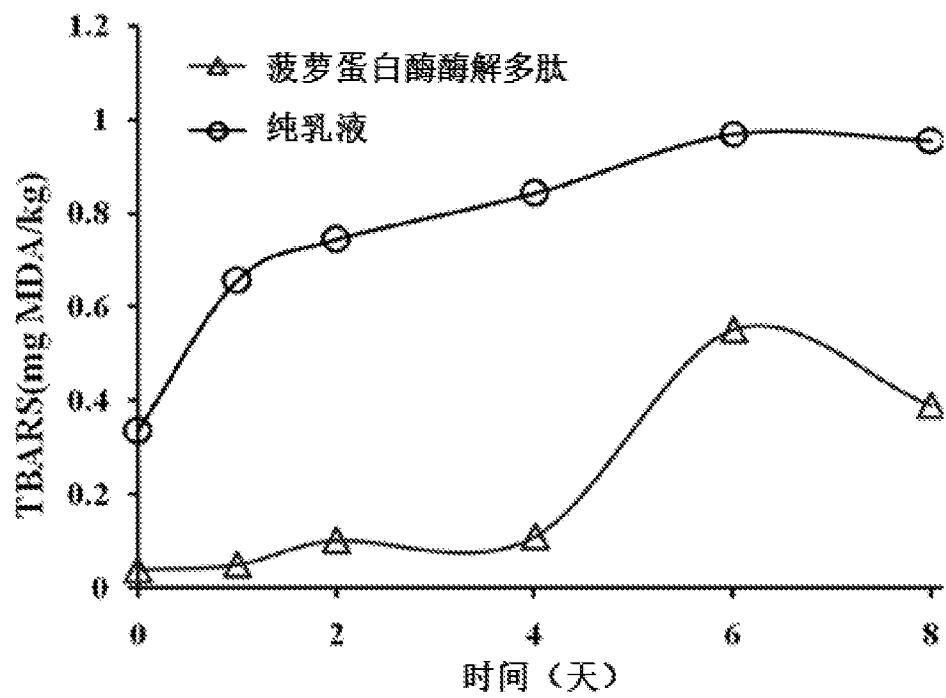


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/113571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 21/06(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)

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)

CNABS, CNTXT, VEN, USTXT, WOTXT, EPTXT, Patents, CNKI, 万方数据库, WANFANG, Web of Science: 江南大学, 刘元法, 郑召君, 李嘉欣, 李劲伟, 徐勇将, 豆, 多肽, 活性肽, 油脂, 脂质, 抗氧化, 红外, 热处理, LIU Yuanfa, ZHENG Zhaojun, LI Jiaxin, LI Jinwei, XU Yongjiang, bean, peptide, lipid, oil, antioxidant, antioxidative, protein, enzyme, heat, infrared

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109797183 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 24 May 2019 (2019-05-24) claims 1-10	1-18
PX	ZHENG, Zhaojun et al. "Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes," <i>Food Hydrocolloids</i> , Vol. 97, 12 July 2019 (2019-07-12), pp. 1-9	1-18
Y	CN 109097424 A (YAN, Yunxia) 28 December 2018 (2018-12-28) abstract, and claims 1-4	1-18
Y	CN 105039476 A (XUZHOU INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 11 November 2015 (2015-11-11) claim 1	1-18
Y	CN 108220374 A (JINHUA AILI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 29 June 2018 (2018-06-29) abstract, and claim 1	1-18
Y	CN 102796795 A (JILIN UNIVERSITY) 28 November 2012 (2012-11-28) abstract, and claims 1 and 2	1-18

☒ 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 January 2020

Date of mailing of the international search report

01 February 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (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/CN2019/113571

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012075570 A1 (MCGILL UNIVERSITY et al.) 14 June 2012 (2012-06-14) abstract	1-18
Y	孙宏霞等 (SUN, Hongxia et al.). "红外加热对大豆蛋白质湿热变性的影响 (Effect of Infrared Heating on Soybean Protein Denaturation of Damp and Hot)" 食品工业科技 (<i>Science and Technology of Food Industry</i>), No. no. 05, 31 December 2017 (2017-12-31), pp. 196-198	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/113571

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
CN	109797183	A	24 May 2019	None		
CN	109097424	A	28 December 2018	None		
CN	105039476	A	11 November 2015	None		
CN	108220374	A	29 June 2018	None		
CN	102796795	A	28 November 2012	None		
WO	2012075570	A1	14 June 2012	US	2014011742 A1	09 January 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/113571

A. 主题的分类 C12P 21/06 (2006.01) i 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) C12P 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)) CNABS, CNTXT, VEN, USTXT, WOTXT, EPTXT, Patentics, CNKI, 万方数据库, Web of Science: 江南大学, 刘元法, 郑召君, 李嘉欣, 李劲伟, 徐勇将, 豆, 多肽, 活性肽, 油脂, 脂质, 抗氧化, 红外, 热处理, LIU Yuanfa, ZHENG Zhaojun, LI Jiaxin, LI Jinwei, XU Yongjiang, bean, peptide, lipid, oil, antioxidant, antioxidative, protein, enzyme, heat, infrared																							
C. 相关文件 <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 109797183 A (江南大学) 2019年 5月 24日 (2019 - 05 - 24) 权利要求1-10</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>ZHENG Zhaojun等, . "Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes, " Food Hydrocolloids, , 第97卷, 2019年 7月 12日 (2019 - 07 - 12), 第1-9页</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 109097424 A (闫云霞) 2018年 12月 28日 (2018 - 12 - 28) 摘要, 权利要求1-4</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 105039476 A (徐州工程学院) 2015年 11月 11日 (2015 - 11 - 11) 权利要求1</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108220374 A (金华市艾力生物科技有限公司) 2018年 6月 29日 (2018 - 06 - 29) 摘要, 权利要求1</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102796795 A (吉林大学) 2012年 11月 28日 (2012 - 11 - 28) 摘要, 权利要求1-2</td> <td>1-18</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 109797183 A (江南大学) 2019年 5月 24日 (2019 - 05 - 24) 权利要求1-10	1-18	PX	ZHENG Zhaojun等, . "Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes, " Food Hydrocolloids, , 第97卷, 2019年 7月 12日 (2019 - 07 - 12), 第1-9页	1-18	Y	CN 109097424 A (闫云霞) 2018年 12月 28日 (2018 - 12 - 28) 摘要, 权利要求1-4	1-18	Y	CN 105039476 A (徐州工程学院) 2015年 11月 11日 (2015 - 11 - 11) 权利要求1	1-18	Y	CN 108220374 A (金华市艾力生物科技有限公司) 2018年 6月 29日 (2018 - 06 - 29) 摘要, 权利要求1	1-18	Y	CN 102796795 A (吉林大学) 2012年 11月 28日 (2012 - 11 - 28) 摘要, 权利要求1-2	1-18
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 109797183 A (江南大学) 2019年 5月 24日 (2019 - 05 - 24) 权利要求1-10	1-18																					
PX	ZHENG Zhaojun等, . "Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes, " Food Hydrocolloids, , 第97卷, 2019年 7月 12日 (2019 - 07 - 12), 第1-9页	1-18																					
Y	CN 109097424 A (闫云霞) 2018年 12月 28日 (2018 - 12 - 28) 摘要, 权利要求1-4	1-18																					
Y	CN 105039476 A (徐州工程学院) 2015年 11月 11日 (2015 - 11 - 11) 权利要求1	1-18																					
Y	CN 108220374 A (金华市艾力生物科技有限公司) 2018年 6月 29日 (2018 - 06 - 29) 摘要, 权利要求1	1-18																					
Y	CN 102796795 A (吉林大学) 2012年 11月 28日 (2012 - 11 - 28) 摘要, 权利要求1-2	1-18																					
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																							
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </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 "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 </td> </tr> </table>			* 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																			
* 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		国际检索报告邮寄日期																					
2020年 1月 8日		2020年 2月 1日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员																					
中国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		金武 电话号码 86-(10)-53961850																					

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
A	WO 2012075570 A1 (MCGILL UNIVERSITY等) 2012年 6月 14日 (2012 - 06 - 14) 摘要	1-18
Y	孙宏霞等，. “红外加热对大豆蛋白质湿热变性的影响，” 食品工业科技，， 第05期，2017年 12月 31日 (2017 - 12 - 31)， 第196-198页	1-18

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/113571

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	109797183	A	2019年 5月 24日	无		
CN	109097424	A	2018年 12月 28日	无		
CN	105039476	A	2015年 11月 11日	无		
CN	108220374	A	2018年 6月 29日	无		
CN	102796795	A	2012年 11月 28日	无		
WO	2012075570	A1	2012年 6月 14日	US	2014011742 A1	2014年 1月 9日