

(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
2024 年 4 月 25 日 (25.04.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/082385 A1

- (51) 国际专利分类号:
A23J 3/18 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/135377
- (22) 国际申请日: 2022 年 11 月 30 日 (30.11.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202211267497.4 2022年10月17日 (17.10.2022) 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, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 李言 (LI, Yan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。王宇 (WANG, Yu); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。钱海峰 (QIAN, Haifeng); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。王立 (WANG, Li); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。樊铭聪 (FAN, Mingcong); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (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 林娟, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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)。

(54) Title: METHOD FOR MODIFYING WHEAT MUCEDIN BY LACTIC ACID

(54) 发明名称: 一种乳酸化改性小麦面筋蛋白的方法

(57) Abstract: A method for modifying wheat gluten by means of lactylation, and wheat gluten obtained thereby. The method comprises dispersing wheat gluten in a lactic acid solution or an aqueous solution containing sodium lactate, and modifying the wheat gluten by means of lactylation. The internal structure of the gluten molecule is changed, and the solubility and emulsibility are improved.

(57) 摘要: 一种乳酸化改性小麦面筋蛋白的方法及得到的小麦面筋蛋白, 将小麦面筋蛋白分散于乳酸溶液或含有乳酸钠的水溶液中, 对蛋白进行乳酸化改性, 改变面筋蛋白分子内部结构, 改善溶解性及乳化性。

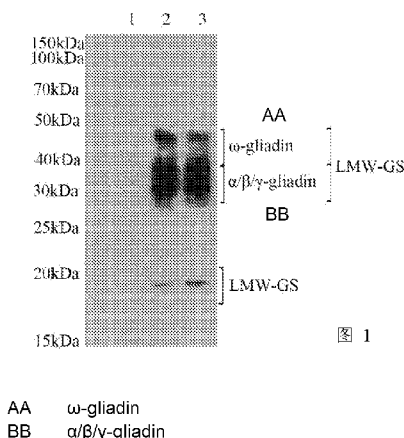


图 1

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种乳酸化改性小麦面筋蛋白的方法

技术领域

本发明属于小麦蛋白加工技术领域，具体涉及一种乳酸化改性小麦面筋蛋白的方法。

背景技术

小麦是全球范围内种植面积最大、种植范围最广、栽培最早的粮食作物之一。在我国，小麦的种植面积仅次于水稻，在人们的食物结构和消费方面占有非常重要的地位。小麦蛋白是生产小麦淀粉的副产物，也称为谷朊粉或小麦面筋蛋白。在食品工业中，小麦面筋蛋白的应用主要体现在两个方面，一是作为蛋白质营养补充剂，二是作为面团增筋剂，改善面团的流变性质和产品品质。

根据小麦面筋蛋白溶解性的不同，小麦面筋蛋白可分为清蛋白、球蛋白、麦醇溶蛋白和麦谷蛋白4种蛋白，后2种蛋白是构成小麦面筋蛋白的主要成分。麦谷蛋白是天然存在的非均质的大分子聚合体蛋白质，其可分为2种麦谷蛋白亚基，分别是高分子量麦谷蛋白亚基（HMW-GS）和低分子量麦谷蛋白亚基（LMW-GS），这2种亚基是由多肽键通过分子间二硫键连接而成。麦醇溶蛋白则是一种分子量较小的蛋白质，其可以与麦谷蛋白通过非共价键结合，嵌入到麦谷蛋白的三维网络结构中，从而会导致小麦面筋蛋白加工性能（溶解性、分散性等）极差。加之受基因、生长环境和加工工艺等因素影响，小麦面筋蛋白具有氨基酸序列多样性和整体结构复杂性的特点，这在很大程度上限制了小麦面筋蛋白的应用。因此，需要对小麦面筋蛋白进行合理的改性，增加其溶解度，改善其他功能性质。

现今有三种对小麦面筋蛋白改性的技术：物理法、酶法和化学法。物理改性法是指利用热、压力、射线、声波等物理作用定向改变蛋白分子间的聚集方式及其二级、三级结构。化学改性是指采用化学法引起蛋白的肽链部分断裂，或引入新的活性基团，从而使得蛋白结构、疏水基团、电荷特性等改变，最终导致其空间结构和功能性质产生变化的一种改性手段。酶法改性是指利用蛋白酶对蛋白的肽键或（和）酰胺键进行有限度地水解，或发生分子间的共价交联，从而定向改变其功能性质的一种改性方式。其中，化学改性由于相比于其他改性方法具有反应速度快、效率高、性能好、改性效果明显和易发生交联等优势，已成为蛋白质改性的主流技术。

发明内容

小麦面筋蛋白作为一种优质的植物蛋白，具有较高的营养价值，但由于其自身结构特性，小麦面筋蛋白的水溶性较差导致其功能特性发挥不理想，阻碍了小麦面筋蛋白在食品及其他

行业的应用。

本发明提供一种乳酸化改性小麦面筋蛋白的方法，能够改变面筋蛋白分子内部结构，使小麦面筋蛋白的溶解性及乳化性功能特性得到改善。

所述方法步骤包括如下：

(1) 制备蛋白质分散液：将小麦面筋蛋白分散于乳酸溶液或含有乳酸钠的水溶液中，得到小麦面筋蛋白悬浮液；

(2) 改性：将小麦面筋蛋白悬浮液搅拌一定的时间，使得乳酸基团与面筋蛋白氨基酸充分接触从而连接到氨基酸上；如果步骤(1)选择的是乳酸钠，则需要在搅拌过程中用碱性溶液维持 pH 于碱性；

搅拌结束，得到乳酸化小麦面筋蛋白处理液；

(3) 沉淀蛋白质：用 pH 调节剂调节乳酸化小麦面筋蛋白处理液的 pH 至中性使面筋蛋白沉淀，离心，收集沉淀蛋白并用水洗；通过水洗，除去残留的 pH 调节剂以及部分未能参与反应的游离乳酸和乳酸钠；

(4) 透析：将水洗后的沉淀蛋白复溶，在去离子水中透析以去除盐离子得到小麦面筋蛋白乳酸化纯化液；所述透析是为了除去氢离子、钠离子以及游离乳酸和乳酸钠；

(5) 真空冷冻干燥：对所述小麦面筋蛋白乳酸化纯化液进行真空冷冻干燥得到乳酸化改性小麦面筋蛋白。

进一步地，步骤(1)，小麦面筋蛋白质量为 25 g，乳酸溶液 250 mL（料液比为 1：10），所述乳酸溶液浓度为 0.1 mol/L；或者，小麦面筋蛋白质量为 25 g，乳酸钠的水溶液 250 mL，其中乳酸钠质量为 5 g，即乳酸钠与小麦面筋蛋白质量比为 1：5。

进一步地，步骤(2)所述反应时间为 3 h，反应温度为 25℃，搅拌转速 100 rpm。

进一步地，步骤(2)所述碱性溶液为 2 mol/L NaOH，pH 为 10.0。

进一步地，步骤(3)所述中性 pH 为 7.0，所用 pH 调节剂为 2 mol/L NaOH，离心转速为 4500 r/min，离心时间为 15 min，水洗沉淀三次。

进一步地，步骤(4)所述透析时间为 72 h。

本发明将小麦面筋蛋白溶液经过乳酸和乳酸钠处理之后，小麦面筋蛋白发生了乳酸化修饰，溶解性和乳化特性都有显著提高。其中，当 pH 约为 7 时，面筋蛋白溶解性由原来的 0.05 mg/mL 分别提升至 0.19 mg/mL、0.21 mg/mL，乳化活力由原来的 16.66 m²/g 分别提升至 19.27m²/g、19.58 m²/g。

乳酸作为一种天然有机弱酸，可以用作 pH 调节剂，具有一定的防腐作用，是一种广泛

使用的食品添加剂。本发明利用乳酸化有效改善小麦面筋蛋白溶解性和乳化性能，有望拓展小麦面筋蛋白的应用范围，将其应用于蛋白饮料、可食性包装膜、植脂末、冰淇淋、植物肉等体系。

不同于其它有机酸通常通过脱酰胺的方式来提高蛋白的功能性质，本发明是将乳酸基团通过连接到蛋白质氨基酸侧链上来改变蛋白的结构进而提高功能性质，这一点从乳酸盐即乳酸钠也能对面筋蛋白起到改性作用可以看出来。

附图说明

图 1.western blot 分析。

图 2.乳酸化小麦面筋蛋白溶解度。

图 3.乳酸化小麦面筋蛋白持水（WHC）持油性（OAC）。

图 4.乳酸化小麦面筋蛋白乳化能力。

图 5.乳酸化小麦面筋蛋白流变特性。

图 6.乳酸化小麦面筋蛋白红外图谱。

图 7.乳酸化小麦面筋蛋白荧光图谱。

图 8.乳酸化小麦面筋蛋白紫外图谱。

图 9.乳酸化小麦面筋蛋白 SDS-PAGE 图谱。

图 2 至图 8 中，Raw 为未处理的小麦面筋蛋白，Lactate 为经乳酸处理的小麦面筋蛋白，Sodium lactate 为经乳酸钠处理的小麦面筋蛋白。

具体实施方式

实施例 1

（1）称取 25 g 小麦面筋蛋白于 250 mL 0.1 mol/L 乳酸溶液中，固液比为 1：10（m/v），得到小麦面筋蛋白悬浮液；

（2）将小麦面筋蛋白悬浮液以 100 rpm 转速搅拌 3 h，使得乳酸基团与面筋蛋白氨基酸充分反应从而连接到面筋蛋白氨基酸上；

（3）反应结束后用 2 mol/L NaOH 调节反应体系 pH 至 7.0，4500 r/min 离心 15 min 后弃上清，水洗沉淀 3 次蛋白；

（4）透析：将水洗后的沉淀蛋白复溶，并在去离子水中透析 72 h 得到小麦面筋蛋白乳酸化纯化液；

（5）对所述小麦面筋蛋白乳酸化纯化液进行真空冷冻干燥得到乳酸化改性小麦面筋蛋白，将干燥后的小麦面筋蛋白置于干燥皿中保存。

实施例 2

(1) 称取 25 g 小麦面筋蛋白于 250 mL 去离子水中，固液比为 1: 10 (m/v)，并向其中加入 5 g 乳酸钠得到小麦面筋蛋白悬浮液；

(2) 将小麦面筋蛋白悬浮液以 100 rpm 转速搅拌 3 h，使得乳酸基团与面筋蛋白氨基酸充分反应从而连接到面筋蛋白氨基酸上，搅拌过程中，用 2 mol/L NaOH 调节反应体系 pH 维持在 10.0；

(3) 反应结束后用 2 mol/L NaOH 调节反应体系 pH 至 7.0，4500 r/min 离心 15 min 后弃上清，水洗沉淀 3 次蛋白；

(4) 透析：将水洗后的沉淀蛋白复溶，并在去离子水中透析 72 h 得到小麦面筋蛋白乳酸化纯化液；

(5) 对所述小麦面筋蛋白乳酸化纯化液进行真空冷冻干燥得到乳酸化改性小麦面筋蛋白，将干燥后的小麦面筋蛋白置于干燥皿中保存。

检测结果：

一、乳酸化修饰验证

制样：用 BCA 蛋白分析试剂测定实施例 1、实施例 2 干燥皿中保存的蛋白的浓度后，将蛋白调整至同样浓度 (1 mg/mL)，并加入蛋白上样缓冲液中，混合后 100°C 加热 10 min 使蛋白变性。蛋白上样缓冲液的组成为：50 mM Tris-HCl，0.1% 溴酚蓝，10% 甘油(v/v)和 2% SDS (w/v)，pH 为 6.8；电泳：配置 10% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶，以每个样本 10 μ L 的蛋白量上样。120V 恒压电泳，至前端溴酚蓝跑出胶底部电泳结束；转膜：PVDF 膜用甲醇浸泡 1 min 后，然后和胶一起放在转膜液中平衡 5 min，然后按照阳极-海绵-两层滤纸-PVDF 膜-胶-两层滤纸-海绵-阴极的顺序安放好，放到湿转膜仪中，将转膜仪包埋于冰中，300 mA 恒流转膜 2.5 h；封闭：取出 PVDF 膜，并用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h；一抗孵育：封闭结束后，加入乳酸化泛抗体 4°C 水平摇床孵育过夜；洗膜：回收一抗，将膜用 TBST 洗 3 次，每次 5-10 min；二抗孵育：加入用 5% 脱脂牛奶稀释的相应二抗 (1:3000) 室温孵育 1.5 h；洗膜：去掉二抗，将膜用 TBST 洗 3 次，每次 5-10 min；ECL 显色：利用数码化学发光成像仪进行拍照。

结果如附图 1 所示，泳道 1 为未处理的小麦面筋蛋白，泳道 2 为经乳酸处理的小麦面筋蛋白，泳道 3 为经乳酸钠处理的小麦面筋蛋白，western blot 结果显示，泳道 2 和 3 在 15~20，30~50 kDa 处的条带强度明显加深。Western blot 是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的蛋白进行染色，并通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质的表达情况。具体地，在本实

验中使用的乳酸化泛抗体是一种能够识别氨基酸侧链连接乳酸基团的特定蛋白质的抗体，泳道 1 是未经处理的面筋蛋白所以不会有明显的条带，泳道 2 和 3 分别是经过乳酸和乳酸钠处理的小麦面筋蛋白，都产生了明显的条带，这说明乳酸和乳酸钠处理使得面筋蛋白发生了明显的乳酸化修饰现象。小麦醇溶蛋白分子量约为 22-58 kDa，麦谷蛋白的高分子亚基分子量在 80-130 kDa 之间，麦谷蛋白的低分子亚基分子量在 10-70 kDa 之间。从附图 1 可知，泳道 2 和 3 在 15-20, 30-50 kDa 处的条带强度明显加深，所以推测修饰的位点主要集中在醇溶蛋白和低分子量麦谷蛋白亚基。

二、乳酸化小麦面筋蛋白功能特性的测定

(1) 溶解度测定：将实施例 1、实施例 2 干燥皿中保存的蛋白样品溶解在去离子水中，用 HCl 和 NaOH 调节混合物的 pH 为 3.0~10.0，室温下搅拌 120 min。经 10000 rpm 离心 15 min 后，使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定上清液中的蛋白质含量。

如附图 2 结果所示，在 pH 3.0~10.0 范围内，经过乳酸化改性的小麦面筋蛋白溶解度有显著提升。首先，新引入的乳酸基团使得面筋蛋白结构展开，这使得蛋白质侧链和水之间的相互作用力增强，这与下文荧光光谱的结果一致。其次，可能是乳酸基团的引入使得负电荷增加从而导致溶解度提高。

(2) 持水性测定：准确称取 0.4 g 小麦面筋蛋白于 15 mL 离心管中并记录离心管与样品总重，向离心管中加入 4 mL 去离子水。样品用旋涡混合器充分混合后在室温下静置 60 min，经 4000 r/min 离心 20 min，小心除去上层液体，准确称量其质量。样品的持水性以每克蛋白质吸收水的质量表示。持油性测定：准确称取 0.3 g 小麦面筋蛋白于 15 mL 离心管中并记录离心管与样品总重，向离心管中加入 2 mL 葵花籽油。样品用旋涡混合器充分混合后在室温下静置 60 min，经 4000 r/min 离心 20 min，小心除去上层液体，准确称量其质量。样品的持油性以每克蛋白质吸收油的质量表示。

乳酸化修饰对小麦面筋蛋白的持水持油性的影响如附图 3 所示，持水性的降低可能是由于溶解度的提高，有报道指出高水溶性蛋白吸水能力较差。持油性的提高可归因于乳酸化修饰使得蛋白质结构展开，暴露的疏水基团进一步与油形成蛋白质-油复合物。

(3) 乳化能力测定：取 20 mL 10 mg/mL 的小麦面筋蛋白溶液（0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液），加入 5 mL 葵花籽油，使用 Ultra-Turrax18 型乳化分散机于 10000 r/min 下剪切 1 min。随后立即从距容器底端约 5 mm 处吸取 50 μ L 液体，加入 4.95 mL 0.1% 的 SDS 溶液，混合均匀，以 0.1% SDS 溶液作为空白对照于 500 nm 处测吸光值 A_0 。在室温下静置 10 min 后再次取样，依据 A_0 的测定步骤来测定吸光值 A_t 。根据下列公式计算乳化能力：

$$\text{EAI (m}^2\text{/g)} = \frac{n \times 2 \times (2.303 A_{500}) \times 10^{-4}}{\phi \text{CL}}$$

$$\text{ESI (min)} = \frac{\Delta T \times A_0}{A_0 - A_t}$$

A_{500} 为 500 nm 下测定的吸光值 (0 min); n 是稀释倍数; C 是蛋白质质量浓度; ϕ 分散相体积分数; L 为比色池光径; A_0 和 A_t 为 0 和 10 min 时测定的吸光值; ΔT 为 10 min。

具有良好乳化能力的蛋白能有效降低表面张力, 迅速吸收到油水界面并不断展开, 将油水体系统结合在一起。蛋白质的溶解度在乳化过程中起着重要作用, 溶解度是蛋白质具有良好乳化特性的前提条件, 只有溶解度好的蛋白质才容易扩散到油水界面。乳酸化之后的小麦面筋蛋白具有良好的乳化活力和乳化稳定性可以归功于蛋白质溶解度的提高。

(4) 流变特性: 采用 DHR-3 流变仪测定小麦面筋蛋白的流变性质, 选用 40 mm 平板。样品与去离子水混合后松弛 30 min, 每个样品的边缘涂上硅油防止水分散失。在线性黏弹区选择 1% 的应变, 频率扫描时频率范围设定为 0.1 Hz~10 Hz。设定测试前小麦面筋蛋白平衡时间为 300 s, 测试温度为 25°C。

如附图 5 结果所示, 所有的样品都表现出典型的黏弹性和类固体行为, 即储能模量大于损耗模量。乳酸和乳酸钠处理均能显著提高小麦面筋蛋白的储存模量和损耗模量, 说明乳酸化是提高面筋蛋白黏弹性的有效方法, 原因是小麦面筋蛋白经乳酸化处理后溶解度有明显提高, 使蛋白质水化更充分。

三、乳酸化小麦面筋蛋白结构特性的测定

(1) 二级结构测定: 使用傅里叶红外法测定小麦面筋蛋白的二级结构。定量称取 1 mg 小麦面筋蛋白和 100mg 溴化钾研磨成粉末, 置于压力机下压成半透明的均匀薄片。将样品置于傅里叶变换红外光谱仪中扫描测定, 以大气为扫描背景。扫描频率为 4000~400 cm^{-1} , 扫描次数为 32, 分辨率为 4 cm^{-1} , 最后用 Peakfit 分析样品的二级结构含量。

表 1.小麦面筋蛋白二级结构含量

	β -sheet (%)	Random coil (%)	α -helix (%)	β -turn (%)
raw	28.65 $\pm$ 0.53 ^c	15.23 $\pm$ 0.92 ^a	15.27 $\pm$ 0.92 ^a	40.85 $\pm$ 2.65 ^a
lactate	36.26 $\pm$ 1.12 ^b	13.87 $\pm$ 0.86 ^a	14.88 $\pm$ 0.51 ^a	34.99 $\pm$ 1.47 ^b
sodium lactate	43.76 $\pm$ 2.18 ^a	13.91 $\pm$ 0.57 ^a	14.42 $\pm$ 0.47 ^a	27.91 $\pm$ 1.37 ^c

如表 1 所示, 乳酸化修饰使得小麦面筋蛋白二级结构 β -转角部分转化为 β -折叠。 β -折叠是一种相对稳定的二级结构, α -螺旋、 β -转角和无规卷曲较为灵活, β -折叠结构的显著增加表明乳酸化处理后的小麦面筋蛋白稳定性增强。同时, β -折叠结构的增加显著改变了蛋白质与蛋

白质之间的相互作用，有利于面筋蛋白的粘弹性，这与之前的流变学结果一致。此外，肽链的排列通过位于蛋白质表面的 β -转角来实现逆转，从而使得蛋白质紧密相连，乳酸化改性后的小麦面筋蛋白 β -转角含量显著降低，表明蛋白分子进一步展开。

(2) 内源性荧光光谱：使用 F-7000 荧光光谱仪测定小麦面筋蛋白的荧光光谱。小麦面筋蛋白溶于磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L pH 为 7.0）中，用 BCA 试剂盒测量蛋白浓度并将最终样品浓度调节为 0.4 mg/mL。荧光光谱仪参数设置如下：激发波长为 280nm，发射波长范围为 300-500nm，扫描速度为 1200nm/min，反应时间为 0.5s，电压为 600V，激发和发射缝为 5nm。

面筋蛋白中的氨基酸如色氨酸能够发射荧光，通过测定蛋白质荧光光谱能够反映蛋白中氨基酸微环境，进而推测蛋白质三级结构的变化。如附图 7 所示，乳酸化改性后的小麦面筋蛋白最大吸收荧光峰的红移，这表明氨基酸侧链基团暴露在更亲水的环境中，原因是乳酸化改性导致了小麦面筋蛋白结构的展开。但是，暴露的氨基酸并没有使得荧光强度升高，这可能是由于色氨酸发生了荧光淬灭。

(3) 紫外光谱：采用 UV-1800 紫外分光光度计记录紫外吸收光谱。小麦面筋蛋白溶于磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L pH 为 7.0）中，用 BCA 试剂盒测量蛋白浓度并将最终样品浓度调节为 0.4 mg/mL。紫外分光光度计扫描范围为 200~400 nm，光程为 1 cm，响应时间为 0.1 s。

紫外吸收光谱通常也用来推测蛋白质三级结构的变化。如附图 8 所示，乳酸化处理之后的小麦面筋蛋白的最大吸收峰有蓝移现象，这说明处理之后的小麦面筋蛋白中的色氨酸和酪氨酸的微环境发生改变，且处理之后的最大紫外吸收峰值也显著升高，进一步证明乳酸化处理对小麦面筋蛋白三级构象有较大影响。

(5) SDS-PAGE 分析：样品溶液（1 mg/mL）加入蛋白上样缓冲液中，混合后 100°C 加热 10 min。蛋白上样缓冲液的组成为：50 mM Tris-HCl，0.1% 溴酚蓝，10% 甘油（v/v）和 2% SDS（w/v），pH 为 6.8。样品冷却至室温后，胶中上样 10 μ L，120 V 电压下 60 min。胶在考马斯亮蓝溶液中染色 30 min，用 10% 醋酸和 5.5% 乙醇脱色液 37°C 过夜脱色。泳道 1 为未处理的小麦面筋蛋白，泳道 2 为经乳酸处理的小麦面筋蛋白，泳道 3 为经乳酸钠处理的小麦面筋蛋白。

根据面筋蛋白二级结构和三级结构的变化，通过 SDS-PAGE 可以进一步分析乳酸化处理对面筋蛋白分子量分布的影响。如附图 9 所示，乳酸化后，40~70 kDa 的条带明显加深，可能是蛋白质分子结合乳酸基团后导致分子量的增加，另一种可能是乳酸化处理后的蛋白质发生聚集，从而导致条带加深。

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

1. 一种改性小麦面筋蛋白的方法，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 制备蛋白质分散液：将小麦面筋蛋白分散于乳酸溶液或含有乳酸钠的水溶液中，得到小麦面筋蛋白悬浮液；

(2) 改性：搅拌小麦面筋蛋白悬浮液得到乳酸化小麦面筋蛋白处理液；

(3) 沉淀蛋白质：用 pH 调节剂调节乳酸化小麦面筋蛋白处理液的 pH 至中性使面筋蛋白沉淀，离心，收集沉淀蛋白并用水洗；

(4) 透析：将水洗后的沉淀蛋白复溶，在去离子水中透析得到小麦面筋蛋白乳酸化纯化液；

(5) 真空冷冻干燥：对所述小麦面筋蛋白乳酸化纯化液进行真空冷冻干燥得到乳酸化改性小麦面筋蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的一种改性小麦面筋蛋白的方法，其特征在于，步骤 (1)，小麦面筋蛋白与乳酸溶液的料液比为 1 g: 10 mL，所述乳酸溶液浓度为 0.1 mol/L。

3. 根据权利要求 1 所述的一种改性小麦面筋蛋白的方法，其特征在于，步骤 (1)，小麦面筋蛋白与乳酸钠溶液的料液比为 1 g: 10 mL，乳酸钠与小麦面筋蛋白质量比为 1: 5。

4. 根据权利要求 1 所述的一种改性小麦面筋蛋白的方法，其特征在于，步骤 (2) 搅拌时间为 3 h，温度为 25°C，搅拌转速 100 rpm。

5. 根据权利要求 1 所述的一种改性小麦面筋蛋白的方法，其特征在于，步骤 (1) 采用乳酸钠水溶液时，步骤 (2) 搅拌过程中使用碱性溶液控制 pH 为碱性。

6. 根据权利要求 5 所述的一种改性小麦面筋蛋白的方法，其特征在于，所述碱性溶液为 2 mol/L NaOH，pH 为 10.0。

7. 根据权利要求 1 所述的一种改性小麦面筋蛋白的方法，其特征在于，步骤 (3) 所述中性的 pH 为 7.0。

8. 根据权利要求 7 所述的一种改性小麦面筋蛋白的方法，其特征在于，所用 pH 调节剂为 2 mol/L NaOH。

9. 根据权利要求 1 所述的一种改性小麦面筋蛋白的方法，其特征在于，步骤 (3) 的离心转速为 4500 r/min，离心时间为 15 min。

10. 根据权利要求 1~9 任一所述方法得到的改性小麦面筋蛋白。

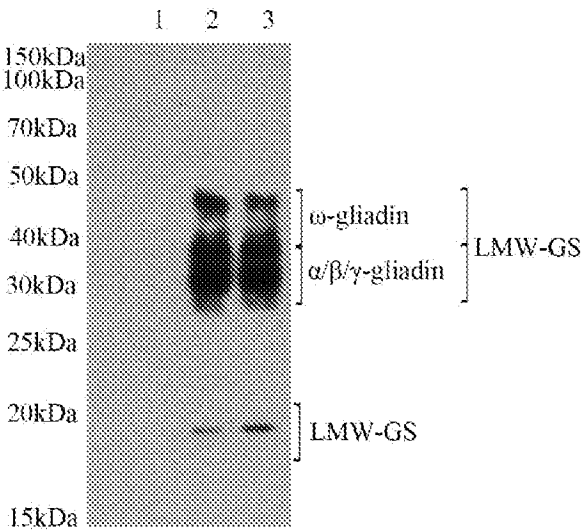


图 1

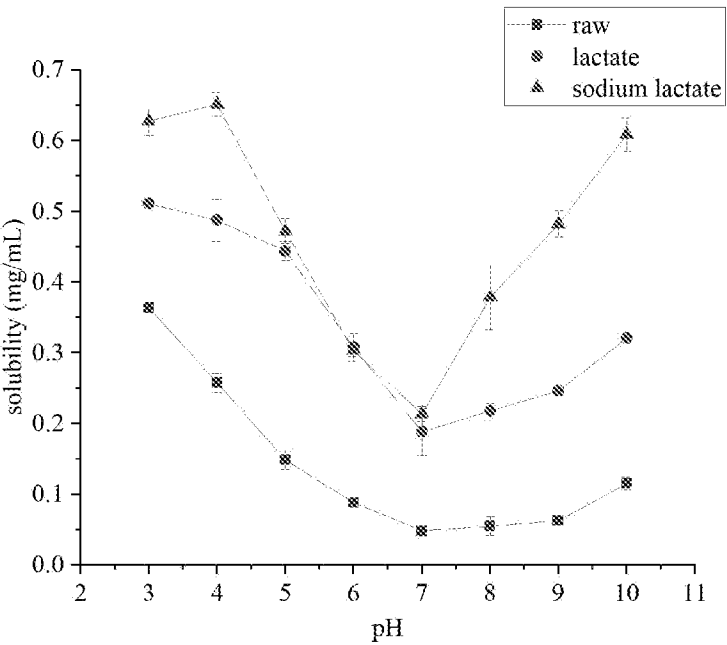


图 2

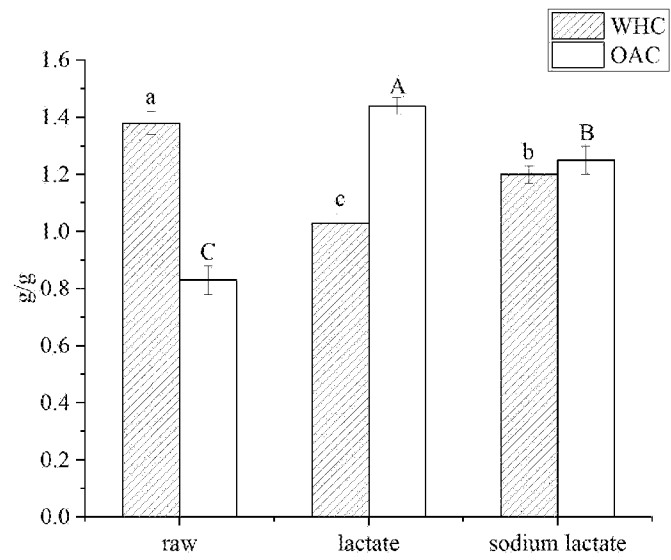


图 3

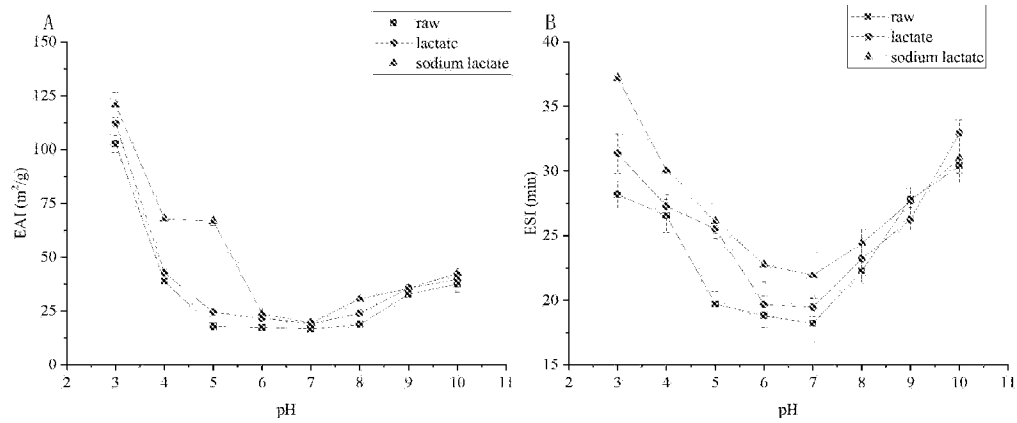


图 4

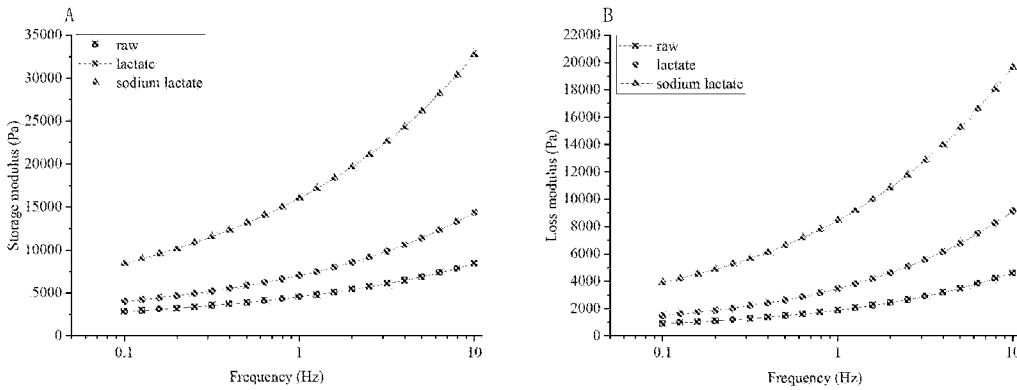


图 5

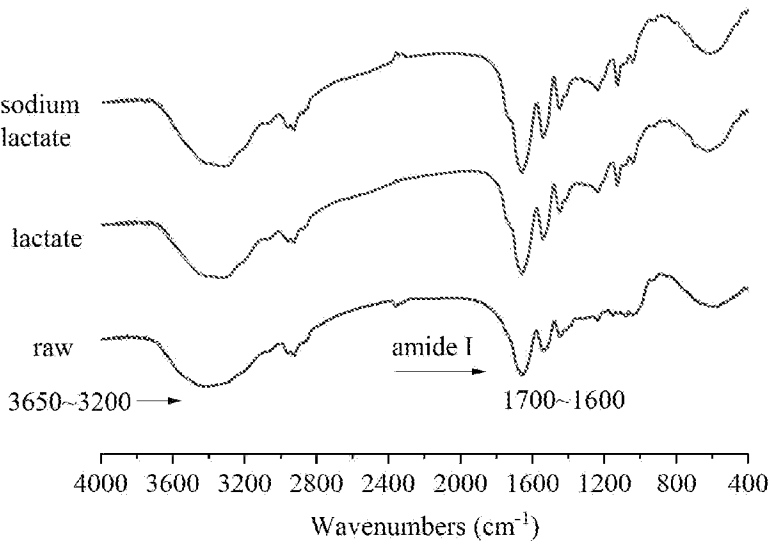


图 6

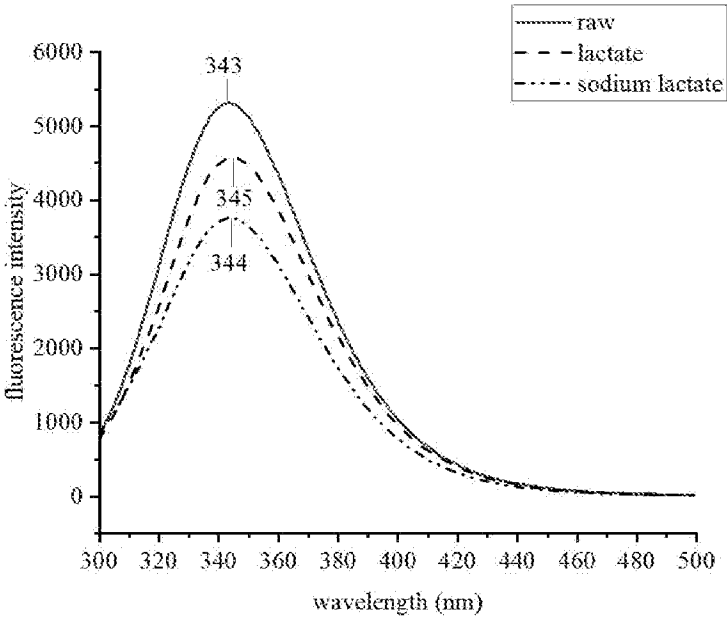


图 7

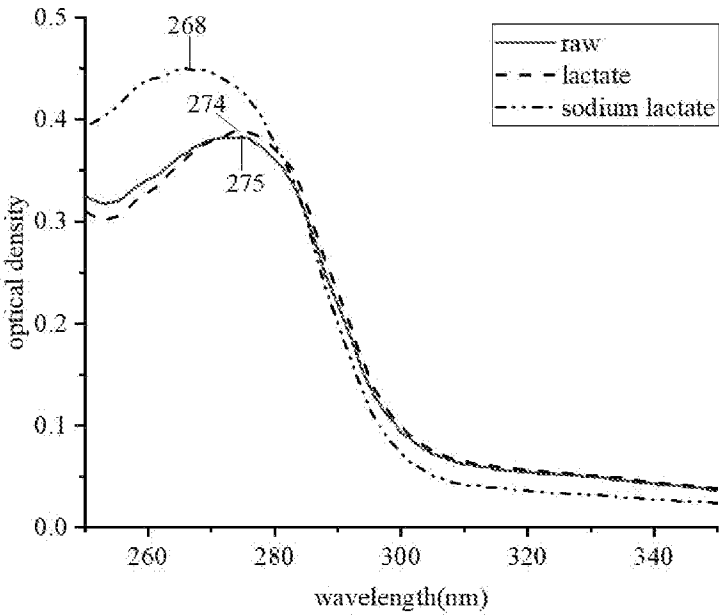


图 8

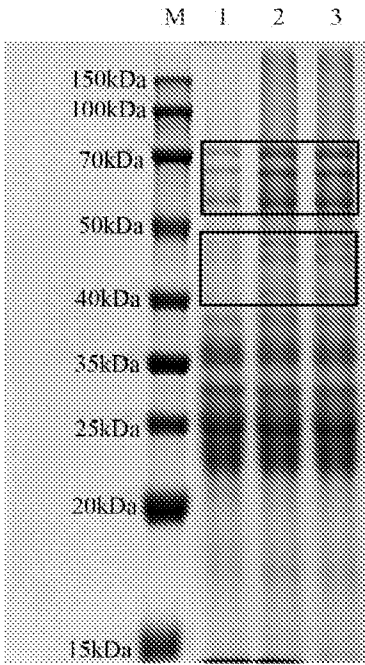


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/135377

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23J3/18(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)

IPC:A23J

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, DWPI, WPABS, VEN, ENTXT, CJFD, CNKI, ELSEVIER SCIENCE, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, 谷歌学术, GOOGLE SCHOLAR: 面筋蛋白, 谷朊粉, 乳酸, 乳酸钠, 改性, 溶解性, 乳化性, gluten, glutenin, lactic acid, lactate, sodium, lactylation, modify, solubl+, emulsif+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5166323 A (WESTON FOODS LTD.) 24 November 1992 (1992-11-24) claims 1 and 5, and description, embodiments 1 and 4	1-10
Y	CN 108504708 A (HEFEI UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 07 September 2018 (2018-09-07) claim 1	1-10
Y	CN 1547940 A (HENAN LIANHUA GROUP TECHNOLOGY DEVELOPMENT COMPANY) 24 November 2004 (2004-11-24) claims 1-2	1-10
Y	JP 2012085613 A (ASAMA KASEI KK) 10 May 2012 (2012-05-10) claim 1	1-10
Y	WO 2014142243 A1 (GLICO NUTRITION CO., LTD.) 18 September 2014 (2014-09-18) description, paragraphs 0023-0025	1-10
A	US 4664932 A (RIKEN VITAMIN CO., LTD.) 12 May 1987 (1987-05-12) claim 1	1-10



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

03 July 2023

Date of mailing of the international search report

12 July 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/135377**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2016140331 A (GLICO NUTRITION CO., LTD.) 08 August 2016 (2016-08-08) claims 1-4	1-10
PX	WANG, Yu et al. "Effect of lactylation on functional and structural properties of gluten" <i>Frontiers in Nutrition</i> , 28 October 2022 (2022-10-28), pages 1-11 Materials and methods	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/135377

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	5166323	A	24 November 1992	GB	9013922	D0	22 August 1990
				GB	2232159	A	05 December 1990
				GB	2232159	B	09 October 1991
				CA	1330274	C	21 June 1994
				NZ	227453	A	26 April 1990
				ZA	889635	B	29 November 1989
				JPH	03502639	A	20 June 1991
				ZA	8809635	B	29 November 1989
				AU	2919889	A	01 August 1989
				EP	0397704	A1	22 November 1990
				EP	0397704	A4	09 January 1991
				WO	8906091	A1	13 July 1989
CN	108504708	A	07 September 2018	None			
CN	1547940	A	24 November 2004	CN	100425150	C	15 October 2008
JP	2012085613	A	10 May 2012	JP	5614645	B2	29 October 2014
WO	2014142243	A1	18 September 2014	JP	2014198037	A	23 October 2014
US	4664932	A	12 May 1987	JPS	61152226	A	10 July 1986
				JPH	0356698	B2	29 August 1991
				CA	1267807	A	17 April 1990
				KR	860004579	A	11 July 1986
				KR	910008469	B1	18 October 1991
				AU	4834585	A	03 July 1986
				AU	576126	B2	11 August 1988
JP	2016140331	A	08 August 2016	WO	2016125599	A1	11 August 2016
				JP	6521651	B2	29 May 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/135377

A. 主题的分类 A23J3/18(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) IPC:A23J 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, DWPI, WPABS, VEN, ENTXT, CJFD, CNKI, ELSEVIER SCIENCE, 百度学术, 谷歌学术, 面筋蛋白, 谷朊粉, 乳酸, 乳酸钠, 改性, 溶解性, 乳化性, gluten, glutenin, lactic acid, lactate, sodium, lactylation, modify, solubl+, emulsif+																										
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>Y</td> <td>US 5166323 A (WESTON FOODS LTD) 1992年11月24日 (1992 - 11 - 24) 权利要求1、5, 说明书实施例1、4</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108504708 A (合肥工业大学) 2018年9月7日 (2018 - 09 - 07) 权利要求1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 1547940 A (河南莲花集团技术开发公司) 2004年11月24日 (2004 - 11 - 24) 权利要求1-2</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2012085613 A (ASAMA KASEI KK) 2012年5月10日 (2012 - 05 - 10) 权利要求1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2014142243 A1 (GLICO NUTRITION CO LTD) 2014年9月18日 (2014 - 09 - 18) 说明书0023-0025段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 4664932 A (RIKEN VITAMIN CO) 1987年5月12日 (1987 - 05 - 12) 权利要求1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2016140331 A (GLICO NUTRITION CO LTD) 2016年8月8日 (2016 - 08 - 08) 权利要求1-4</td> <td>1-10</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	Y	US 5166323 A (WESTON FOODS LTD) 1992年11月24日 (1992 - 11 - 24) 权利要求1、5, 说明书实施例1、4	1-10	Y	CN 108504708 A (合肥工业大学) 2018年9月7日 (2018 - 09 - 07) 权利要求1	1-10	Y	CN 1547940 A (河南莲花集团技术开发公司) 2004年11月24日 (2004 - 11 - 24) 权利要求1-2	1-10	Y	JP 2012085613 A (ASAMA KASEI KK) 2012年5月10日 (2012 - 05 - 10) 权利要求1	1-10	Y	WO 2014142243 A1 (GLICO NUTRITION CO LTD) 2014年9月18日 (2014 - 09 - 18) 说明书0023-0025段	1-10	A	US 4664932 A (RIKEN VITAMIN CO) 1987年5月12日 (1987 - 05 - 12) 权利要求1	1-10	A	JP 2016140331 A (GLICO NUTRITION CO LTD) 2016年8月8日 (2016 - 08 - 08) 权利要求1-4	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
Y	US 5166323 A (WESTON FOODS LTD) 1992年11月24日 (1992 - 11 - 24) 权利要求1、5, 说明书实施例1、4	1-10																								
Y	CN 108504708 A (合肥工业大学) 2018年9月7日 (2018 - 09 - 07) 权利要求1	1-10																								
Y	CN 1547940 A (河南莲花集团技术开发公司) 2004年11月24日 (2004 - 11 - 24) 权利要求1-2	1-10																								
Y	JP 2012085613 A (ASAMA KASEI KK) 2012年5月10日 (2012 - 05 - 10) 权利要求1	1-10																								
Y	WO 2014142243 A1 (GLICO NUTRITION CO LTD) 2014年9月18日 (2014 - 09 - 18) 说明书0023-0025段	1-10																								
A	US 4664932 A (RIKEN VITAMIN CO) 1987年5月12日 (1987 - 05 - 12) 权利要求1	1-10																								
A	JP 2016140331 A (GLICO NUTRITION CO LTD) 2016年8月8日 (2016 - 08 - 08) 权利要求1-4	1-10																								
☒ 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 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “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 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “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 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “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 2023年7月3日		国际检索报告邮寄日期 2023年7月12日																								
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		授权官员 刘洋 电话号码 (+86) 010-62411057																								

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
PX	Yu Wang, et al. "Effect of lactylation on functional and structural properties of gluten" Frontiers in Nutrition, 2022年10月28日 (2022 - 10 - 28), pages 1-11 Materials and methods	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/135377

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)
US	5166323	A	1992年11月24日	GB	9013922	D0	1990年8月22日
				GB	2232159	A	1990年12月5日
				GB	2232159	B	1991年10月9日
				CA	1330274	C	1994年6月21日
				NZ	227453	A	1990年4月26日
				ZA	889635	B	1989年11月29日
				JPH	03502639	A	1991年6月20日
				ZA	8809635	B	1989年11月29日
				AU	2919889	A	1989年8月1日
				EP	0397704	A1	1990年11月22日
				EP	0397704	A4	1991年1月9日
				WO	8906091	A1	1989年7月13日
CN	108504708	A	2018年9月7日	无			
CN	1547940	A	2004年11月24日	CN	100425150	C	2008年10月15日
JP	2012085613	A	2012年5月10日	JP	5614645	B2	2014年10月29日
WO	2014142243	A1	2014年9月18日	JP	2014198037	A	2014年10月23日
US	4664932	A	1987年5月12日	JPS	61152226	A	1986年7月10日
				JPH	0356698	B2	1991年8月29日
				CA	1267807	A	1990年4月17日
				KR	860004579	A	1986年7月11日
				KR	910008469	B1	1991年10月18日
				AU	4834585	A	1986年7月3日
JP	2016140331	A	2016年8月8日	AU	576126	B2	1988年8月11日
				WO	2016125599	A1	2016年8月11日
				JP	6521651	B2	2019年5月29日