

(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 11 月 5 日 (05.11.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/221180 A1

(51) 国际专利分类号:

C12P 21/06 (2006.01) *A23J 1/12* (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01) *A23J 3/34* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/087101

(22) 国际申请日: 2020 年 4 月 27 日 (27.04.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910358125.4 2019年4月30日 (30.04.2019) 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, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 王立(WANG, Li); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。薛腊梅(XUE, Lamei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。李言(LI, Yan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。钱海峰(QIAN, Haifeng); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。孙娟(SUN, Juan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, 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, 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, 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, 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: METHOD FOR PREPARING HYPOALLERGENIC WHEAT GLIADIN BY MEANS OF PHOSPHORYLATION-ENZYMATIC METHOD

(54) 发明名称: 磷酸化-酶解法制备低致敏性小麦醇溶蛋白的方法

(57) Abstract: Provided is a method for preparing a hypoallergenic wheat gliadin by means of a phosphorylation-enzymatic method, wherein same falls within the technical field of wheat processing. The allergenicity of the wheat gliadin is reduced by means of combining chemical and enzymatic treatment methods, and there is no significant difference between the allergenicity of the treated wheat gliadin and allergy parameters of unsensitized mice. The phosphorylation-enzymatic treatment means of the present invention effectively reduces the allergenicity of wheat gliadin.

(57) 摘要: 公开了磷酸化-酶解法制备低致敏性小麦醇溶蛋白的方法, 属于小麦加工技术领域。通过结合化学与酶解处理方法降低小麦醇溶蛋白的过敏性, 处理后的小麦醇溶蛋白的致敏性与未致敏的小鼠的过敏参数相比无显著性差异, 本发明的磷酸化-酶解处理方式有效降低了小麦醇溶蛋白的致敏性。



WO 2020/221180 A1

磷酸化-酶解法制备低致敏性小麦醇溶蛋白的方法

技术领域

本发明属于小麦加工技术领域，涉及磷酸化-酶解法制备低致敏性小麦醇溶蛋白的方法。

背景技术

小麦是世界三大农作物之一，是人类重要的食物组成。很多主食均是小麦制品，如面包、面条、馒头以及其他烘焙制品。尽管小麦在日常生活中有着重要的角色，但是小麦属于世界粮农组织（FAO）报告的常见过敏食物。小麦中含有致敏性的能引起过敏反应的蛋白，即使摄入少量的小麦粉，也可能对高度敏感病人的健康产生很大的影响。自 2006 年 1 月 1 日起，美国立法中小麦等 8 种过敏原列入标签范围。这意味着有许多人对小麦以及小麦制品过敏。在过去的几十年里，同其他的过敏食品一样，小麦过敏现象发生频率越来越高。全球有将近 1% 的人口对小麦过敏，0.4-1.3% 的儿童食用小麦或小麦制品有过敏反应，其发生的概率稍高于成年人的 0.2-0.9%。虽然，小麦导致过敏的现象频发，但是，目前唯一应对小麦过敏的最有效的方式是对其进行合理的加工处理。

根据溶解性的不同，可以将小麦蛋白分为水溶性的清蛋白、盐溶性的球蛋白和不溶性蛋白。其中，不溶性蛋白称为醇溶谷蛋白，由醇溶蛋白和麦谷蛋白组成，醇溶蛋白和麦谷蛋白共同组成谷朊粉。醇溶蛋白占小麦总蛋白的 40%，分子量范围为 28-55kDa。根据生化特点和遗传特性，醇溶蛋白又可以分为 α 、 β 、 ω 、 γ 等四种亚型。 α 醇溶蛋白的含量，约占小麦总蛋白的 15-30%。

不同类型的小麦蛋白会引起不同的过敏症状。常见的摄入小麦蛋白后引起的过敏现象有乳糜泻、哮喘和鼻炎等。在做过敏原检测时，小麦蛋白中的醇溶蛋白因富含小麦过敏原 IgE 结合表位，成为检测、诊断小麦过敏的重要指标。同时，如果通过特定的加工方式，降低或改变小麦中的醇溶蛋白的含量或结构，去除或降低过敏原，可以达到降低小麦过敏的效果。

抗原表位是存在于抗原表面的、决定抗原特异性的特殊化学基团，抗原表位的性质、数目和空间构型决定抗原的特异性。抗原表位的结构分为构象表位和线性表位两类。低分子量的麦谷蛋白亚基中重复的 Gln-Gln-Gln-Pro-Pro 是 IgE 结合的表位。醇溶蛋白结构包括一个重复的氨基酸序列，称为中心域，这个中心域富含脯氨酸和谷氨酰胺。

蛋白的二级和三级结构是免疫系统识别表位的关键。食品中的过敏蛋白在加工过程中，其结构发生改变时，可能会伴随着蛋白抗原表位的改变，这也会影响机体免疫系统中细胞识别醇溶蛋白表位的可能性。这为通过加工处理降低或去除过敏原提供了可能性。

近年来, 在小麦制品的生产过程中, 各种不同的加工处理方式被应用于小麦粉或谷朊粉的预处理。常见的应用于谷朊粉的加工方法分为物理、化学和酶水解法三种。应用较多的物理方法包括超声、湿热水浴和微波处理等。化学改性方法包括磷酸化、乙酰化和脱酰胺等。在酶解处理中, 应用较多的酶有碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰酶。使用较强的单一的物理处理方式对面粉或谷朊粉的流变性质影响较大, 不利于后期的加工和产品的形成。而中等强度的物理处理方式则对小麦蛋白的结构影响较小, 例如, 采用中等强度的物理处理方式来处理小麦粉或谷朊粉, 虽然保留了小麦粉或谷朊粉的良好面团加工性质, 但是, 中等强度的物理处理只能对蛋白的二级和三级结构带来微小的变化, 而这种微小的变化并不能有效降低过敏蛋白的致敏性。而化学处理方法在食品方面的应用也越来越少, 首先, 加工处理过程中高剂量的添加剂越来越不被消费者接受, 另外, 化学处理方式虽然能较大程度影响小麦蛋白的结构, 但关于化学处理后的醇溶蛋白的过敏性的改变情况仍存在争议, 这与处理条件的不同有关, 例如, 脱酰胺处理条件的不同会造成醇溶蛋白的过敏性的降低或升高。目前, 关于降低或消除食品中蛋白的过敏性的最有效的方法还是集中在酶法改性上, 但, 这些研究的应用尚存在一些困难, 如醇溶蛋白等过敏蛋白对消化酶具特殊的抗拒作用, 不易被酶消化水解, 采用单一的酶或单独的酶处理方法不易使其完全水解, 因此, 常需要多种酶协同对小麦醇溶蛋白进行酶解, 造成酶解法具有成本较高并可能会破坏面粉制品中其他的活性成分的缺点。

发明内容

[技术问题]

针对现有的解决食品过敏性问题的方法存在费用高、效果不确定、不易操作, 难以规范化大规模生产, 容易产生严重不良风味等缺点。

[技术方案]

本发明提供了一种制备低致敏性小麦醇溶蛋白的方法。所述方法是先用三聚磷酸钠先对谷朊粉进行磷酸化处理, 再用碱性蛋白酶进行水解处理, 然后提取小麦醇溶蛋白。低致敏性小麦醇溶蛋白, 是指与从没有经过脱除过敏原处理的谷朊粉中提取的小麦醇溶蛋白相比, 进入动物体后, 动物体的过敏指征下降或消失的小麦醇溶蛋白。

所述方法可以采用如下步骤:

(1) 用三聚磷酸钠先对谷朊粉进行磷酸化处理

将谷朊粉与磷酸缓冲液混合, 谷朊粉与磷酸缓冲液的固液比为 1 g: (10~12.5) mL, 磷酸缓冲液的 pH 为 8.5~9.5, 然后添加三聚磷酸钠, 三聚磷酸钠与谷朊粉发生反应;

(2) 用碱性蛋白酶进行水解处理

在 60℃~65℃、pH 9.0~9.5 条件下，添加碱性蛋白酶进行酶促水解反应，碱性蛋白酶的添加量为 180 U~200 U/g 谷朊粉；

(3) 提取小麦醇溶蛋白

将步骤 (2) 酶解处理后的谷朊粉体系的 pH 调节为中性，并干燥、脱脂，用乙醇提取出小麦醇溶蛋白。

所述的用三聚磷酸钠先对谷朊粉磷酸化处理，是将谷朊粉与磷酸缓冲液混合，然后添加三聚磷酸钠，三聚磷酸钠与谷朊粉发生反应。进一步地，谷朊粉与磷酸缓冲液的固液比为 1 g: (10~12.5) mL，磷酸缓冲液的 pH 为 8.5~9.5。进一步地，三聚磷酸钠的添加量与谷朊粉的质量比为 1: 4.5~1: 5.5，三聚磷酸钠分批次添加。更进一步地，三聚磷酸钠的添加量与谷朊粉的质量比为 1: 4.5~1: 5.5，三聚磷酸钠分为 3 等份加入反应体系，分别在反应开始、反应开始后 10~15 min 以及反应开始后 25~30min 时加入；反应温度为 25℃，反应时间为 1 h，搅拌并控制反应体系的 pH 在 8.5~9.5 范围内。

所述的用碱性蛋白酶进行水解处理，是在 60℃~65℃、pH 9.0~9.5 条件下，添加碱性蛋白酶进行酶水解反应。进一步地，每克谷朊粉的碱性蛋白酶的添加量为 180 U~200 U。更进一步地，所述的酶法处理的时间可以是 1 小时，整个反应过程不断搅拌，并用 2 M NaOH 保持反应体系的 pH 为 9.0~9.5。

在本发明的一种实施方式中，磷酸化处理的缓冲液为 pH9.5 或 9.0 的磷酸缓冲液，谷朊粉与磷酸缓冲液的固液比为 1: 10。

在本发明的一种实施方式中，所述的三聚磷酸钠的添加量与谷朊粉的质量比为 1: 5。

在本发明的一种实施方式中，磷酸化处理的温度是 25℃，处理时间为 1h。

在本发明的一种实施方式中，碱性蛋白酶水解处理时，反应体系的 pH 为 9.5。

在本发明的一种实施方式中，碱性蛋白酶水解处理时，碱性蛋白酶的添加量为：每克谷朊粉中添加 200U 碱性蛋白酶。

在本发明的一种实施方式中，所述的酶水解处理的终止办法是将体系的温度升高至 85℃，处理 15 min，使碱性蛋白酶失活。

所述的提取小麦醇溶蛋白为：将处理后的谷朊粉体系的 pH 调节为中性，并冷冻干燥为粉状。用无水乙醚对谷朊粉进行过夜脱脂处理，重复两次后，挥发无水乙醚后，加入 65%乙醇，25℃下提取 1h，提取的固液比为 1: 10。提取的上清液 5000 g 离心 15 min，通过 40℃，90 mbar 旋转蒸发除去上清液中的乙醇，冷冻干燥后得到麦醇溶蛋白。未经磷酸化-酶解处理和处理后的谷朊粉中的麦醇溶蛋白的提取方式相同。

本发明还提供一种脱除谷朊粉中的过敏原的方法，是先用三聚磷酸钠先对谷朊粉进行磷酸化处理，再用碱性蛋白酶进行水解处理。

所述的用三聚磷酸钠先对谷朊粉磷酸化处理，是将谷朊粉与磷酸缓冲液混合，然后添加三聚磷酸钠，三聚磷酸钠与谷朊粉发生反应。进一步地，谷朊粉与磷酸缓冲液的固液比为 1 g: (10~12.5) mL，磷酸缓冲液的 pH 为 8.5~9.5。进一步地，三聚磷酸钠的添加量与谷朊粉的质量比为 1: 4.5~1: 5.5，三聚磷酸钠分批次添加。更进一步地，三聚磷酸钠的添加量与谷朊粉的质量比为 1: 4.5~1: 5.5，三聚磷酸钠分为 3 等份加入反应体系，分别在反应开始、反应开始后 10~15 min 以及反应开始后 25~30min 时加入；反应温度为 25℃，反应时间为 1 h，搅拌并控制反应体系的 pH 在 8.5~9.5 范围内。

所述的用碱性蛋白酶进行水解处理，是在 60℃~65℃、pH 9.0~9.5 条件下，添加碱性蛋白酶进行酶水解反应。进一步地，每克谷朊粉的碱性蛋白酶的添加量为 180 U~200 U。更进一步地，所述的酶法处理的时间可以是 1 小时，整个反应过程不断搅拌，并用 2 M NaOH 保持反应体系的 pH 为 9.0~9.5。

在本发明的一种实施方式中，磷酸化处理的缓冲液为 pH9.5 或 9.0 的磷酸缓冲液，谷朊粉与磷酸缓冲液的固液比为 1: 10。

在本发明的一种实施方式中，所述的三聚磷酸钠的添加量与谷朊粉的质量比为 1: 5。

在本发明的一种实施方式中，磷酸化处理的温度是 25℃，处理时间为 1h。

在本发明的一种实施方式中，碱性蛋白酶水解处理时，反应体系的 pH 为 9.5。

在本发明的一种实施方式中，碱性蛋白酶水解处理时，碱性蛋白酶的添加量为：每克谷朊粉中添加 200U 碱性蛋白酶。

在本发明的一种实施方式中，所述的酶水解处理的终止办法是将体系的温度升高至 85℃，处理 15 min，使碱性蛋白酶失活。

[有益效果]

(1) 本发明工艺步骤简单、处理的时间短、处理的温度低，避免了物理处理方式的时间长、能耗多的缺点。

(2) 将化学处理方式与酶水解结合，既有利于面团的流变性质的改善，也可有效降低麦醇溶蛋白的过敏性，降低了化学试剂的用量。磷酸化处理后的麦醇溶蛋白的二级和三级结构有显著性变化，利用酶法水解将麦醇溶蛋白中不易被酶解的、具有抗原决定部位的片段水解，降低其分子量，其抗原性降低，从而降低麦醇溶蛋白的致敏性。

(3) 本发明采用了中等剂量的三聚磷酸钠的添加量，并分批加入反应体系，避免了反应

体系发生较大的 pH 的变化。较低的处理温度也减少能源的消耗。

(4) 复合处理方式的麦醇溶蛋白的致敏性低于单一方式处理的麦醇溶蛋白。本发明制备的麦醇溶蛋白更易消化，安全，无不良风味、无苦味。

附图说明

通过参照以下附图对处理后的小麦醇溶蛋白所作的详细描述，本发明的特征、目的和优点将会变得更明显。

图 1 实施例 1 中经过磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白的结构变化；(A) 二级结构的含量；(B) 内源性荧光光谱；(C) 表面疏水性；(D) 游离巯基含量。Raw 为未处理的小麦醇溶蛋白，Phos-Alcalase 为经磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白。

图 2 实施例 1 中经过磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白经体外模拟消化后的 SDS-PAGE 图谱；(A)：胃消化 10 min；(B)：胃消化 120 min；(C)：肠消化 10 min；泳道 1 为未处理的小麦醇溶蛋白，泳道 2 为磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白。

图 3 实施例 1 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏表征；(A)：血清 IgE 浓度的变化；(B)：血清组胺浓度的变化。

图 4 实施例 1 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏相关的细胞因子和转录因子表达水平；(A)：IFN- γ ；(B)：IL-4；(C)：IL-5。

图 5 实施例 2 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏表征；(A)：IgE 浓度的变化；(B)：血清组胺浓度的变化。

图 6 实施例 2 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏相关的细胞因子和转录因子表达水平；(A)：IFN- γ ；(B)：IL-4；(C)：IL-5。

图 7 实施例 3 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏表征；(A)：IgE 浓度的变化；(B)：血清组胺浓度的变化。

图 8 实施例 3 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏相关的细胞因子和转录因子表达水平；(A)：IFN- γ ；(B)：IL-4；(C)：IL-5。

图 9 实施例 4 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏表征；(A)：IgE 浓度的变化；(B)：血清组胺浓度的变化。

图 10 实施例 4 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏相关的细胞因子和转录因子表达水平；(A)：IFN- γ ；(B)：IL-4；(C)：IL-5。

图 11 对比例 1 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏表征；(A)：IgE 浓度的变化；(B)：血清组胺浓度的变化。

图 12 对比例 1 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏相关的细胞因子和转录因子表达水平；(A)：IFN- γ ；(B)：IL-4；(C)：IL-5。

图 13 对比例 2 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏表征；(A)：IgE 浓度的变化；(B)：血清组胺浓度的变化。

图 14 对比例 2 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏相关的细胞因子和转录因子表达水平；(A)：IFN- γ ；(B)：IL-4；(C)：IL-5。

图 15 对比例 3 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏表征；(A)：IgE 浓度的变化；(B)：血清组胺浓度的变化。

图 16 对比例 3 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏相关的细胞因子和转录因子表达水平；(A)：IFN- γ ；(B)：IL-4；(C)：IL-5。

图 17 对比例 4 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏表征；(A)：IgE 浓度的变化；(B)：血清组胺浓度的变化。

图 18 对比例 4 中磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏相关的细胞因子和转录因子表达水平；(A)：IFN- γ ；(B)：IL-4；(C)：IL-5。

具体实施方式

相关检测方法：

二级结构测定：使用傅里叶红外法测定小麦醇溶蛋白的二级结构。在 32 次扫描和 4cm^{-1} 条件下记录样品的背景的扫描光谱。溴化钾研磨烘干后与样品研磨混合，压成晶片后，在与背景相同的记录条件下测定。每个样品做三次平行。

内源性荧光光谱：使用荧光光谱仪测定小麦醇溶蛋白的荧光光谱。样品的浓度为 0.5mg/mL ，激发波长为 280 nm ，发射波长范围为 $300\text{-}500\text{ nm}$ 。扫描速度为 1200 nm/min ，反应时间为 0.5 s ，电压为 500 V ，激发和发射缝为 5 nm 。

表面疏水性测定：采用 ANS 显色法测定小麦醇溶蛋白的表面疏水性。小麦蛋白溶于 $\text{pH } 7.0$ 的磷酸缓冲液，蛋白浓度范围为 $0.05\text{-}0.5\text{ mg/mL}$ ，每 4 mL 样品溶液中加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的 8.0 mM 的 ANS，测定的激发波长为 390 nm ，发射波长为 470 nm 。荧光强度随蛋白浓度作曲线的斜率表征小麦醇溶蛋白的表面疏水性。

游离巯基的测定：称取 3 mg 的小麦醇溶蛋白于 5 mL 的 Tris-glycine-EDTA 溶液 30 min ，每 10 min 振荡一次，加入 $40\text{ }\mu\text{L}$ 的 Ellman's reagent，覆盖锡箔纸后 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下存放 30 min 。测定 412 nm 处的吸光值。

体外模拟未处理和磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白胃肠道消化。称取 8 mg 的小麦醇溶蛋

白于离心管中,与 3.86 mL 的模拟胃消化液(SGF)混合,然后加入 1 μ L 的 0.3 M CaCl_2 和 139 μ L 的水。每个离心管在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热后加入 0.16 mL 猪胃蛋白酶,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 2 h。分别在 10 min 和 120 min 时取 100 μ L 消化样品做 SDS-PAGE 分析。消化 2 h 后,用 30 μ L NaHCO_3 终止反应。取 2 mL 的胃消化样品与 1.1 mL 的模拟肠消化液(SIF)混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 预热后,加入 0.5 mL 的胰液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 4 h。分别在胃消化 10 min、120 min 和肠消化 10 min 取消化样品做 SDS-PAGE 分析。

血清中相关过敏因子水平的测定:血清中 IgE,组胺,IL-4, IL-5 的浓度均采用 ELISA 试剂盒测定。按照各试剂盒的说明测定各指标的浓度。

RNA 提取和实时定量荧光 PCR:使用 Trizol 试剂从 C2C12 细胞和组织样品中提取总 RNA,并用 Nanodrop 对 RNA 浓度进行测定。使用 Prime Script RT 系统(Takara)合成第一链 cDNA。实时定量 PCR 在 ABI STEP-ONE7900 RT-PCR 系统上进行。每个样品做三次平行。

本发明通过腹腔注射小麦中的麦醇溶蛋白对 BAL B/c 小鼠进行致敏处理。

实施例 1

称取 100 g 谷朊粉于装有 1000 mL pH 为 9.5 的磷酸缓冲液的烧杯中,1000 mL 缓冲液预置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热 30 min,保证整个反应体系为反应温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,并用 pH 测定反应体系的 pH 值,监测 pH 的变化。在搅拌器 100 rpm 的转速下,使谷朊粉分散在缓冲液体系中。称取 20 g 三聚磷酸钠,分为三等份缓慢加入反应体系中,根据 pH 计的数值变化,不断滴加 2 M 的 NaOH,使 pH 稳定在 9.0~9.5,反应 1 h。

将烧杯置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,调节反应体系的 pH 为 9.0~9.5,加入 20000 U 的碱性蛋白酶,用 2 M 的 NaOH 调节反应体系的 pH 保持在 9.0~9.5,酶解 1 h 后,将反应体系置于 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 15 min,进行灭酶处理。接着 4000 g 离心 15 min,弃上清,沉淀冷冻干燥处理。

提取处理后的谷朊粉中的小麦醇溶蛋白:称 50 g 经过上述磷酸化-酶解处理后的谷朊粉,加入 500 mL 65%的乙醇与 25 $^{\circ}\text{C}$ 下提取 1 h。5000 g 离心 15 min,取上清,40 $^{\circ}\text{C}$, 90 mbar 旋转蒸发除去乙醇后冷冻干燥,得到磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白。类似地,从没有经过磷酸化-酶解处理的谷朊粉中提取得到小麦醇溶蛋白。

将未经磷酸化-酶解处理和经磷酸化-酶解处理后的小麦醇溶蛋白溶于 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS,浓度为 1 mg/mL。再与 40 mg/mL 的氢氧化铝佐剂按 1: 1 等体积混合均匀后致敏小鼠。第一次腹腔注射为第一天,每只小鼠的注射剂量为 0.1 mL,分别在第 7 天和第 14 天再次致敏,共致敏三次。每组小鼠有 5 只,对照组(CON)注射等体积的 PBS,另外两组分别注

射未经磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白（NT）和磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白（Phos-Alcalase）。第 28 天，测定小鼠的脾脏指数，血清中 IgE、组胺浓度以及脾脏中相关细胞因子的 mRNA 表达水平。

如图 1 所示，（A）磷酸化-酶解处理后的小麦醇溶蛋白的二级结构有明显的改变，其中 α -螺旋， β -折叠和 β -转角有明显的改变。（B）荧光强度有明显的降低，且最高峰的位置出现红移现象，说明小麦醇溶蛋白的三级结构发生改变，并且其中的色氨酸和酪氨酸的微环境也发生变化。（C）磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白的表面疏水性有显著降低，说明蛋白表面的疏水基团的位置发生显著改变，也反映出蛋白的三级结构的变化。（D）磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白的游离 SH 含量有显著的增加，说明蛋白的化学键的断裂，进一步说明了蛋白的三级和四级结构发生显著的变化。

如图 2 所示，磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白的体外模拟消化实验结果表明，磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白更容易被消化，在肠道 10 min 后几乎完全被消化。

如图 3 所示，与对照组相比，用未经磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的各项过敏指标均显著性增加，而磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的（A）血清 IgE 浓度；（B）血清组胺浓度比未处理的小麦醇溶蛋白有显著性降低，且与未致敏的小鼠相比，磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏特征无显著性差异。

如图 4 所示，与对照组相比，用未经磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏相关细胞因子均显著性增加，而磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏相关细胞因子比未处理的小麦醇溶蛋白有显著性降低。

实施例 2

称取 100 g 谷朊粉于装有 1000 mL pH 为 8.5~9.5 的磷酸缓冲液的烧杯中，1000 mL 缓冲液预置于 25℃ 水浴预热 30 min，保证整个反应体系为反应温度为 25℃，并用 pH 测定反应体系的 pH 值，监测 pH 的变化。在搅拌器 100 rpm 的转速下，使谷朊粉分散在缓冲液体系中。称取 17.8 g 三聚磷酸钠，分为三等份缓慢加入反应体系中，根据 pH 计的数值变化，不断滴加 2 M 的 NaOH，使 pH 稳定在 8.5~9.5，反应 1 h。

将烧杯置于 65℃ 水浴中，调节反应体系的 pH 为 9.0~9.5，加入 20000 U 的碱性蛋白酶，用 2 M 的 NaOH 调节反应体系的 pH 保持在 9.0~9.5，酶解 1 h 后，将反应体系置于 85℃ 水浴中 15 min，进行灭酶处理。接着 4000 g 离心 15 min，弃上清，沉淀冷冻干燥处理。

提取处理后的谷朊粉中的小麦醇溶蛋白：称 50 g 经过上述磷酸化-酶解处理后的谷朊粉，加入 500 mL 65% 的乙醇与 25℃ 下提取 1 h。5000 g 离心 15 min，取上清，40℃，90 mbar 旋

转蒸发除去乙醇后冷冻干燥，得到磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白。类似地，从没有经过磷酸化-酶解处理的谷朊粉中提取得到小麦醇溶蛋白。

将未经磷酸化-酶解处理和经磷酸化-酶解处理后的小麦醇溶蛋白溶于 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS, 浓度为 1 mg/mL。再与 40 mg/mL 的氢氧化铝佐剂按 1: 1 等体积混合均匀后致敏小鼠。第一次腹腔注射为第一天，每只小鼠的注射剂量为 0.1 mL，分别在第 7 天和第 14 天再次致敏，共致敏三次。每组小鼠有 5 只，对照组 (CON) 注射等体积的 PBS，另外两组分别注射未处理的醇溶蛋白 (NT) 和磷酸化-酶解处理的醇溶蛋白 (Phos-Alcalase)。第 28 天，测定小鼠的脾脏指数，血清中 IgE、组胺浓度以及脾脏中相关细胞因子的 mRNA 表达水平。结果如图 5，图 6。

实施例 3

称取 100 g 谷朊粉于装有 1000 mL pH 为 8.5~9.5 的磷酸缓冲液的烧杯中，1000 mL 缓冲液预置于 25℃ 水浴预热 30 min，保证整个反应体系为反应温度为 25℃，并用 pH 测定反应体系的 pH 值，监测 pH 的变化。在搅拌器 100 rpm 的转速下，使谷朊粉分散在缓冲液体系中。称取 17.8 g 三聚磷酸钠，分为三等份缓慢加入反应体系中，根据 pH 计的数值变化，不断滴加 2 M 的 NaOH，使 pH 稳定在 8.5~9.5，反应 1 h。

将烧杯置于 65℃ 水浴中，调节反应体系的 pH 为 9.0~9.5，加入 18000 U 的碱性蛋白酶，用 2 M 的 NaOH 调节反应体系的 pH 保持在 9.0~9.5，酶解 1 h 后，将反应体系置于 85℃ 水浴中 15 min，进行灭酶处理。接着 4000 g 离心 15 min，弃上清，沉淀冷冻干燥处理。

提取处理后的谷朊粉中的小麦醇溶蛋白：称 50 g 经过上述磷酸化-酶解处理后的谷朊粉，加入 500 mL 65% 的乙醇与 25℃ 下提取 1 h。5000 g 离心 15 min，取上清，40℃，90 mbar 旋转蒸发除去乙醇后冷冻干燥，得到磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白。类似地，从没有经过磷酸化-酶解处理的谷朊粉中提取得到小麦醇溶蛋白。

将未经磷酸化-酶解处理和经磷酸化-酶解处理后的小麦醇溶蛋白溶于 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS, 浓度为 1 mg/mL。再与 40 mg/mL 的氢氧化铝佐剂按 1: 1 等体积混合均匀后致敏小鼠。第一次腹腔注射为第一天，每只小鼠的注射剂量为 0.1 mL，分别在第 7 天和第 14 天再次致敏，共致敏三次。每组小鼠有 5 只，对照组 (CON) 注射等体积的 PBS，另外两组分别注射未处理的醇溶蛋白 (NT) 和磷酸化-酶解处理的醇溶蛋白 (Phos-Alcalase)。第 28 天，测定小鼠的脾脏指数，血清中 IgE、组胺浓度以及脾脏中相关细胞因子的 mRNA 表达水平。结果如图 7，图 8。

实施例 4

称取 100 g 谷朊粉于装有 1250 mL pH 为 8.5~9.5 的磷酸缓冲液的烧杯中, 1000 mL 缓冲液预置于 25℃ 水浴预热 30 min, 保证整个反应体系为反应温度为 25℃, 并用 pH 测定反应体系的 pH 值, 监测 pH 的变化。在搅拌器 100 rpm 的转速下, 使谷朊粉分散在缓冲液体系中。称取 14.5 g 三聚磷酸钠, 分为三等份缓慢加入反应体系中, 根据 pH 计的数值变化, 不断滴加 2 M 的 NaOH, 使 pH 稳定在 8.5~9.5, 反应 1 h。

将烧杯置于 65℃ 水浴中, 调节反应体系的 pH 为 9.0~9.5, 加入 18000 U 的碱性蛋白酶, 用 2 M 的 NaOH 调节反应体系的 pH 保持在 9.0~9.5, 酶解 1 h 后, 将反应体系置于 85℃ 水浴中 15 min, 进行灭酶处理。接着 4000 g 离心 15 min, 弃上清, 沉淀冷冻干燥处理。

提取处理后的谷朊粉中的小麦醇溶蛋白: 称 50 g 经过上述磷酸化-酶解处理后的谷朊粉, 加入 500 mL 65% 的乙醇与 25℃ 下提取 1 h。5000 g 离心 15 min, 取上清, 40℃, 90 mbar 旋转蒸发除去乙醇后冷冻干燥, 得到磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白。类似地, 从没有经过磷酸化-酶解处理的谷朊粉中提取得到小麦醇溶蛋白。

将未经磷酸化-酶解处理和经磷酸化-酶解处理后的小麦醇溶蛋白溶于 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS, 浓度为 1 mg/mL。再与 40 mg/mL 的氢氧化铝佐剂按 1: 1 等体积混合均匀后致敏小鼠。第一次腹腔注射为第一天, 每只小鼠的注射剂量为 0.1 mL, 分别在第 7 天和第 14 天再次致敏, 共致敏三次。每组小鼠有 5 只, 对照组 (CON) 注射等体积的 PBS, 另外两组分别注射未处理的醇溶蛋白 (NT) 和磷酸化-酶解处理的醇溶蛋白 (Phos-Alcalase)。第 28 天, 测定小鼠的脾脏指数, 血清中 IgE、组胺浓度以及脾脏中相关细胞因子的 mRNA 表达水平。结果如图 9, 图 10。

对比例 1

称取 100 g 谷朊粉于装有 2000 mL pH 为 8.5~9.5 的磷酸缓冲液的烧杯中, 1000 mL 缓冲液预置于 37℃ 水浴预热 30 min, 保证整个反应体系为反应温度为 37℃, 并用 pH 测定反应体系的 pH 值, 监测 pH 的变化。在搅拌器 100 rpm 的转速下, 使谷朊粉分散在缓冲液体系中。称取 20 g 三聚磷酸钠, 分为三等份缓慢加入反应体系中, 根据 pH 计的数值变化, 不断滴加 2 M 的 NaOH, 使 pH 稳定在 8.5~9.5, 反应 2 h。

将烧杯置于 65℃ 水浴中, 调节反应体系的 pH 为 9.0~9.5, 加入 10000 U 的碱性蛋白酶, 用 2 M 的 NaOH 调节反应体系的 pH 保持在 9.0~9.5, 酶解 1 h 后, 将反应体系置于 85℃ 水浴中 15 min, 进行灭酶处理。接着 4000 g 离心 15 min, 弃上清, 沉淀冷冻干燥处理。

提取处理后的谷朊粉中的小麦醇溶蛋白: 称 50 g 经过上述磷酸化-酶解处理后的谷朊粉, 加入 500 mL 65% 的乙醇与 25℃ 下提取 1 h。5000 g 离心 15 min, 取上清, 40℃, 90 mbar 旋

转蒸发除去乙醇后冷冻干燥，得到磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白。类似地，从没有经过磷酸化-酶解处理的谷朊粉中提取得到小麦醇溶蛋白。

将未经磷酸化-酶解处理和经磷酸化-酶解处理后的小麦醇溶蛋白溶于 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS, 浓度为 1 mg/mL。再与 40 mg/mL 的氢氧化铝佐剂按 1: 1 等体积混合均匀后致敏小鼠。第一次腹腔注射为第一天，每只小鼠的注射剂量为 0.1 mL，分别在第 7 天和第 14 天再次致敏，共致敏三次。每组小鼠有 5 只，对照组 (CON) 注射等体积的 PBS，另外两组分别注射未处理的醇溶蛋白 (NT) 和磷酸化-酶解处理的醇溶蛋白 (Phos-Alcalase)。第 28 天，测定小鼠的脾脏指数，血清中 IgE、组胺浓度以及脾脏中相关细胞因子的 mRNA 表达水平。结果如图 11，图 12。

对比例 2

称取 100 g 谷朊粉于装有 1000 mL pH 为 8.5~9.5 的磷酸缓冲液的烧杯中，1000 mL 缓冲液预置于 25℃ 水浴预热 30 min，保证整个反应体系为反应温度为 25℃，并用 pH 测定反应体系的 pH 值，监测 pH 的变化。在搅拌器 100 rpm 的转速下，使谷朊粉分散在缓冲液体系中。称取 20 g 三聚磷酸钠，分为三等份缓慢加入反应体系中，根据 pH 计的数值变化，不断滴加 2 M 的 NaOH，使 pH 稳定在 8.5~9.5，反应 30 min。

将烧杯置于 65℃ 水浴中，调节反应体系的 pH 为 9.0~9.5，加入 20000 U 的碱性蛋白酶，用 2 M 的 NaOH 调节反应体系的 pH 保持在 9.0~9.5，酶解 1 h 后，将反应体系置于 85℃ 水浴中 15 min，进行灭酶处理。接着 4000 g 离心 15 min，弃上清，沉淀冷冻干燥处理。

提取处理后的谷朊粉中的小麦醇溶蛋白：称 50 g 经过上述磷酸化-酶解处理后的谷朊粉，加入 500 mL 65% 的乙醇与 25℃ 下提取 1 h。5000 g 离心 15 min，取上清，40℃，90 mbar 旋转蒸发除去乙醇后冷冻干燥，得到磷酸化-酶解处理的小麦醇溶蛋白。类似地，从没有经过磷酸化-酶解处理的谷朊粉中提取得到小麦醇溶蛋白。

将未经磷酸化-酶解处理和经磷酸化-酶解处理后的小麦醇溶蛋白溶于 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS, 浓度为 1 mg/mL。再与 40 mg/mL 的氢氧化铝佐剂按 1: 1 等体积混合均匀后致敏小鼠。第一次腹腔注射为第一天，每只小鼠的注射剂量为 0.1 mL，分别在第 7 天和第 14 天再次致敏，共致敏三次。每组小鼠有 5 只，对照组 (CON) 注射等体积的 PBS，另外两组分别注射未处理的醇溶蛋白 (NT) 和磷酸化-酶解处理的醇溶蛋白 (Phos-Alcalase)。第 28 天，测定小鼠的脾脏指数，血清中 IgE、组胺浓度以及脾脏中相关细胞因子的 mRNA 表达水平。结果如图 13，图 14。

对比例 3 单独采用三聚磷酸钠进行处理

称取 100 g 谷朊粉于装有 1000 mL pH 为 9.5 的磷酸缓冲液的烧杯中, 1000 mL 缓冲液预置于 25℃ 水浴预热 30 min, 保证整个反应体系为反应温度为 25℃, 并用 pH 测定反应体系的 pH 值, 监测 pH 的变化。在搅拌器 100rpm 的转速下, 使谷朊粉分散在缓冲液体系中。称取 20 g 三聚磷酸钠, 分为四等份缓慢加入反应体系中, 根据 pH 计的数值变化, 不断滴加 2 M 的 NaOH, 使 pH 稳定在 9.5, 反应 1 h。

提取处理后的谷朊粉中的小麦醇溶蛋白: 称 50 g 处理后的谷朊粉, 加入 500 mL 65% 的乙醇与 25℃ 下提取 1 h。5000 g 离心 15 min, 取上清, 40℃, 90 mbar 旋转蒸发除去乙醇后冷冻干燥, 得小麦醇溶蛋白。类似地, 从未经处理的谷朊粉中提取小麦醇溶蛋白。

将未处理和处理后的小麦醇溶蛋白溶于 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS, 浓度为 1 mg/mL。再与 40 mg/mL 的氢氧化铝佐剂按 1: 1 等体积混合均匀后致敏小鼠。第一次腹腔注射为第一天, 每只小鼠的注射剂量为 0.1 mL, 分别在第 7 天和第 14 天再次致敏, 共致敏三次。每组小鼠有 5 只, 对照组 (CON) 注射等体积的 PBS, 另外两组分别注射未处理的醇溶蛋白 (NT) 和磷酸化-酶解处理的醇溶蛋白 (Phos-Alcalase)。第 28 天, 测定小鼠的脾脏指数, 血清中 IgE、组胺浓度以及脾脏中相关细胞因子的 mRNA 表达水平。

结果表明:

单独的磷酸化处理对小麦醇溶蛋白的结构并没有显著性的改变, 磷酸化处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏特征与未处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠无显著性差异。结果如图 15, 图 16。

对比例 4 单独采用碱性蛋白酶进行处理

称取 100 g 谷朊粉于装有 1000 mL pH 为 9.0~9.5 的磷酸缓冲液的烧杯中, 1000 mL 缓冲液预置于 65℃ 水浴预热 30 min, 保证整个反应体系为反应温度为 65℃, 并用 pH 测定反应体系的 pH 值, 监测 pH 的变化。在搅拌器 100 rpm 的转速下, 使谷朊粉分散在缓冲液体系中。加入 20000 U 的碱性蛋白酶, 用 2 M 的 NaOH 调节反应体系的 pH 保持在 9.0~9.5, 酶解 1 h 后, 将反应体系置于 85℃ 水浴中 15 min, 进行灭酶处理。接着 4000 g 离心 15 min, 弃上清, 沉淀冷冻干燥处理。

提取处理后的谷朊粉中的小麦醇溶蛋白: 称 50 g 处理后的谷朊粉, 加入 500 mL 65% 的乙醇与 25℃ 下提取 1 h。5000 g 离心 15 min, 取上清, 40℃, 90 mbar 旋转蒸发除去乙醇后冷冻干燥, 得小麦醇溶蛋白。类似地, 从未经处理的谷朊粉中提取小麦醇溶蛋白。

将未处理和处理后的小麦醇溶蛋白溶于 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS, 浓度为 1 mg/mL。再与 40 mg/mL 的氢氧化铝佐剂按 1: 1 等体积混合均匀后致敏小鼠。第一次腹腔注射为第一天,

每只小鼠的注射剂量为 0.1 mL，分别在第 7 天和第 14 天再次致敏，共致敏三次。每组小鼠有 5 只，对照组（CON）注射等体积的 PBS，另外两组分别注射未处理的醇溶蛋白（NT）和磷酸化-酶解处理的醇溶蛋白（Phos-Alcalase）。第 28 天，测定小鼠的脾脏指数，血清中 IgE、组胺浓度以及脾脏中相关细胞因子的 mRNA 表达水平。

结果表明：

单独的磷酸化处理对小麦醇溶蛋白的结构并没有显著性的改变，磷酸化处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠的过敏特征与未处理的小麦醇溶蛋白致敏的小鼠无显著性差异。结果如图 17，图 18。

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。

1. 一种制备低致敏性小麦醇溶蛋白的方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 用三聚磷酸钠先对谷朊粉进行磷酸化处理

将谷朊粉与磷酸缓冲液混合，谷朊粉与磷酸缓冲液的固液比为 1 g: (10~12.5) mL，磷酸缓冲液的 pH 为 8.5~9.5，然后添加三聚磷酸钠，三聚磷酸钠与谷朊粉发生反应；

(2) 用碱性蛋白酶进行水解处理

在 60℃~65℃、pH 9.0~9.5 条件下，添加碱性蛋白酶进行酶促水解反应，碱性蛋白酶的添加量为 180 U~200 U/g 谷朊粉；

(3) 提取小麦醇溶蛋白

将步骤 (2) 酶解处理后的谷朊粉体系的 pH 调节为中性，并干燥、脱脂，用乙醇提取出小麦醇溶蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的一种制备低致敏性小麦醇溶蛋白的方法，其特征在于，步骤 (1) 中三聚磷酸钠的添加量与谷朊粉的质量比为 1: 4.5~1: 5.5，三聚磷酸钠分批次添加。

3. 根据权利要求 2 所述的一种制备低致敏性小麦醇溶蛋白的方法，其特征在于，三聚磷酸钠的添加量与谷朊粉的质量比为 1: 4.5~1: 5.5，三聚磷酸钠分为 3 等份加入反应体系，分别在反应开始、反应开始后 10~15 min 以及反应开始后 25~30min 时加入；反应温度为 25℃，反应总时间为 1 h，搅拌并控制反应体系的 pH 在 8.5~9.5 范围内。

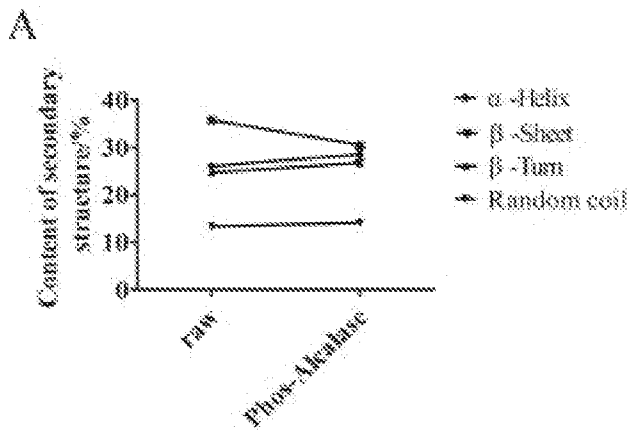
4. 根据权利要求 1 所述的一种制备低致敏性小麦醇溶蛋白的方法，其特征在于，步骤 (2) 中酶促水解反应的时间是 1 小时，整个反应过程中不断搅拌，并用 2 M NaOH 保持反应体系的 pH 为 9.0~9.5。

5. 根据权利要求 1 所述的一种制备低致敏性小麦醇溶蛋白的方法，其特征在于，步骤 (3) 所述提取小麦醇溶蛋白，是将步骤 (2) 酶解处理后的谷朊粉体系的 pH 调节为中性，并冷冻干燥为粉状，用无水乙醚对谷朊粉进行脱脂处理，重复两次后，挥发无水乙醚后，加入乙醇提取麦醇溶蛋白，除去提取液中的乙醇，并进行冷冻干燥，得到小麦醇溶蛋白。

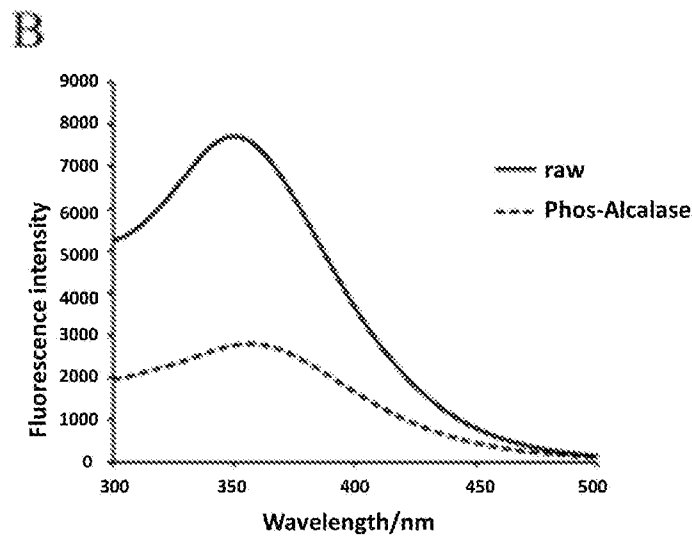
6. 一种脱除谷朊粉中的过敏原的方法，其特征在于，先用三聚磷酸钠先对谷朊粉进行磷酸化处理，再用碱性蛋白酶进行水解处理。

7. 根据权利要求 6 所述的一种脱除谷朊粉中的过敏原的方法，其特征在于，所述的用三聚磷酸钠先对谷朊粉磷酸化处理，是将谷朊粉与磷酸缓冲液混合，然后添加三聚磷酸钠，三聚磷酸钠与谷朊粉发生反应；谷朊粉与磷酸缓冲液的固液比为 1 g: (10~12.5) mL，磷酸缓冲液的 pH 为 8.5~9.5；三聚磷酸钠的添加量与谷朊粉的质量比为 1: 4.5~1: 5.5，三聚磷酸钠分批次添加；所述的用碱性蛋白酶进行水解处理，是在 60℃~65℃、pH 9.0~9.5 条件下，添加碱性蛋白酶进行酶水解反应；每克谷朊粉的碱性蛋白酶的添加量为 180 U~200 U。

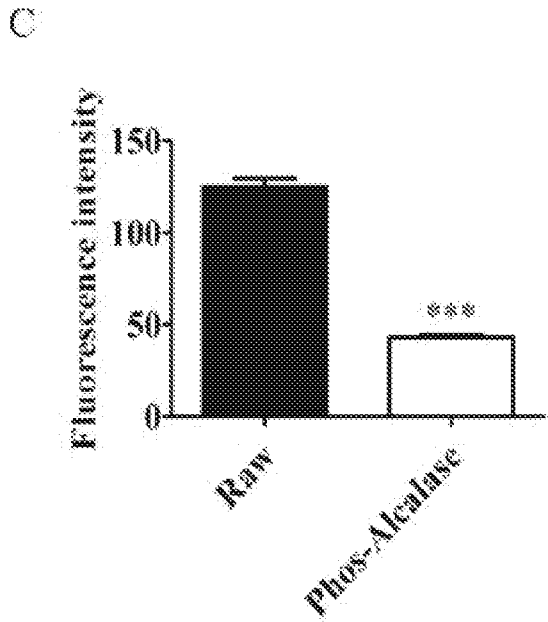
8. 根据权利要求 1~5 任一所述方法制备得到的低致敏性小麦醇溶蛋白或经过权利要求 7 所述方法处理后的谷朊粉，以及根据权利要求 1~5 任一所述方法制备得到的低致敏性小麦醇溶蛋白或经过权利要求 7 所述方法处理后的谷朊粉在制备食品中的应用。



(A)

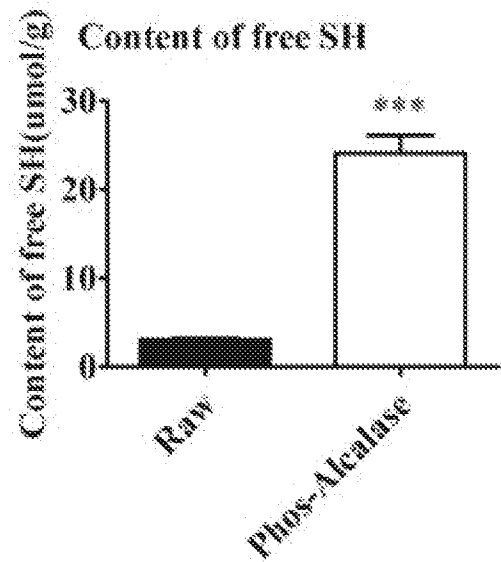


(B)



(C)

D



(D)
图 1

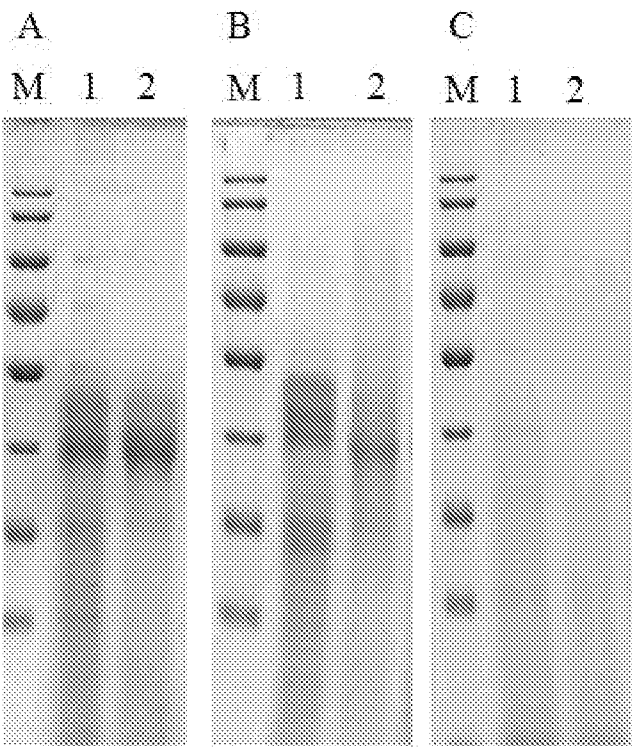


图 2

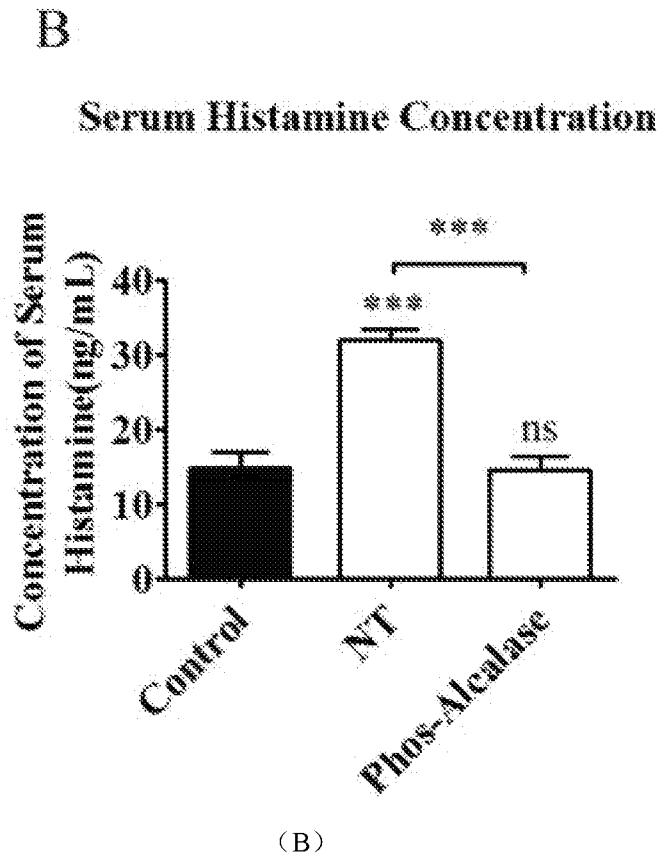
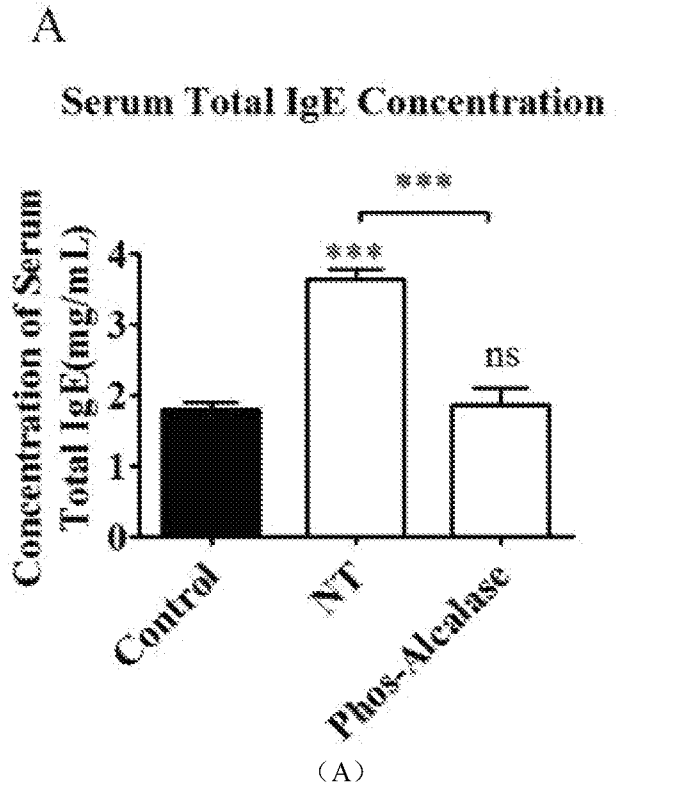
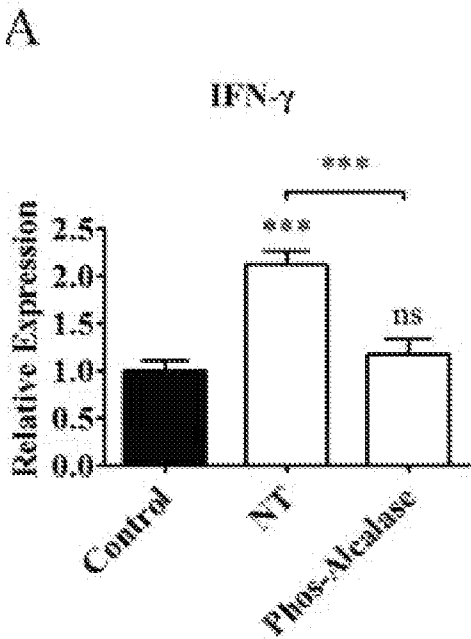
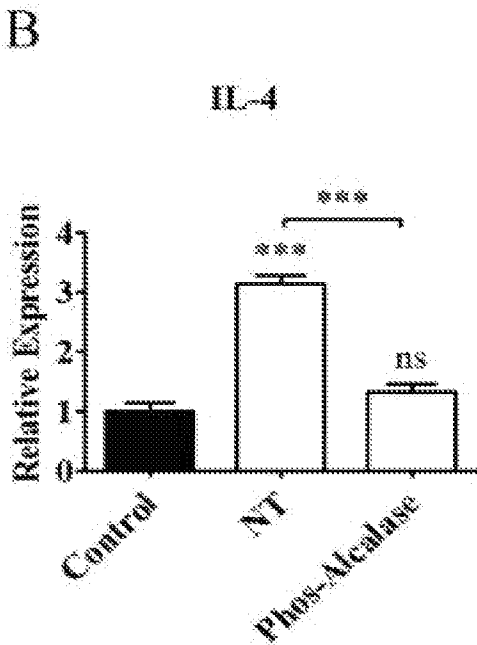


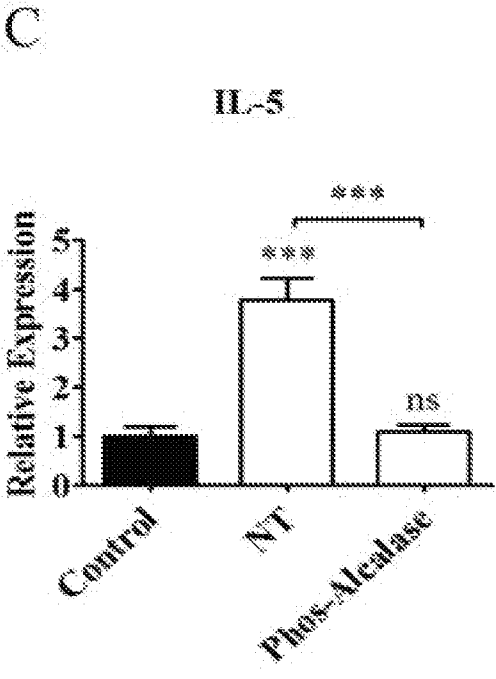
图 3



(A)

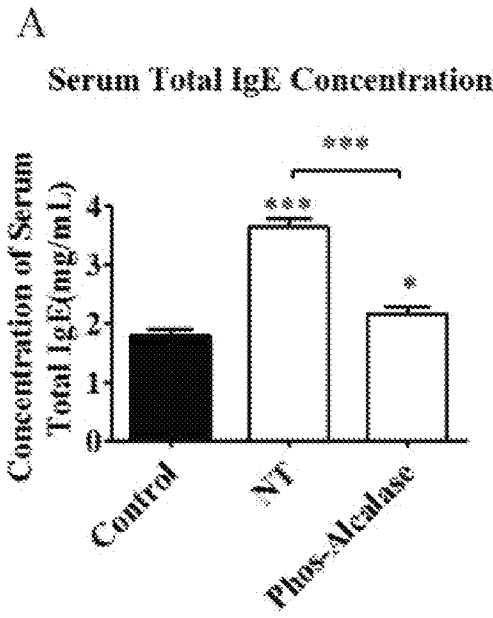


(B)

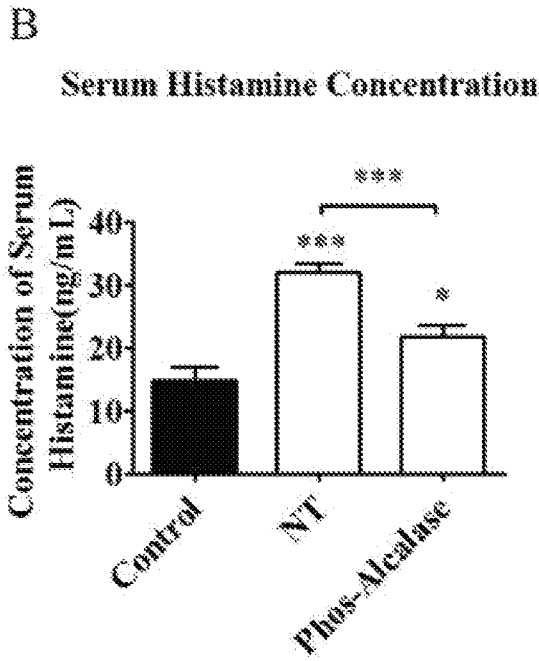


(C)

图 4

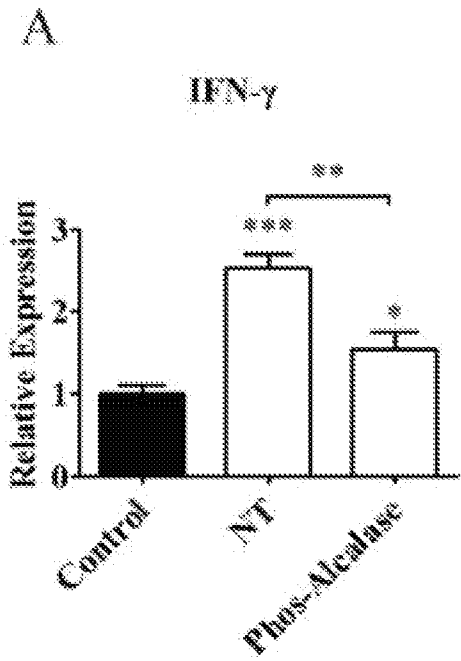


(A)



(B)

图 5



(A)

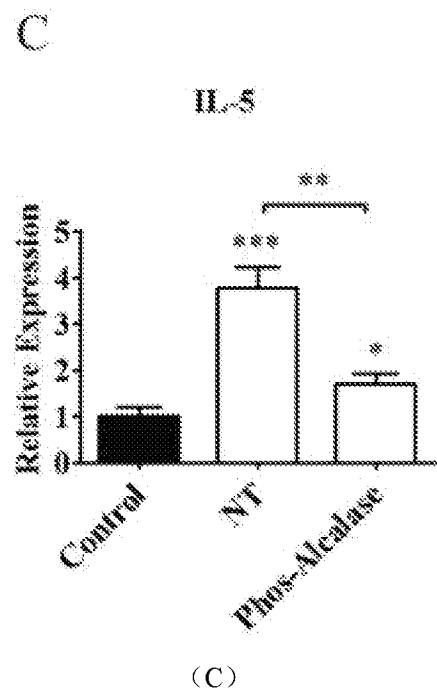
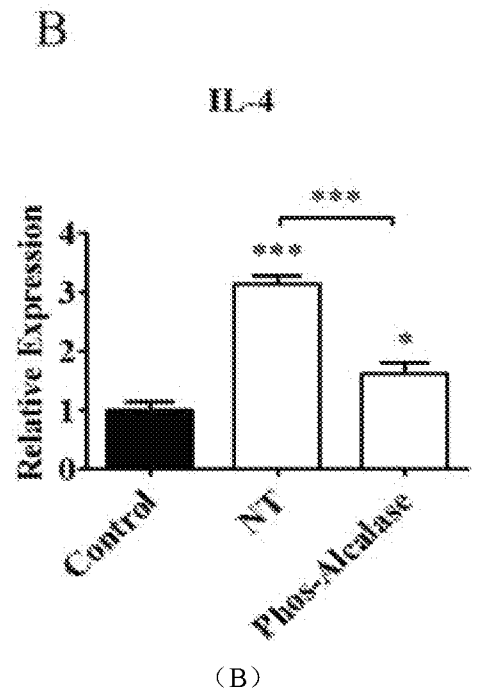


图 6

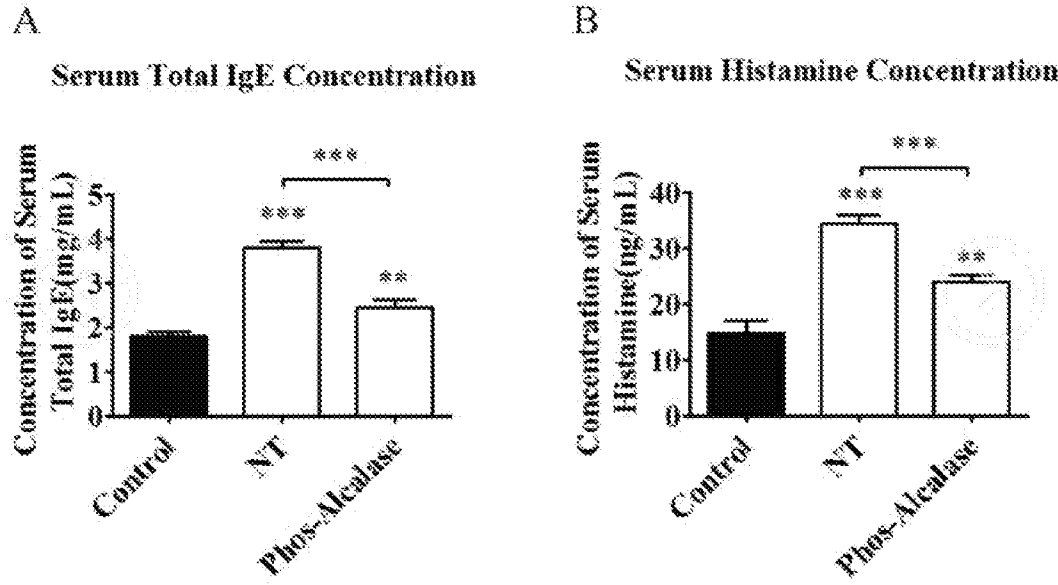


图 7

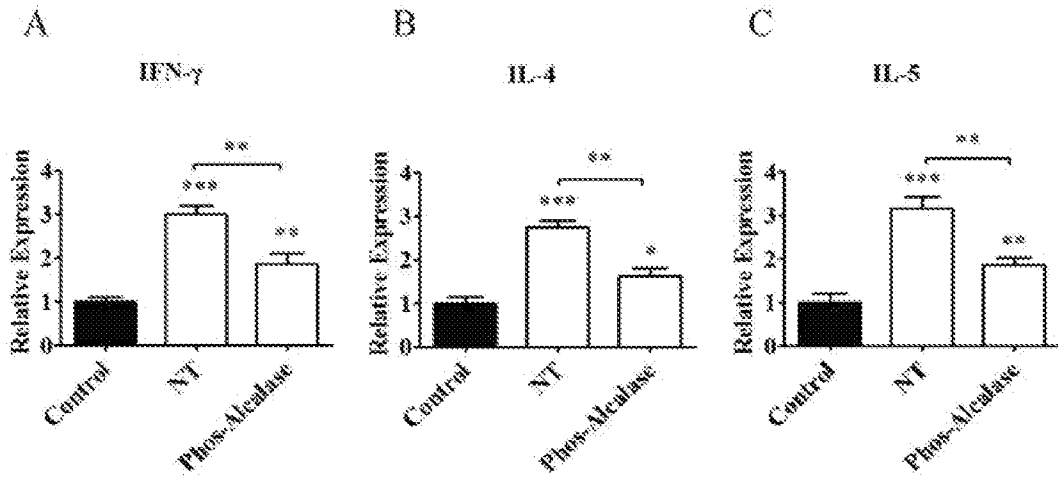


图 8

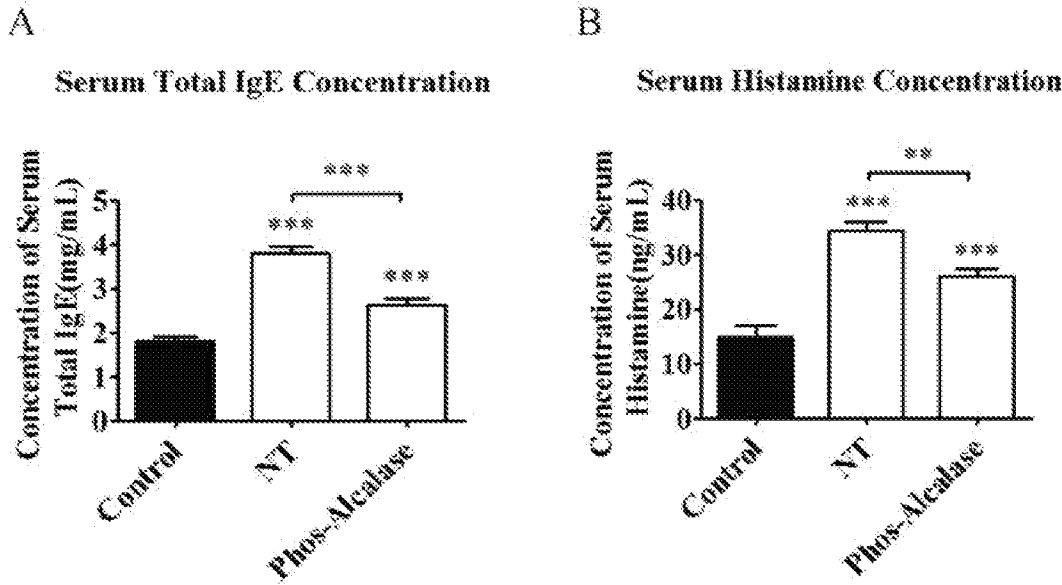


图 9

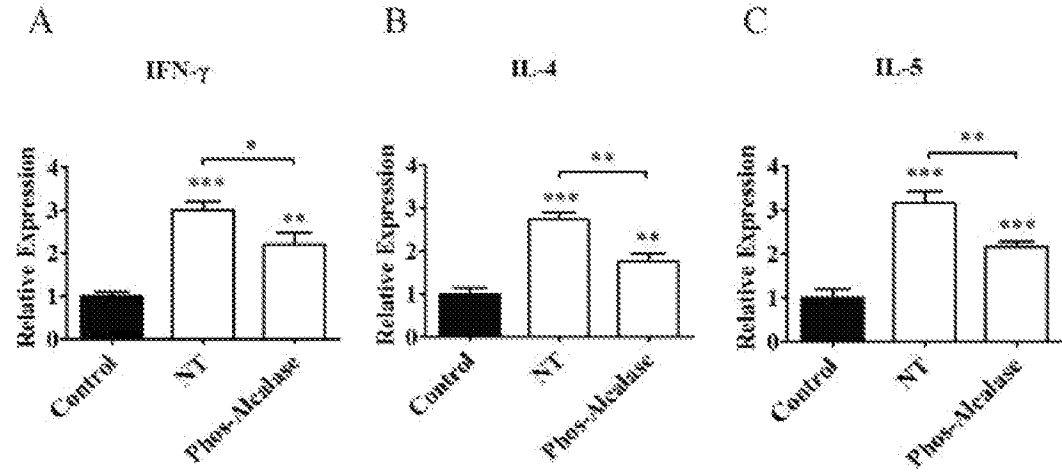


图 10

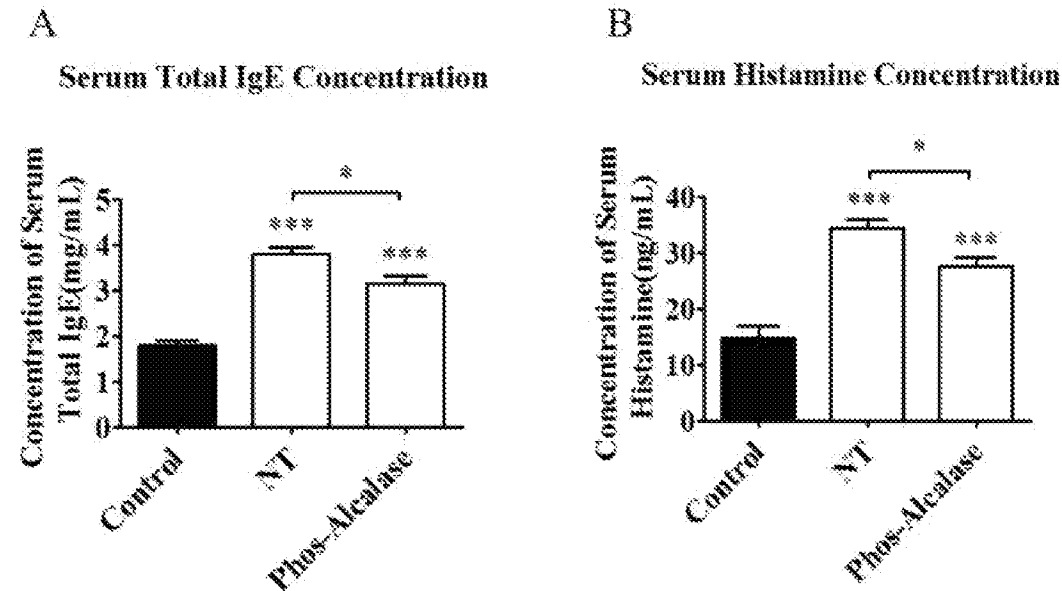


图 11

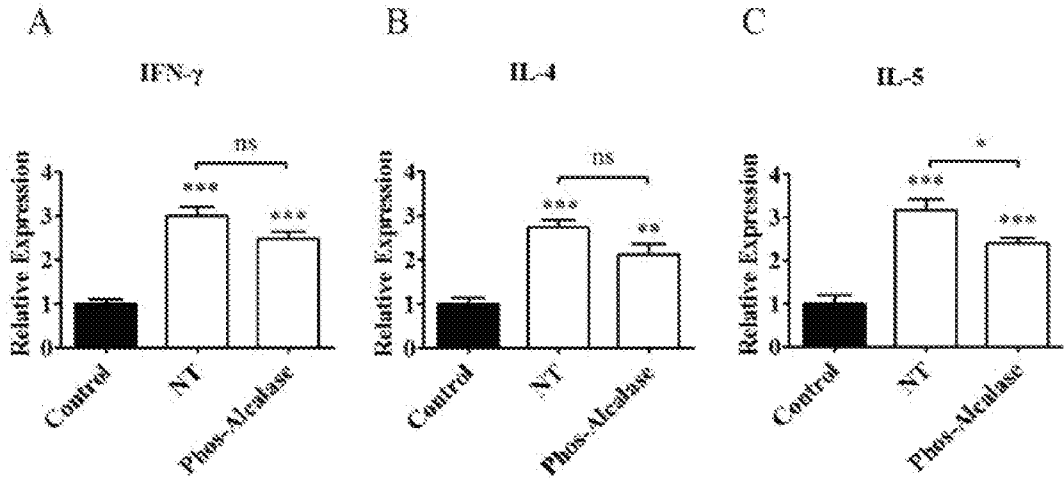


图 12

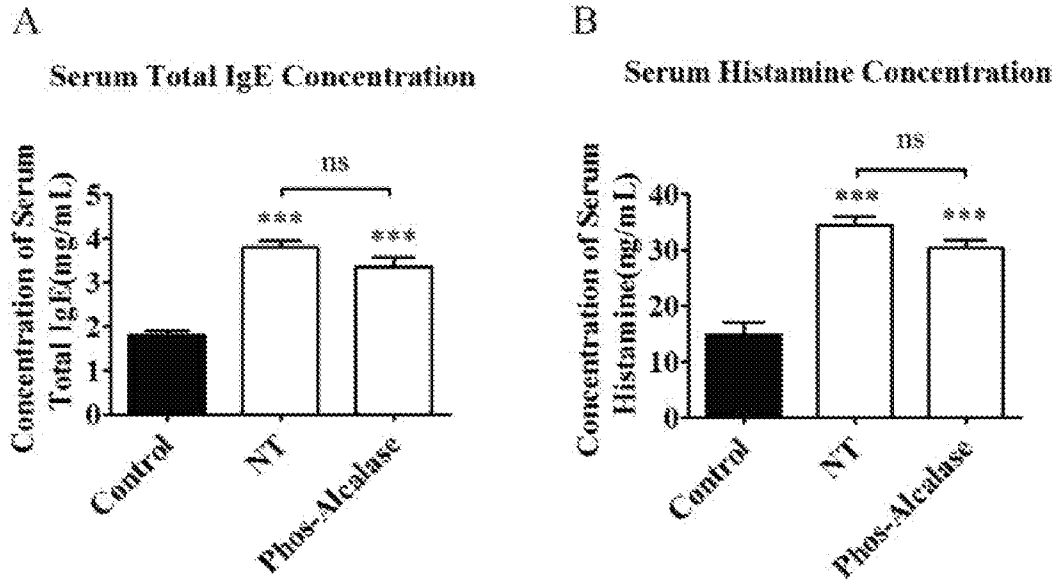


图 13

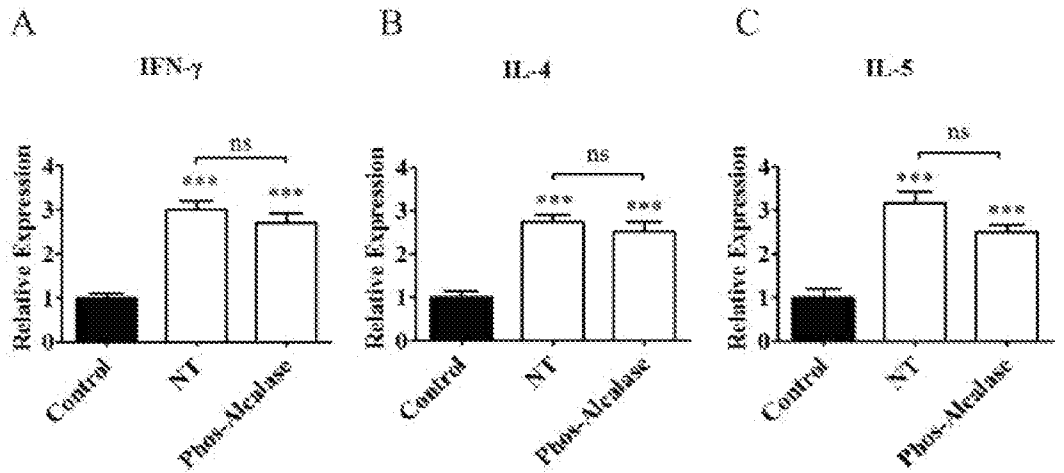


图 14

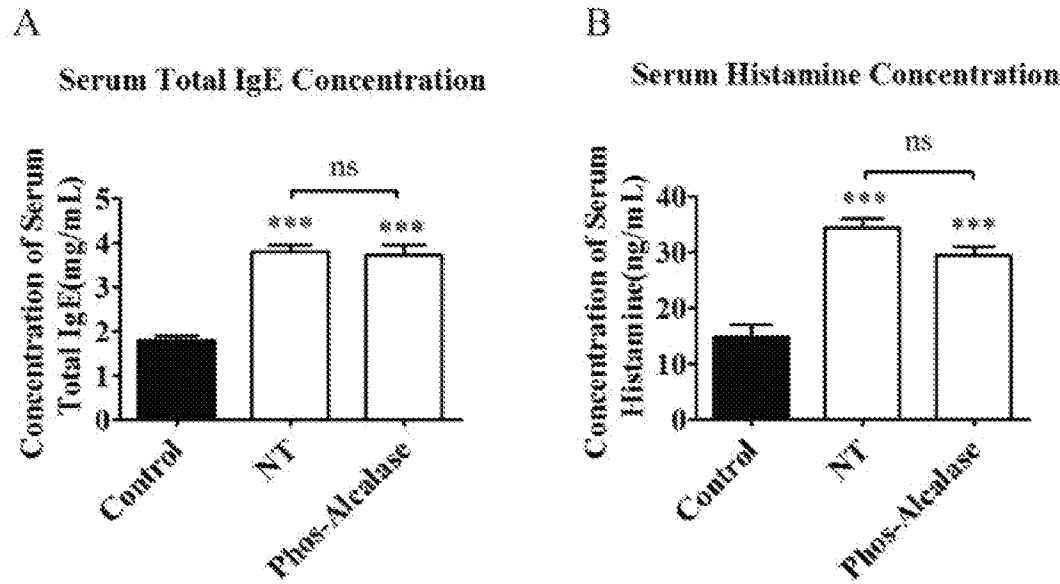


图 15

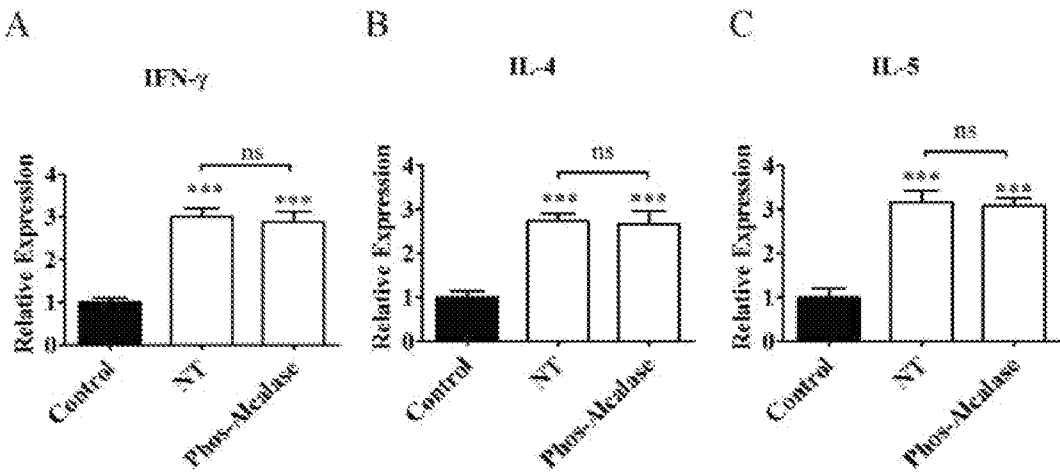


图 16

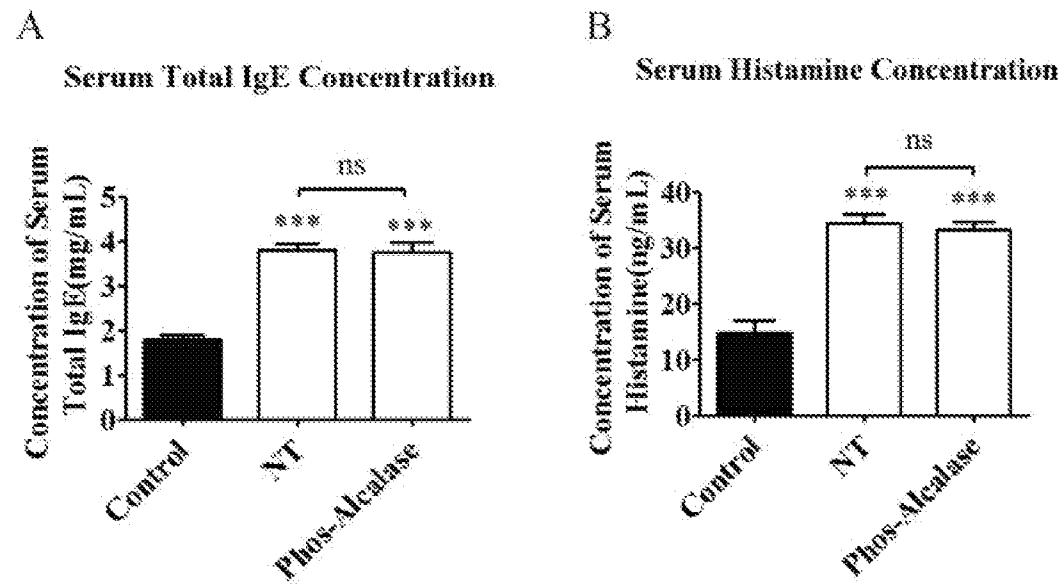


图 17

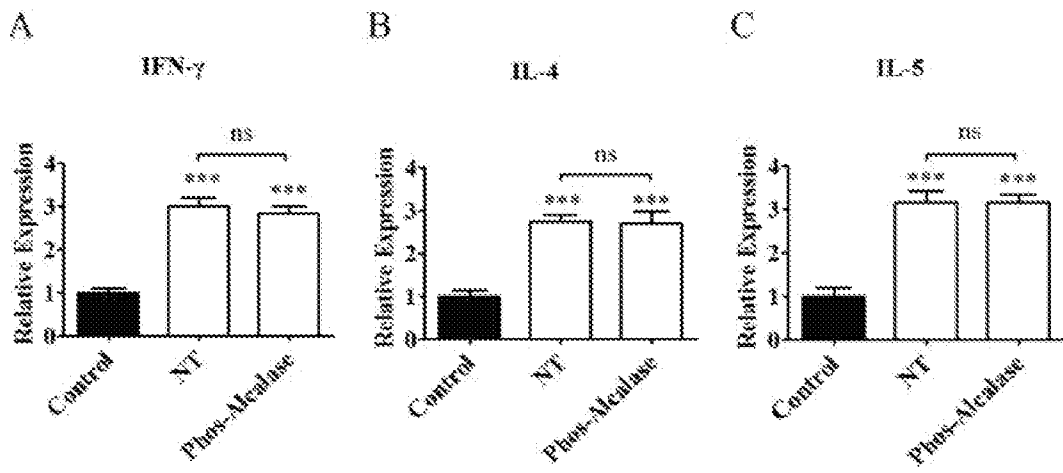


图 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/087101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 21/06(2006.01)i; C07K 14/415(2006.01)i; A23J 1/12(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)

C12P; C07K; 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)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE, ISI Web of Science, 百度学术和检索词: 小麦, 谷朊粉, 面筋蛋白, 醇溶蛋白, 三聚磷酸钠, 碱性蛋白酶, wheat, gluten, gliadin, sodium tripolyphosphate, STP, alkaline protease, 等.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	朱永胜 (ZHU, yongsheng). "STP磷酸化处理对小麦面筋蛋白酶解特性的影响 (INFLUENCE OF STP PHOSPHATE PROCESSING ON ENZYMATIC HYDROLYSIS CHARACTERISTICS OF WHEAT GLUTEN)" 河南工业大学学报 (自然科学版) (<i>Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)</i>), Vol. 32, No. 1., 20 February 2011 (2011-02-20), ISSN: 1673-2383, pages 31-35, see abstract, page 31, left-hand column, paragraph 1 to page 32, left-hand column, paragraph 1	1-8
Y	孟良玉等 (MENG, Liangyu et al.). "小麦致敏蛋白的研究进展 (Progress of Researches on Allergens from Wheat)" 食品与发酵工艺 (<i>non-official translation: Food and Fermentation Industries</i>), Vol. 38, No. 4., 30 April 2012 (2012-04-30), ISSN: 0253-990X, pages 147-151, see text, section 2.1, 2.2 and 3	1-8
PX	CN 110055295 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 26 July 2019 (2019-07-26) claims 1-10, description paragraph [0020]	1-8



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

15 July 2020

Date of mailing of the international search report

30 July 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
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/087101

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	110055295	A	26 July 2019	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/087101

A. 主题的分类 C12P 21/06(2006.01)i; C07K 14/415(2006.01)i; A23J 1/12(2006.01)i; A23J 3/34(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; C07K; 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)) CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE, ISI Web of Science, 百度学术和检索词:小麦, 谷朊粉, 面筋蛋白, 醇溶蛋白, 三聚磷酸钠, 碱性蛋白酶, wheat, gluten, gliadin, sodium tripolyphosphate, STP, alkaline protease, 等。														
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>朱永胜. "STP磷酸化处理对小麦面筋蛋白酶解特性的影响" 河南工业大学学报(自然科学版), 第32卷, 第1期, 2011年 2月 20日 (2011 - 02 - 20), ISSN: 1673-2383, 第31-35页, 参见摘要, 第31页左栏第1段-第32页左栏第1段</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>孟良玉等. "小麦致敏蛋白的研究进展" 食品与发酵工艺, 第38卷, 第4期, 2012年 4月 30日 (2012 - 04 - 30), ISSN: 0253-990X, 第147-151页, 参见正文第2.1、2.2和3节</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 110055295 A (江南大学) 2019年 7月 26日 (2019 - 07 - 26) 权利要求1-10, 说明书第[0020]段</td> <td>1-8</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	朱永胜. "STP磷酸化处理对小麦面筋蛋白酶解特性的影响" 河南工业大学学报(自然科学版), 第32卷, 第1期, 2011年 2月 20日 (2011 - 02 - 20), ISSN: 1673-2383, 第31-35页, 参见摘要, 第31页左栏第1段-第32页左栏第1段	1-8	Y	孟良玉等. "小麦致敏蛋白的研究进展" 食品与发酵工艺, 第38卷, 第4期, 2012年 4月 30日 (2012 - 04 - 30), ISSN: 0253-990X, 第147-151页, 参见正文第2.1、2.2和3节	1-8	PX	CN 110055295 A (江南大学) 2019年 7月 26日 (2019 - 07 - 26) 权利要求1-10, 说明书第[0020]段	1-8
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
Y	朱永胜. "STP磷酸化处理对小麦面筋蛋白酶解特性的影响" 河南工业大学学报(自然科学版), 第32卷, 第1期, 2011年 2月 20日 (2011 - 02 - 20), ISSN: 1673-2383, 第31-35页, 参见摘要, 第31页左栏第1段-第32页左栏第1段	1-8												
Y	孟良玉等. "小麦致敏蛋白的研究进展" 食品与发酵工艺, 第38卷, 第4期, 2012年 4月 30日 (2012 - 04 - 30), ISSN: 0253-990X, 第147-151页, 参见正文第2.1、2.2和3节	1-8												
PX	CN 110055295 A (江南大学) 2019年 7月 26日 (2019 - 07 - 26) 权利要求1-10, 说明书第[0020]段	1-8												
☐ 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 7月 15日		2020年 7月 30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		王颖 电话号码 86-(10)-62412197												

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/087101

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 110055295 A	2019年 7月 26日	无	