



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101917866 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 15

(21) 申请号 200880012016. 7

(22) 申请日 2008. 04. 16

(30) 优先权数据

60/911, 935 2007. 04. 16 US

12/103, 514 2008. 04. 15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 10. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/060486 2008. 04. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02008/131008 EN 2008. 10. 30

(71) 申请人 索莱有限责任公司

地址 美国密苏里州

申请人 诺沃兹美斯公司

(72) 发明人 T·M·王 P·S·克尔 P·戈什

J·隆巴迪 Y·马尔多纳多

L·B·吉特 T·霍夫

L·L·克里斯滕森

P·R·厄斯特加德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李波 付磊

(51) Int. Cl.

A23J 3/34(2006. 01)

A23L 1/305(2006. 01)

C12P 21/06(2006. 01)

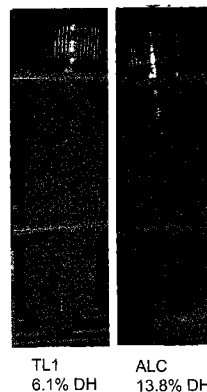
权利要求书 3 页 说明书 60 页 序列表 73 页
附图 23 页

(54) 发明名称

具有改善的感官特性和物理特性的蛋白质水解产物组合物

(57) 摘要

本发明提供了蛋白质水解产物组合物、用于制备蛋白质水解产物组合物的方法、以及包括蛋白质水解产物组合物的食物产品。蛋白质水解产物组合物一般包含多肽片段的混合物,所述多肽片段在每个羧基末端主要具有精氨酸残基或赖氨酸残基。



1. 蛋白质水解产物组合物,所述组合物包含在每个羧基末端主要具有精氨酸残基或赖氨酸残基的多肽片段的混合物,所述组合物在 pH 大于约 6.0 时具有至少约 0.2% DH 的水解度和至少约 80% 的可溶性固体指数。

2. 权利要求 1 的蛋白质水解产物组合物,其中所述组合物来源于选自大豆、大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、小麦、动物、蛋类、以及它们的组合的蛋白质。

3. 权利要求 1 的蛋白质水解产物组合物,其中所述组合物来源于大豆与至少一种选自大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、小麦、动物、乳品和蛋类的蛋白的组合。

4. 权利要求 2 的蛋白质水解产物组合物,其中所述蛋白是大豆。

5. 权利要求 4 的蛋白质水解产物组合物,其中所述组合物的水解度为约 0.2% DH 至约 14% DH。

6. 权利要求 5 的蛋白质水解产物组合物,其中当所述组合物的水解度为约 1% DH 至约 6% DH 时,所述组合物在约 pH 7.0 至约 pH 8.0 的情况下是基本上稳定的。

7. 权利要求 5 的蛋白质水解产物组合物,其中所述组合物在所述水解度为约 6% DH 时比当所述水解度为约 1% DH 时显著地更趋于半透明。

8. 权利要求 5 的蛋白质组合物,其中所述组合物在所述水解度为约 1% DH 至约 6% DH 时比当所述水解度为约 0.2% DH 时具有显著更少的谷物和大豆 / 豆类感官特性。

9. 权利要求 5 的蛋白质水解产物组合物,其中所述组合物在所述水解度小于约 2% DH 时比当所述水解度大于约 2% DH 时具有显著更少的苦味感官特性。

10. 权利要求 4 的蛋白质水解产物组合物,其中所述组合物包含至少两种选自 SEQ ID NO :5-177 和 270-274 的多肽片段。

11. 权利要求 3 的蛋白质水解产物组合物,其中所述组合物来源于大豆和乳品蛋白,并且包含至少两种选自 SEQ ID NO :5-197 和 270-274 的多肽片段。

12. 权利要求 2 的蛋白质水解产物组合物,其中所述组合物来源于低芥酸菜籽蛋白,并且包含至少两种选自 SEQ ID NO :198-237 的多肽片段。

13. 权利要求 2 的蛋白质水解产物组合物,其中所述组合物来源于玉米蛋白,并且包含至少两种选自 SEQ ID NO :238-261 的多肽片段。

14. 权利要求 2 的蛋白质水解产物组合物,其中所述组合物来源于小麦蛋白,并且包含至少两种选自 SEQ ID NO :262-269 的多肽片段。

15. 权利要求 1 的蛋白质水解产物组合物,其中所述组合物还包含未水解的蛋白质,所述未水解的蛋白质选自大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、大豆、小麦、动物、乳品、蛋类、以及它们的组合。

16. 用于制备蛋白质水解产物组合物的方法,所述方法包括使蛋白材料与肽链内切酶接触,所述肽链内切酶特异性地在精氨酸残基或赖氨酸残基的羧基末端侧裂解所述蛋白材料的肽键,以产生在 pH 大于约 6.0 的情况下具有至少约 0.2% DH 的水解度和至少约 80% 的可溶性固体指数的蛋白质水解产物组合物。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述肽链内切酶是食品级微生物酶。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述肽链内切酶是胰蛋白酶样蛋白酶。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述肽链内切酶选自来自尖孢镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶、来自茄病镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶、来自 *Fusariumcf. solani* 的胰蛋白酶样蛋白酶、以及来自水解无色杆菌的赖氨酰肽链内切酶。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述肽链内切酶是来自尖孢镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶。

21. 权利要求 17 的方法,其中所述肽链内切酶包括与选自 SEQ IDNO :1、2、3 和 4 的序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述肽链内切酶包括与选自 SEQ IDNO :1、2、3 和 4 的序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述肽链内切酶包括与选自 SEQ IDNO :1、2、3 和 4 的序列具有至少 95%同一性的氨基酸序列。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述肽链内切酶包括与选自 SEQ IDNO :1、2、3 和 4 的序列具有至少 99%同一性的氨基酸序列。

25. 权利要求 16 的方法,其中所述肽链内切酶在 pH 为约 7.0 至约 9.0 和温度为约 45℃ 至约 60℃ 时具有最佳的蛋白水解活性。

26. 权利要求 16 的方法,其中使约 10mg 至约 1000mg 的所述肽链内切酶与每千克的蛋白材料接触。

27. 权利要求 16 的方法,其中所述蛋白材料选自大豆、大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、小麦、动物、蛋类、以及它们的组合。

28. 权利要求 16 的方法,其中所述蛋白材料是大豆与至少一种选自大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、小麦、动物、乳品和蛋类的蛋白的组合。

29. 权利要求 16 的方法,其中所述蛋白材料是大豆。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述大豆蛋白材料选自大豆提取物、豆奶、豆奶粉、豆腐、脱脂大豆粉、部分脱脂大豆粉、全脂大豆粉、大豆分离蛋白、大豆浓缩蛋白、以及它们的组合。

31. 权利要求 29 的方法,其中所述组合物的水解度为约 0.2% DH 至约 14% DH。

32. 权利要求 29 的方法,其中所述蛋白质水解产物组合物包含至少两种选自 SEQ ID NO :5-177 和 270-274 的多肽片段。

33. 权利要求 28 的方法,其中所述蛋白材料是大豆与乳品的组合,并且所述蛋白质水解产物组合物包含至少两种选自 SEQ ID NO :5-197 和 270-274 的多肽片段。

34. 权利要求 27 的方法,其中所述蛋白材料是低芥酸菜籽,并且所述蛋白质水解产物组合物包含至少两种选自 SEQ ID NO :198-237 的多肽片段。

35. 权利要求 27 的方法,其中所述蛋白材料是玉米,并且所述蛋白质水解产物组合物包含至少两种选自 SEQ ID NO :238-261 的多肽片段。

36. 权利要求 27 的方法,其中所述蛋白材料是小麦,并且所述蛋白质水解产物组合物包含至少两种选自 SEQ ID NO :261-269 的多肽片段。

37. 食物产品,所述食物产品包括:

(a) 可食用材料;和

(b) 蛋白质水解产物组合物,所述组合物包含在每个羧基末端主要具有精氨酸残基或赖氨酸残基的多肽片段混合物,所述组合物在 pH 大于约 6.0 时具有至少约 0.2% DH 的水解

度和至少约 80%的可溶性固体指数。

38. 权利要求 37 的食物产品,其中所述蛋白质水解产物组合物来源于选自大豆、大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、小麦、动物、蛋类、以及它们的组合的蛋白质。

39. 权利要求 37 的食物产品,其中所述蛋白质水解产物组合物来源于大豆与至少一种选自大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、小麦、动物、乳品和蛋类的蛋白的组合。

40. 权利要求 37 的食物产品,其中所述蛋白质水解产物组合物来源于大豆,并且所述水解度为约 0.2% DH 至约 14% DH。

41. 权利要求 37 的食物产品,其中所述食物产品是饮料。

42. 权利要求 41 的食物产品,其中所述饮料选自即饮型饮料、乳或乳类似物饮料、体重控制饮料、蛋白质混合饮料、以及代餐饮料。

43. 权利要求 41 的食物产品,其中所述饮料具有约 6.5 至约 7.5 的 pH。

44. 权利要求 41 的食物产品,其中所述可食用材料选自脱脂乳、全脂乳、奶油、奶粉、脱脂奶粉、酪蛋白酸盐、大豆浓缩蛋白、大豆分离蛋白、乳清浓缩蛋白、乳清分离蛋白、巧克力、可可粉、咖啡、以及它们的组合。

45. 权利要求 37 的食物产品,其中所述食物产品还包括选自甜味剂、乳化剂、增稠剂、稳定剂、脂质材料、防腐剂、抗氧化剂、调味剂、着色剂、维生素、矿物质、以及它们的组合的成分。

46. 权利要求 37 的食物产品,其中所述食物产品选自压成块的(精)加工食品、营养补充剂、基于谷类的食物产品、肉类或肉类类似物产品、以及乳品和乳品类似物产品。

具有改善的感官特性和物理特性的蛋白质水解产物组合物

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于 2007 年 4 月 16 日提交的第 60/911,935 号美国临时申请和 2008 年 4 月 15 日提交的第 12/103,514 号美国非临时性申请的优先权,所述申请的公开内容全文以引用方式并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及具有改善的感官特性和物理特性的蛋白质水解产物组合物、用于制备蛋白质水解产物组合物的方法、以及包括蛋白质水解产物组合物的食物产品。

[0004] 发明背景

[0005] 在美国和世界范围内,肥胖症及肥胖症相关疾病的发病率处于上升状态。虽然肥胖症并非由单独某个潜在因素诱发,一种致病因素可能是许多人的快节奏的、匆忙的生活方式以及同时增加的快速食品消费。大多数快速食品趋于为高脂肪和 / 或高糖的。因此,需要一种能够在忙碌时食用或饮用的有营养的方便的食物产品。该食物产品应该不但美味而且营养合理;即,该食物应该低脂肪、高蛋白、高维生素和高抗氧化剂。

[0006] 一种营养合理且易于食用的食物产品类型是含液体蛋白的饮料。蛋白可来源于大豆或多种其他蛋白源。虽然大豆是一种优异的蛋白来源,但是其趋于具有“青草味”或“豆腥味”,一些人讨厌这种味道或者认为其不可口。因此需要一种减少了“大豆”风味的大豆分离蛋白。此外,要被加入到液体饮料中的理想大豆分离蛋白产品应该是基本上可溶解的,并且有时是基本上半透明的。此外,大豆分离蛋白产品在所需液体饮料的 pH 条件下应该是稳定的。

[0007] 发明概述

[0008] 因此本发明的许多方面是供应蛋白质水解产物组合物。蛋白质水解产物组合物包含多肽片段的混合物,该多肽片段在每个羧基末端主要具有精氨酸残基或赖氨酸残基。此外,蛋白质水解产物组合物具有至少约 0.2% DH 的水解度,并且在 pH 大于约 6.0 时具有至少约 80% 的可溶性固体指数 (SSI)。

[0009] 本发明的另一方面提供了用于制备蛋白质水解产物组合物的方法。该方法包括使蛋白材料与肽链内切酶接触,该肽链内切酶特异性地在精氨酸残基或赖氨酸残基的羧基末端一侧裂解蛋白材料的肽键以制备蛋白质水解产物组合物。蛋白质水解产物组合物具有至少约 0.2% DH 的水解度,并且在 pH 大于约 6.0 时具有至少约 80% 的可溶性固体指数。

[0010] 本发明的另一方面还包括包含可食用材料和蛋白质水解产物组合物的食物产品。蛋白质水解产物组合物包含多肽片段的混合物,该多肽片段在每个羧基末端主要具有精氨酸残基或赖氨酸残基。此外,所述组合物具有至少约 0.2% DH 的水解度,并且在 pH 大于约 6.0 时具有至少约 80% 的可溶性固体指数。

[0011] 本发明的其它方面和特征更详细地描述如下。

[0012] 彩色图的参考

[0013] 该专利申请包含至少一张用彩色制成的像片。具有彩色像片的该专利申请公布的

复印件在提出请求并支付必要费用后可由专利局提供。

[0014] 附图描述

[0015] 图 1 示出了通过镰孢属胰蛋白酶样肽链内切酶 (TL1) 水解的大豆分离蛋白。显示的是考马斯亮蓝染色的 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶的图像。泳道 3 (L3) 包含未水解的大豆分离蛋白 (SUPRO[®] 500E)。泳道 4 (L4)、泳道 5 (L5)、泳道 6 (L6)、泳道 7 (L7) 和泳道 8 (L8) 分别包含具有 0.3% DH、2.2% DH、3.1% DH、4.0% DH 和 5.0% DH 的水解度 (DH) 的 TL1 水解产物。泳道 9 (L9) 包含蛋白质分子量标准品,在凝胶右侧,大小用千道尔顿 (kDa) 指示。

[0016] 图 2 给出了含 5.0% 固体的 TL1 水解产物和 ALCALASE[®] 水解产物的诊断评分,该评分由经过培训的评估员进行评估。在每个图下方给出了每个水解产物的特性和水解度 (% DH)。正评分指示水解产物具有比对照样本更多的感官特性,而负评分指示水解产物具有比对照样本更少的感官特性。对照样本为未水解的大豆分离蛋白。(A) 给出了水解度小于约 2.5% DH 的 TL1 和 ALCALASE[®] (ALC) 水解产物的评分。(B) 给出了水解度大于 3% DH 的 TL1 和 ALCALASE[®] (ALC) 水解产物的评分。

[0017] 图 3 比较 ALCALASE[®] 和 TL1 水解产物的溶解度。在每个管下均给出了每管的酶和水解度 (% DH)。(A) 给出了 ALCALASE[®] (ALC) 和 TL1 水解产物 (2.5% 固体) 在 PH 7.0、4℃ 条件下贮存两周的管。(B) 给出了 TL1 和 ALCALASE[®] (ALC) 水解产物 (2.5% 固体) 在 PH 8.2、4℃ 条件下贮存三周的管。

[0018] 图 4 是 TL1 和 ALCALASE[®] 水解产物的溶解度曲线图。将每个水解产物 (2.5% 固体) 的可溶性固体百分比 (即,可溶性固体指数) 对应于 pH 的函数绘图。在每个图下方给出了每个水解产物的特性和水解度 (% DH)。(A) 给出了 TL1 水解产物的溶解度曲线。(B) 给出了 ALCALASE[®] (ALC) 水解产物的溶解度曲线。(C) 给出了经选择的 TL1 和 ALCALASE[®] (ALC) 水解产物的溶解度的直接比较。

[0019] 图 5 示出了中试规模的大豆蛋白材料 TL1 水解结果。显示的是考马斯亮蓝染色的 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶的图像,TL1 水解产物和对照样本溶解在其中。泳道 1 (L1) 和泳道 3 (L3) 包含未水解的大豆蛋白;泳道 2 (L2) 包含 2.7% DH 的 TL1 水解产物;泳道 4 (L4) 包含水解的对照样本 (用酶混合物将 SUPRO[®] XT 219 水解至 2.8% DH);泳道 5-11 (L5-L11) 分别包含具有 1.3% DH、2.0% DH、3.8% DH、0.3% DH、0.9% DH、1.6% DH 和 5.2% DH 的 TL1 水解产物。泳道 12 (L12) 包含分子量标准品,在凝胶右侧,大小用千道尔顿 (kDa) 指示。

[0020] 图 6 是中试 TL1 水解产物和对照样本的溶解度曲线图。在图下方给出了每个水解产物的水解度 (% DH)。

[0021] 图 7 是中试 TL1 水解产物和对照样本的粘度曲线图。在图下方给出了每个水解产物的水解度 (% DH)。

[0022] 图 8 是粘度和溶解度 [即,可溶性固体指数 (SSI) 和可溶性氮指数 (NSI)] 对应于中试 TL1 水解产物的水解度的函数的曲线图。

[0023] 图 9 示出了 TL1 水解产物中的挥发性调味剂的含量低于对照样本。(A) 示出了在对照样本和具有不同水解度 (% DH) 的 TL1 水解产物中的总挥发活性物质和己醛的含量。(B) 示出了在对照样本和具有不同水解度 (% DH) 的 TL1 水解产物中的指示挥发性调味剂的含量。

[0024] 图 10 是中试 TL1 水解产物和对照样本的诊断评分的曲线图。对照样本是未水解的大豆分离蛋白。正评分指示水解产物具有比对照样本更多的感官特性,而负评分指示水解产物具有比对照样本更少的感官特性。(A) 给出了对照样本、0.3% DH 和 1.6% DH 样本的评分。(B) 给出了对照样本、1.3% DH 和 5.2% DH 样本的评分。(C) 给出了对照样本、2.7% DH 和 0.9% DH 样本的评分。(D) 给出了对照样本、2.0% DH 和 3.8% DH 样本的评分。

[0025] 图 11 是 TL1 水解产物的感官评分对应于水解度 (DH) 的函数的总曲线图。上图是总体嗜好评分,下图是苦味评分。菱形图标代表预测的评分,正方形图标代表实际的评分。

[0026] 图 12 示出了用几种不同的胰蛋白酶样蛋白酶水解大豆分离蛋白的结果。给出了考马斯亮蓝染色的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的图像,其中溶解了未水解的大豆蛋白和酶处理的大豆蛋白样本。在凝胶左侧的泳道 1 包含指示大小的分子量标记。泳道 3 和泳道 9 包含未处理的大豆分离蛋白。泳道 2 和泳道 4-8 分别包含用 TL1、SP3、TL5、TL6、猪胰蛋白酶和牛胰蛋白酶处理的大豆。

[0027] 图 13 示出了大豆和乳品蛋白组合的 TL1 水解产物的溶解度对应于 pH 的函数。

[0028] 图 14 示出了其它植物蛋白材料的 TL1 水解结果。给出了考马斯亮蓝染色的 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶的图像,其中溶解了未处理的和处理的蛋白样本。泳道 1 (L1) 包含分子量标记(在凝胶左侧,用 kDa 指示)。泳道 2 (L2)、泳道 4 (L4) 和泳道 6 (L6) 分别包含未水解的玉米胚芽、低芥酸菜籽和麦芽精样本。泳道 3 (L3)、泳道 5 (L5) 和泳道 7 (L7) 分别包含玉米胚芽、低芥酸菜籽和麦芽精的 TL1 水解产物。

[0029] 图 15 是豆奶型饮料的平均嗜好评分。嗜好程度是:1 = 极其不喜欢;5 = 一般;9 = 极其喜欢。在同一列中、后面有一个不同字母的均值在 95% 置信度下具有显著差异。

[0030] 图 16 是组合型饮料的平均嗜好评分。嗜好程度是:1 = 极其不喜欢;5 = 一般;9 = 极其喜欢。在同一列中、后面有一个不同字母的均值在 95% 置信度下具有显著差异。

[0031] 发明详述

[0032] 本发明提供蛋白质水解产物组合物、用于制备蛋白质水解产物组合物的方法、以及包括蛋白质水解产物组合物的食物产品。如实例中所示,已经发现用在精氨酸残基或赖氨酸残基羧基末端一侧特异性裂解蛋白材料的肽链内切酶消化蛋白材料时,会导致包含多肽片段的组合物具有改善的物理特性、风味和感官特性。因为改善的物理特性、风味和感官特性,可在多种食物产品中有利地利用本发明的蛋白质水解产物组合物。

[0033] (I) 用于制备蛋白质水解产物的方法

[0034] 本发明的一个方面提供了用于制备包括多肽片混合物蛋白质的水解产物的方法,所述多肽片段在每个羧基末端主要具有精氨酸残基或赖氨酸残基。该方法包括使蛋白材料与肽链内切酶接触,该肽链内切酶特异性地在精氨酸残基或赖氨酸残基的羧基末端一侧裂解蛋白材料的肽键以制备蛋白质水解产物。用于制备蛋白质水解产物的蛋白材料或蛋白材料的组合可以并且将会不同。合适的蛋白材料的实例详述如下。

[0035] (a) 大豆蛋白材料

[0036] 在一些实施方案中,蛋白材料可以是大豆蛋白材料。可在本发明的方法中使用多种大豆蛋白材料以生成蛋白质水解产物。一般来讲,大豆蛋白材料可根据本领域已知的方法源自于全大豆。全大豆可以是标准大豆(即,非转基因大豆)、转基因大豆(如具有经修饰的脂肪的大豆、具有经修饰的碳水化合物的大豆、具有经修饰的蛋白的大豆,等等)或它

们的组合。大豆蛋白材料的合适的实例包括大豆提取物、豆奶、豆奶粉、豆腐、大豆粉、大豆分离蛋白、大豆浓缩蛋白、以及它们的混合物。

[0037] 在一个实施方案中,该方法中使用的大豆蛋白材料可以是大豆分离蛋白(也称为分离大豆蛋白或 ISP)。一般来讲,大豆分离蛋白基于不含水分具有至少约 90%大豆蛋白的蛋白含量。大豆分离蛋白可包括完整的大豆蛋白或部分水解的大豆蛋白。大豆分离蛋白可具有高含量的贮藏蛋白亚基如 7S、11S、2S 等。本发明中可用作原料的大豆分离蛋白的非限制性实例是可商购获得的,例如得自 Solae, LLC(St. Louis, MO)和在包括 SUPRO[®] 500E、SUPRO[®] EX 45、SUPRO[®] 620、SUPRO[®] 670、SUPRO[®] EX 33、SUPRO[®] PLUS 2600F、SUPRO[®] PLUS 2640 DS、SUPRO[®] PLUS 2800、SUPRO[®] PLUS 3000 的商品之中、以及它们的组合。

[0038] 在另一个实施方案中,大豆蛋白材料可以是大豆浓缩蛋白,它具有基于不含水分约 65%至小于约 90%的蛋白含量。本发明中使用的合适大豆浓缩蛋白的实例包括 PROCON[™] 产品系列、ALPHA[™] 12 和 ALPHA[™] 5800,所有这些产品可从 Solae, LLC 商购获得。作为另外一种选择,大豆浓缩蛋白可与大豆分离蛋白共混以作为大豆蛋白材料的来源取代部分的大豆分离蛋白。通常,如果大豆浓缩蛋白取代部分大豆分离蛋白,大豆浓缩蛋白取代按重量计最多约 40%的大豆分离蛋白,更优选地取代按重量计最多约 30%的大豆分离蛋白。

[0039] 在另一个实施方案中,大豆蛋白材料可以是大豆粉,它具有基于不含水分约 49%至约 65%的蛋白含量。大豆粉可以是脱脂大豆粉、部分脱脂大豆粉、或全脂大豆粉。大豆粉可以与大豆分离蛋白或大豆浓缩蛋白共混。

[0040] 在另一个实施方案中,大豆蛋白材料可以是基于离心机中的沉淀已被分成四种主要贮藏蛋白片段或亚基(15S、11S、7S 和 2S)的材料。一般来讲,11S 片段高度富集了大豆球蛋白,而 7S 片段高度富集了 β -大豆伴球蛋白。在另一个实施方案中,大豆蛋白材料可以是来自高油酸大豆的蛋白。

[0041] (b) 其它蛋白材料

[0042] 在另一个实施方案中,蛋白材料可来自非大豆的植物。作为非限制性实例,合适的植物包括苋属植物、竹芋、大麦、荞麦、低芥酸菜籽、木薯、桃豆(鹰嘴豆)、豆类、兵豆、羽扇豆、玉米、小米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、裸麦、高粱、向日葵、木薯、黑小麦、小麦、以及它们的混合物。尤其优选植物蛋白包括大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、小麦、以及它们的组合。在一个实施方案中,植物蛋白材料可以是低芥酸菜籽粗粉、低芥酸菜籽分离蛋白、低芥酸菜籽浓缩蛋白、以及它们的组合。在另一个实施方案中,植物蛋白材料可以是玉米或谷物蛋白粉、玉米或谷物浓缩蛋白、玉米或谷物分离蛋白、玉米或谷物胚芽、玉米或谷物谷蛋白、玉米或谷物谷蛋白粗粉、玉米或谷物面粉、玉米蛋白、以及它们的组合。在另一个实施方案中,植物蛋白材料可以是小麦粉、小麦浓缩蛋白、小麦分离蛋白、小麦粗粉、小麦面粉、以及它们的组合。在另一个实施方案中,植物蛋白材料可以是羽扇豆粉、羽扇豆分离蛋白、羽扇豆浓缩蛋白、以及它们的组合。在另一个实施方案中,植物蛋白材料可以是燕麦片、燕麦粉、燕麦蛋白粉、燕麦分离蛋白、燕麦浓缩蛋白、以及它们的组合。在另一个实施方案中,植物蛋白材料可以是豌豆粉、豌豆分离蛋白、豌豆浓缩蛋白、以及它们的组合。在另一个实施方案中,植物蛋白材料可以是马铃薯蛋白粉、马铃薯分离蛋白、马铃薯浓缩蛋白、马铃薯粉、以及它们的组合。在另一个实施方案中,植物蛋白材料可以是米粉、大米

粗粉、大米蛋白粉、大米分离蛋白、大米浓缩蛋白、以及它们的组合。在另一个实施方案中，植物蛋白材料可以是小麦蛋白粉、小麦谷朊粉、麦芽精、面粉、小麦分离蛋白、小麦浓缩蛋白、可溶性小麦蛋白、以及它们的组合。在另一个实施方案中，蛋白材料可来源于动物。在一个实施方案中，动物蛋白材料可来源于蛋类。合适的蛋类蛋白的非限制性实例包括蛋粉、干燥蛋固体、干燥蛋清蛋白、液体蛋清蛋白、蛋清蛋白粉、分离卵清蛋白、以及它们的组合。蛋类蛋白可来源于鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋、鹌鹑蛋、或其他鸟类的蛋。在另一个实施方案中，蛋白材料可来源于乳品。合适的乳蛋白包括脱脂奶粉、分离乳蛋白、浓缩乳蛋白、酸酪蛋白、酪蛋白酸盐（例如酪蛋白酸钠、酪蛋白酸钙等）、乳清分离蛋白、乳清浓缩蛋白、以及它们的组合。乳蛋白材料可以来源于母牛、山羊、绵羊、驴子、骆驼、羊驼、牦牛、水牛等。在另一个实施方案中，蛋白可来源于陆栖动物或水栖动物的肌肉、器官、结缔组织、或骨骼。例如动物蛋白可以是明胶，它通过部分水解胶原制备，胶原提取自牛或其它动物的骨、结缔组织、器官等等。

[0043] 在本发明的方法中也设想使用大豆蛋白材料和至少一种其它蛋白材料的组合。即，可由大豆蛋白材料和至少一种其它蛋白材料的组合制备蛋白质水解产物组合物。在一个实施方案中，蛋白质水解产物组合物可以由大豆蛋白材料和一种其它蛋白材料的组合制备，其它蛋白材料选自大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、小麦、动物材料、乳品和蛋类。在另一个实施方案中，蛋白质水解产物组合物可以由大豆蛋白材料和两种其它蛋白材料的组合制备，其它蛋白材料选自大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、小麦、动物材料、乳品和蛋类。在另一个实施方案中，蛋白质水解产物组合物可以由大豆蛋白材料和三种或更多种其它蛋白材料的组合制备，其它蛋白材料选自大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、小麦、动物材料、乳品和蛋类。

[0044] 所用的大豆蛋白材料和其它蛋白材料的浓度可能并且将会不同。组合中使用的大豆蛋白材料的量可以在约 1% 至约 99% 总蛋白的范围内。在一个实施方案中，组合中使用的大豆蛋白材料的量可以在约 1% 至约 20% 总蛋白的范围内。在另一个实施方案中，组合中使用的大豆蛋白材料的量可以在约 20% 至约 40% 总蛋白的范围内。在另一个实施方案中，组合中使用的大豆蛋白材料的量可以在约 40% 至约 80% 总蛋白的范围内。在另一个实施方案中，组合中使用的大豆蛋白材料的量可以在约 80% 至约 99% 总蛋白的范围内。同样的，组合中使用的其它蛋白材料（至少一种）的量可以在约 1% 至约 99% 总蛋白的范围内。在一个实施方案中，组合中使用的其它蛋白材料的量可以在约 1% 至约 20% 总蛋白的范围内。在另一个实施方案中，组合中使用的其它蛋白材料的量可以在约 20% 至约 40% 总蛋白的范围内。在另一个实施方案中，组合中使用的其它蛋白材料的量可以在约 40% 至约 80% 总蛋白的范围内。在另一个实施方案中，组合中使用的其它蛋白材料的量可以在约 80% 至约 99% 总蛋白的范围内。

[0045] (c) 蛋白浆液

[0046] 在本发明的方法中，通常将蛋白材料混合或分散在水中以形成按重量计包括约 1% 至约 20% 蛋白（基于“按原样”）的浆液。在一个实施方案中，所述浆液可包括按重量计约 1% 至约 5% 的蛋白（按原样）。在另一个实施方案中，所述浆液可包括按重量计约 6% 至约 10% 的蛋白（按原样）。在另一个实施方案中，所述浆液可包括按重量计约 11% 至约 15% 的蛋白（按原样）。在另一个实施方案中，所述浆液可包括按重量计约 16% 至约 20% 的蛋白（按原样）。

[0047] 在将蛋白材料分散到水中后,可将蛋白材料的浆液加热到约 70℃至约 90℃约 2 分钟至约 20 分钟以失活推定的内源蛋白酶抑制剂。通常,对蛋白浆液的 pH 和温度进行调节以优化水解反应,特别是确保水解反应中使用的肽链内切酶的功能接近其最佳活性水平。蛋白浆液的 pH 可根据本领域一般已知的方法进行调节及监控。可将蛋白浆液的 pH 调节至并保持在约 pH 5.0 至约 PH 10.0。在一个实施方案中,可将蛋白浆液的 pH 调节至并保持在约 PH 7.0 至约 PH 8.0。在另一个实施方案中,可将蛋白浆液的 pH 调节至并保持在约 PH 8.0 至约 PH 9.0。在一个优选的实施方案中,可将蛋白浆液的 pH 调节至并保持在约 PH 8.0。根据本领域已知的方法,在水解反应期间可将蛋白浆液的温度优选地调节至并保持在约 40℃至约 70℃。在一个优选的实施方案中,在水解反应期间可将蛋白浆液的温度优选地调节至并保持在约 50℃至约 60℃。一般来讲,高于此范围的温度可最终失活肽链内切酶,然而低于或高于此范围的温度趋于减缓肽链内切酶的活性。

[0048] (d) 肽链内切酶

[0049] 水解反应一般由将肽链内切酶加入到蛋白材料浆液中引发。几种肽链内切酶在本发明的方法中适用。优选地,肽链内切酶将是食品级酶。肽链内切酶在如下的水解条件下可具有最佳活性:约 pH 6.0 至约 PH11.0,更优选约 PH 7.0 至约 pH 9.0,温度约 40℃至约 70℃,更优选约 45℃至约 60℃。

[0050] 一般来讲,肽链内切酶将是 S1 丝氨酸蛋白酶家族 (MEROPS Peptidase Database, 版本 8.00A ;//merops.sanger.ac.uk) 的一员。优选地,肽链内切酶将在精氨酸、赖氨酸或两种残基的羧基末端一侧裂解肽键。因此,肽链内切酶可以是胰蛋白酶样肽链内切酶,它在精氨酸、赖氨酸或两种残基的羧基末端一侧裂解肽键。可将本发明上下文中的胰蛋白酶样肽链内切酶定义为具有大于 100 (参见实施例 16) 的胰蛋白酶比率的肽链内切酶。胰蛋白酶样肽链内切酶可以是赖氨酰肽链内切酶,它在赖氨酸残基的羧基末端一侧裂解肽键。在优选的实施方案中,肽链内切酶可以是微生物来源的,更优选真菌来源的肽链内切酶。虽然胰蛋白酶和胰蛋白酶样肽链内切酶得自其他来源 (例如动物来源),动物来源的胰蛋白酶可能不能裂解蛋白原材料,如实施例 14 所示。

[0051] 在一个实施方案中,肽链内切酶可以是来自尖孢镰孢 (美国专利 5,288,627 ;美国专利 5,693,520,每个专利均据此全文以引用方式并入) 的胰蛋白酶样蛋白酶。该肽链内切酶被称作“TL1”并且在表 A 中给出了其蛋白质序列 (SEQ ID NO :1)。TL1 的保藏编号是 SWISSPROT No. P35049,其 MEROPS ID 是 S01.103。在另一个实施方案中,肽链内切酶可以是来自茄病镰孢 (国际专利申请 W02005/040372-A1,它全文并入本文中) 胰蛋白酶样蛋白酶。该肽链内切酶被称作“TL5”并且在表 A 中给出了其蛋白质序列 (SEQ ID NO :2)。TL5 的保藏编号是 GENESEQP :ADZ80577。在另一个实施方案中,肽链内切酶可以是来自 *Fusarium cf. solani* 的胰蛋白酶样蛋白酶。该肽链内切酶被称作“TL6”并且在表 A 中给出了其蛋白质序列 (SEQ ID NO :3)。在另一个实施方案中,肽链内切酶可以是来自水解无色杆菌的赖氨酰肽链内切酶。该肽链内切酶被称作“SP3”并且在表 A 中给出了其蛋白质序列 (SEQ ID NO :4)。SP3 的保藏编号是 SWISSPROT No. 15636,SP3 的 MEROPS ID 是 S01.280。在一个示例性实施方案中,肽链内切酶可以是 TL1。

[0052] 表 A :示例性胰蛋白酶样蛋白酶。

[0053]

SEQ ID NO :	说明	序列
1	来自尖孢镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶 (TL1)	MVKFASVVALVAPLAAAAPQEIPNIVGGTS ASAGDFPFIVSISRNGGPWCGGSLLNANTV LTAAHCVSGYAQSGFQIRAGSLSRTSGGIT SSLSSVRVHPSYSGNNDLAILKLSTSIPSG GNIGYARLAASGSDPVAGS SATVAGWGAT SEGGSSTPVNLLKVTVP IVSRATCRAQYGT SAITNQMF CAGVSSGGKDSCQGDSGGPIV DSSNTLIGAVSWGNGCARPNYSGVYASVG ALRSFIDTYA
2	胰蛋白酶样蛋白酶 (TL5), 来自茄病镰孢	MVKFAAILALVAPLVAARPQDSSPMIVGGT AASAGDFPFIVSIAYNNGGPWCGGTLLNANT VMTAAHCTQGRSASAFQVRAGSLNRNSG GVTSSVSSIRIHPSFSSSTLNNDVSILKLSTPI STSSTISYGRLAASGSDPVAGSDATVAGW GVT SQGSSSPVALRKVTIPIVSR TTCRSQY GTSAITTNMFCAGLAEGGKDSCQGDSGGPI VDSNTVIGIVSWGEGCAQPNLSGVYARV GSLRTYIDGQL
3	胰蛋白酶样蛋白酶 (TL6), 来自 Fusarium cf. solani	MVKFAAILALVAPLVAARPQDRPMIVGGT AASAGDFPFIVSIAYNNGGPWCGGTLLNAST VLTAHCTQGRSASAFQVRAGSLNRNSGG VTSVSSIRIHPSFSGSTLNNDVSILKLSTPIS TSSTISYGRLAASGSDPAAGSDATVAGWG VTSQ GSSSPVALRKVTIPIVSR TTCRSQY TSAITTNMFCAGLAEGGKDSCQGDSGGPIV DTSNTVIGIVSWGEGCAQPNFSGVYARVG SLRSYIDGQL

4	来自水解 无色杆菌 的赖氨酰 肽链内切 酶 (SP3)	MKRICGSLLLLGLSISAALAAPASRPAAFDY ANLSSVDKVALRTMPAVDVAKAKAEDLQ RDKRGDIPRFALAIDVDMTPQNSGAWEYT ADGQFAVWRQVRSEKALSLNFGFTDYY MPAGGRLLVYPATQAPAGDRGLISQYDAS NNNSARQLWTAVVPGAEAVIEAVIPRDKV GEFKLRLTKVNHDYVGFGLARRLAAASG EKGVS GSCNIDVVCPEGDGRDIIIRAVGAY SKSGTLACTGSLVNNTANDRKMYFLTAHH CGMGTASTAASIVVYWNYNQNSTCRAPNT PASGANGDGSMSTQSGSTVKATYATSDF TLLELNNAANPAFNLFWAGWDRRDQNY GAIAIHPNVAEKRISNSTSPTS FVAWGGG AGTTHLNVQWQPSGGVTEPGSSGSP IYSPE KRVLGQLHGGPSSCSATGTNRSDQYGRVF TSWTGGGAAASRLSDWLDPASTGAQFIDG LDSGGGTPNTPPVANFTSTTSGLTATFTDS STDSDGSIASRSWNFGDGSTSTATNPSKTY AAAGTYTVTLTVTDNGGATNTKTGSVTVS GGPGAQTYTNDTDVAIPDNATVESPITVSG RTGNGSATTP IQVTIYHTYKSDLKVDLVAP DGTVYNLHNRTGGS AHNI IQTFTKDLSEA AQRAPGSCG
---	---	--

[0054]

[0055] 在另一个实施方案中,肽链内切酶可包括与 SEQ ID NO:1、2、3、4 或它们的片段至少 80%,81%,82%,83%,84%,或 85%相同的氨基酸序列。在另一个实施方案中,肽链内切酶可包括与 SEQ ID NO:1、2、3、4 或它们的片段至少 86%,87%,88%,89%,90%,91%,或 92%相同的氨基酸序列。在另一个实施方案中,肽链内切酶可包括与 SEQ ID NO:1、2、3、4 或它们的片段至少 93%,94%,95%,96%,97%,98%或 99%相同的氨基酸序列。这些具有蛋白酶活性的序列中的任何一个序列的片段可以是活性酶的氨基酸序列,例如在加工后,例如在任何信号肽和 / 或肽原已经被裂解后。优选的片段包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-248、SEQ ID NO:2 的氨基酸 26-251、SEQ ID NO:3 的氨基酸 18-250、或 SEQ ID NO:4 的氨基酸 21-653。

[0056] 对于本发明而言,可使用 Needle 程序测定两个氨基酸序列的比对结果,该程序来自 EMBOSS 软件包 (Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000) EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. Trends in Genetics 16, (6) pp276-277; <http://emboss.org>), 版本 2.8.0。Needle 程序执行全序列比对算法,该算法描述于 Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453。使用的取代矩阵是

BLOSUM62,空位开放罚分是 10,空位延伸罚分是 0.5。一般来讲,通过在比较窗口上比较两个最佳比对序列来测定序列同一性百分比,其中比较窗口中的氨基酸序列部分与参比序列(不包括添加或删除)相比可包括添加或删除(例如间隙)以达到最佳的两序列比对效果。百分比通过以下方法进行计算:测定两序列中具有相同氨基酸以产生匹配位置的位置数目,将该匹配位置的数目除以比较窗口两序列中最短序列的位置总数,并且所得结果乘以 100 来获得序列同一性的百分比。

[0057] 技术人员将理解一个氨基酸残基可被另一个具有相似侧链、不影响多肽功能的氨基酸残基取代。例如,具有脂族侧链的一组氨基酸为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂族-羟基侧链的一组氨基酸为丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的一组氨基酸为天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳族侧链的一组氨基酸为苯基丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的一组氨基酸为赖氨酸、精氨酸和组氨酸;具有含硫侧链的一组氨基酸为半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代基包括:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯基丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。因此,肽链内切酶可具有相对于 SEQ ID NO:1、2、3、或 4 的至少一个保守氨基酸取代。在一个实施方案中,肽链内切酶可具有相对于 SEQ ID NO:1、2、3、或 4 的约 50 个保守氨基酸取代。在另一个实施方案中,肽链内切酶可具有相对于 SEQ ID NO:1、2、3、或 4 的约 40 个保守氨基酸取代。在另一个实施方案中,肽链内切酶可具有相对于 SEQ ID NO:1、2、3、或 4 的约 30 个保守氨基酸取代。在另一个实施方案中,肽链内切酶可具有相对于 SEQ ID NO:1、2、3、或 4 的约 20 个保守氨基酸取代。在另一个实施方案中,肽链内切酶可具有相对于 SEQ ID NO:1、2、3、或 4 的约 10 个保守氨基酸取代。在另一个实施方案中,肽链内切酶可具有相对于 SEQ ID NO:1、2、3、或 4 的约 5 个保守氨基酸取代。在另一个实施方案中,肽链内切酶可具有相对于 SEQ ID NO:1、2、3、或 4 的约一个保守氨基酸取代。

[0058] 表 B 中给出了蛋白材料和肽链内切酶的多种组合。

[0059] 表 B:优选的组合。

[0060]

蛋白材料	肽链内切酶
大豆	胰蛋白酶样蛋白酶
大豆	TL1
大豆	TL5
大豆	TL6
大豆	SP3
大麦	胰蛋白酶样蛋白酶

大麦	TL1
大麦	TL5
大麦	TL6
大麦	SP3
低芥酸菜籽	胰蛋白酶样蛋白酶
低芥酸菜籽	TL1
低芥酸菜籽	TL5
低芥酸菜籽	TL6
低芥酸菜籽	SP3
羽扇豆	胰蛋白酶样蛋白酶
羽扇豆	TL1
羽扇豆	TL5
羽扇豆	TL6
羽扇豆	SP3
玉米	胰蛋白酶样蛋白酶
玉米	TL1
玉米	TL5
玉米	TL6
玉米	SP3
燕麦	胰蛋白酶样蛋白酶
燕麦	TL1
燕麦	TL5
燕麦	TL6

燕麦	SP3
豌豆	胰蛋白酶样蛋白酶
豌豆	TL1
豌豆	TL5
豌豆	TL6
豌豆	SP3
马铃薯	胰蛋白酶样蛋白酶
马铃薯	TL1
马铃薯	TL5
马铃薯	TL6
马铃薯	SP3
大米	胰蛋白酶样蛋白酶
大米	TL1
大米	TL5
大米	TL6
大米	SP3
小麦	胰蛋白酶样蛋白酶
小麦	TL1
小麦	TL5
小麦	TL6
小麦	SP3
蛋	胰蛋白酶样蛋白酶
蛋	TL1

蛋	TL5
蛋	TL6
蛋	SP3
乳品	胰蛋白酶样蛋白酶
乳品	TL1
乳品	TL5
乳品	TL6
乳品	SP3
动物（例如明胶）	胰蛋白酶样蛋白酶
动物（例如明胶）	TL1
动物（例如明胶）	TL5
动物（例如明胶）	TL6
动物（例如明胶）	SP3
大豆和大麦	胰蛋白酶样蛋白酶
大豆和大麦	TL1
大豆和大麦	TL5
大豆和大麦	TL6
大豆和大麦	SP3
大豆和低芥酸菜籽	胰蛋白酶样蛋白酶
大豆和低芥酸菜籽	TL1
大豆和低芥酸菜籽	TL5
大豆和低芥酸菜籽	TL6
大豆和低芥酸菜籽	SP3

大豆和羽扇豆	胰蛋白酶样蛋白酶
大豆和羽扇豆	TL1
大豆和羽扇豆	TL5
大豆和羽扇豆	TL6
大豆和羽扇豆	SP3
大豆和玉米	胰蛋白酶样蛋白酶
大豆和玉米	TL1
大豆和玉米	TL5
大豆和玉米	TL6
大豆和玉米	SP3
大豆和燕麦	胰蛋白酶样蛋白酶
大豆和燕麦	TL1
大豆和燕麦	TL5
大豆和燕麦	TL6
大豆和燕麦	SP3
大豆和豌豆	胰蛋白酶样蛋白酶
大豆和豌豆	TL1
大豆和豌豆	TL5
大豆和豌豆	TL6
大豆和豌豆	SP3
大豆和马铃薯	胰蛋白酶样蛋白酶
大豆和马铃薯	TL1
大豆和马铃薯	TL5

大豆和马铃薯	TL6
大豆和马铃薯	SP3
大豆和大米	胰蛋白酶样蛋白酶
大豆和大米	TL1
大豆和大米	TL5
大豆和大米	TL6
大豆和大米	SP3
大豆和小麦	胰蛋白酶样蛋白酶
大豆和小麦	TL1
大豆和小麦	TL5
大豆和小麦	TL6
大豆和小麦	SP3
大豆和蛋	胰蛋白酶样蛋白酶
大豆和蛋	TL1
大豆和蛋	TL5
大豆和蛋	TL6
大豆和蛋	SP3
大豆和乳品	胰蛋白酶样蛋白酶
大豆和乳品	TL1
大豆和乳品	TL5
大豆和乳品	TL6
大豆和乳品	SP3
大豆和动物（例如明胶）	胰蛋白酶样蛋白酶

大豆和动物（例如明胶）	TL1
大豆和动物（例如明胶）	TL5
大豆和动物（例如明胶）	TL6
大豆和动物（例如明胶）	SP3

[0061]

[0062]

[0063]

[0064]

[0065] 取决于蛋白材料的来源、所需的水解度和水解反应的持续时间，加入到蛋白材料中的肽链内切酶的量能够并且将会不同。肽链内切酶的量可以在每千克蛋白材料约 1mg 酶蛋白至约 5000mg 酶蛋白的范围内。在另一个实施方案中，它的量可以在每千克蛋白材料 10mg 酶蛋白至约 2000mg 酶蛋白的范围内。在另一个实施方案中，它的量可以在每千克蛋白材料约 50mg 酶蛋白至约 1000mg 酶蛋白的范围内。

[0066] 技术人员将会认识到水解反应的持续时间能够并且将会不同。一般来讲，水解反应的持续时间可以在几分钟至多个小时的范围内，例如约 30 分钟至约 48 小时。为了终止水解反应，可将组合物加热至足以失活肽链内切酶的温度。例如，把组合物加热至大约 90℃ 将基本上热失活肽链内切酶。

[0067] (II) 蛋白质水解产物组合物

[0068] 蛋白质水解产物组合物与蛋白质原料相比将包含不同长度和分子量的多肽片段的混合物。每个肽段通常将在其羧基末端具有精氨酸或赖氨酸残基（如实施例 3、4、13 和 18 所示）。多肽片段的大小在约 75 道尔顿 (Da) 至约 50,000Da 的范围内，或者更优选地在约 150Da 至约 20,000Da 的范围内。在一些实施方案中，多肽片的平均分子量可小于约 20,000Da。在其它实施方案中，多肽片的平均分子量可小于约 15,000Da。在其它实施方案中，多肽片的平均分子量可小于约 10,000Da。在其它实施方案中，多肽片的平均分子量可小于约 5000Da。

[0069] 取决于蛋白材料的来源、使用的肽链内切酶和水解反应的完成度，本发明蛋白质水解产物组合物的水解度能够并且将会不同。水解度 (DH) 是指裂解的肽键对肽键起始数目的百分比。例如，如果将包含五百个肽键的起始蛋白水解直至五十个肽键裂解，所得水解产物的 DH 就是 10% DH。如实例中详述，可使用三硝基苯磺酸 (TNBS) 比色法或邻苯二甲醛 (OPA) 法测定水解度。水解度越高，蛋白水解程度越大。通常，因为蛋白被进一步水解（即 DH 升高），肽段的分子量降低，相应的肽表达谱发生改变，混合物的粘度降低。DH 可以在完整水解产物（即全部片段）中进行测量或在水解产物的可溶解片段中（即水解产物在约 500-1000xg 离心约 5 至 10 分钟后的上清液片段）进行测量。

[0070] 一般来讲，蛋白质水解产物的水解度将为至少约 0.2% DH。在一个实施方案中，蛋白质水解产物的水解度可以在约 0.2% DH 至约 2% DH 的范围内。在另一个实施方案中，蛋白质水解产物的水解度可以在约 2% DH 至约 8% DH 的范围内。在另一个实施方案中，蛋白

质水解产物的水解度可以在约 8% DH 至约 14% DH 的范围内。在另一个实施方案中,蛋白质水解产物的水解度可以在约 14% DH 至约 20% DH 的范围内。在另一个实施方案中,蛋白质水解产物的水解度可大于约 20% DH。

[0071] 取决于蛋白原料的来源、使用的肽链内切酶和组合物的 pH,蛋白质水解产物组合物的溶解度能够并且将会不同。可溶性固体指数 (SSI) 是包括蛋白质水解产物组合物的固体 (即多肽片段) 溶解度的量度。可溶性固体的量可通过在离心 (例如在约 500-1000xg 离心约 5 至 10 分钟) 前后测量溶液中固体的量进行估计。作为另外一种选择,可溶性固体的量可通过使用本领域熟知的技术 (如二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白测定比色检测分析法) 估计离心前后组合物中蛋白质的量进行测定。

[0072] 一般来讲,无论本发明的蛋白质水解产物组合物的水解度如何,它在 pH 大于约 pH 6.0 时具有至少约 80% 的可溶性固体指数。在一个实施方案中,蛋白质水解产物组合物在 pH 大于约 pH 6.0 时可具有约 80% 至约 85% 的可溶性固体指数。在另一个实施方案中,蛋白质水解产物组合物在 pH 大于约 pH 6.0 时可具有约 85% 至约 90% 的可溶性固体指数。在另一个实施方案中,蛋白质水解产物组合物在 pH 大于约 pH 6.0 时可具有约 90% 至约 95% 的可溶性固体指数。在另一个实施方案中,蛋白质水解产物组合物在 pH 大于约 pH 6.0 时可具有约 95% 至约 99% 的可溶性固体指数。

[0073] 此外,本发明的蛋白质水解产物组合物的溶解度在约 PH 4.0 至约 pH 5.0 时对应于水解度的函数可能不同。例如,在约 PH 4.0 至约 pH 5.0 时,具有大于约 3% DH 的水解度的大豆蛋白质水解产物组合物比那些具有小于约 3% DH 的水解度的大豆蛋白质水解产物组合物趋于更易溶解。

[0074] 一般来讲,具有约 1% DH 至约 6% DH 的水解度的大豆蛋白水解产物组合物在约 PH 7.0 至约 PH 8.0 时是稳定的。稳定性是指经一段时间后无沉淀物形成。蛋白质水解产物组合物可在室温 (即, 23°C) 下贮存或在冷却温度 (即, 4°C) 下贮存。在一个实施方案中,蛋白质水解产物组合物可稳定约一周至约四周。在另一个实施方案中,蛋白质水解产物组合物可稳定约一个月至约六个月。在另一个实施方案中,蛋白质水解产物组合物可稳定超过约六个月。

[0075] 蛋白质水解产物组合物可以是干燥的。例如,可以喷雾干燥蛋白质水解产物组合物。喷雾干燥机入口的温度可以在约 260°C (500° F) 至约 315°C (600° F) 的范围内,出口温度可以在约 82°C (180° F) 至约 38°C (100° F) 的范围内。作为另外一种选择,蛋白质水解产物组合物可以被真空干燥、冷冻干燥、或使用本领域已知的其它程序进行干燥。

[0076] 在其中的蛋白质水解产物来源于大豆蛋白的实施方案中,水解度可在约 0.2% DH 至约 14% DH 的范围内,更优选地在约 1% DH 至约 6% DH 的范围内。如实例所示,除形成的多肽片段的数目之外,水解度通常还影响所得大豆蛋白质水解产物组合物的其它物理特性和感官特性。通常,当水解度从约 1% DH 增加到约 6% DH 时,大豆蛋白质水解产物组合物的透明性或半透明性增加,而谷物和大豆 / 豆类感官特性降低。此外,当水解度小于约 2% DH 时,与水解度大于约 2% DH 时相比,大豆蛋白质水解产物组合物具有基本上较少的苦味感官特性。换句话说,更高的水解度降低了谷物和大豆 / 豆类感官特性,然而更低的水解度降低了苦味感官特性。在实例中详述了感官特性以及测定它们的方法。

[0077] 此外,在其中蛋白质水解产物来源于大豆的实施方案中,大豆蛋白质水解产物组

合物可包含选自 SEQ ID NO :5-177 和 270-274 的多肽。在一个实施方案中,大豆蛋白质水解产物可包括至少一种多肽,该多肽具有对应于或来源于 SEQ ID NO :5-177 和 270-274 的氨基酸序列。在另一个实施方案中,大豆蛋白质水解产物可包括至少约十种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :5-177 和 270-274。在另一个实施方案中,大豆蛋白质水解产物可包括至少约 20 种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :5-177 和 270-274。在另一个实施方案中,大豆蛋白质水解产物可包括至少约 40 种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :5-177 和 270-274。在另一个实施方案中,大豆蛋白质水解产物可包括至少约 80 种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :5-177 和 270-274。在另一个实施方案中,大豆蛋白质水解产物可包括至少约 120 种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :5-177 和 270-274。在另一个实施方案中,大豆蛋白质水解产物可包括至少约 178 种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :5-177 和 270-274。

[0078] 在其中蛋白质水解产物来源于大豆蛋白和乳品组合的其它实施方案中,组合的大豆 / 乳品蛋白质水解产物组合物可包含选自 SEQ ID NO :5-197 和 270-274 的多肽。在一个实施方案中,组合的大豆 / 乳品水解产物可包括至少一种多肽,该多肽具有对应于或来源于 SEQ ID NO :5-197 和 270-274 的氨基酸序列。在另一个实施方案中,组合的大豆 / 乳品水解产物可包括至少约十种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :5-197 和 270-274。在另一个实施方案中,组合的大豆 / 乳品水解产物可包括至少约 50 种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :5-197 和 270-274。在另一个实施方案中,组合的大豆 / 乳品水解产物可包括至少约 100 种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :5-197 和 270-274。在另一个实施方案中,大豆 / 乳品水解产物可包括至少约 150 种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :5-197 和 270-274。在另一个实施方案中,组合的大豆 / 乳品水解产物可包括至少约 198 种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :5-197 和 270-274。

[0079] 在其中蛋白质水解产物来源于低芥酸菜籽的其它实施方案中,蛋白质水解产物组合物可包含选自 SEQ ID NO :198-237 的多肽。在一个实施方案中,低芥酸菜籽水解产物可包括至少一种多肽,该多肽具有对应于或来源于 SEQ ID NO :198-237 的氨基酸序列。在另一个实施方案中,低芥酸菜籽水解产物可包括至少约十种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :198-237。在另一个实施方案中,低芥酸菜籽水解产物可包括至少约 20 种多肽或它们的片段,该多肽或它们的片段选自 SEQ ID NO :198-237。在另一个实施方案中,低芥酸菜籽水解产物可包括至少三十九种多肽,该多肽具有对应于或来源于 SEQ ID NO :198-237 的氨基酸序列。

[0080] 在其中蛋白质水解产物来源于玉米的其它实施方案中,蛋白质水解产物组合物可包含选自 SEQ ID NO :238-261 的多肽。在一个实施方案中,玉米水解产物可包括至少一种多肽,该多肽具有对应于或来源于 SEQ ID NO :238-261 的氨基酸序列。在另一个实施方案中,玉米水解产物可包括至少十种多肽,该多肽具有对应于或来源于 SEQ ID NO :238-261 的氨基酸序列。在另一个实施方案中,玉米水解产物可包括至少 24 种多肽,该多肽具有对应于或来源于 SEQ ID NO :238-261 的氨基酸序列。

[0081] 此外,在其中蛋白质水解产物来源于小麦的实施方案中,蛋白质水解产物组合物

可包含选自 SEQ ID NO :262-269 的多肽。在一个实施方案中,小麦水解产物可包括至少一种多肽,该多肽具有对应于或来源于 SEQ ID NO :262-269 的氨基酸序列。在另一个实施方案中,小麦水解产物可包括至少八种多肽,该多肽具有对应于或来源于 SEQ ID NO :262-269 的氨基酸序列。

[0082] 本发明也可包括任何可从本发明的大豆蛋白质水解产物组合物、大豆 / 乳品蛋白质水解产物组合物、低芥酸菜籽蛋白质水解产物组合物、玉米蛋白质水解产物组合物或小麦蛋白质水解产物组合物纯化得到的多肽或它们的片段。通常,在给定的纯化样本中纯化多肽片段构成了按重量计至少约 80%, 优选地 90%, 甚至更优选地至少约 95% 的总多肽。可通过色谱方法纯化多肽片段, 如尺寸排阻色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法、疏水性交互作用色谱法、反相色谱法等。例如, 多肽片段可选自 SEQ ID NO :5-274。此外, 本发明包括序列基本上类似于那些选自 SEQ ID NO :5-274 的序列的多肽片段。在一个实施方案中, 多肽片段可具有与选自 SEQ ID NO :5-274 的多肽片段至少 80、81、82、83、84、85、86、87、88、或 89% 的序列同一性。在另一个实施方案中, 多肽片段可具有与选自 SEQ ID NO :5-274 的多肽片段至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98、或 99% 的序列同一性。上文给出了用于测定是否多肽片段与本发明的序列具有某一百分比的序列同一性的方法。

[0083] 还设想本发明的蛋白质水解产物组合物还可包含未水解 (即完整) 蛋白质。未水解的蛋白质可存在于基本上完整的制备物中 (例如豆腐、玉米粗粉、牛奶等。) 此外, 未水解的蛋白质可分离自植物来源的蛋白质源 (例如, 蛋白质源如苋属植物、竹芋、大麦、荞麦、低芥酸菜籽、木薯、桃豆 (鹰嘴豆)、豆类、兵豆、羽扇豆、玉米、小米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、裸麦、高粱、向日葵、木薯、黑小麦、小麦等等) 或分离自动物蛋白材料 (合适的动物分离蛋白的实例包括酸酪蛋白、酪蛋白酸盐、乳清、白蛋白、明胶等)。在优选的实施方案中, 蛋白质水解产物组合物还包含未水解的蛋白质, 该未水解的蛋白质选自大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、大豆、小麦、动物、乳品、蛋类、以及它们的组合。取决于涉及的蛋白和组合物的期望用途, 蛋白质水解产物和未水解的蛋白质的相对比例能够并且将会不同。

[0084] (III) 包括蛋白质水解产物的食物产品

[0085] 本发明的另一方面是提供包括可食用材料和任何本文所述的蛋白质水解产物组合物的食物产品。作为另外一种选择, 食物产品可包括可食用材料和任何本文所述的分离多肽片段。

[0086] 取决于所需食物产品, 选择的与可食用材料组合的特定蛋白质水解产物组合物能够并且将会不同。在一些实施方案中, 蛋白质水解产物组合物可来源于大豆蛋白。在其它实施方案中, 蛋白质水解产物组合物可来源于大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、小麦、动物、蛋类、以及它们的组合。在另一个实施方案中, 蛋白质水解产物组合物可来源于大豆和至少一种其它蛋白来源的组合, 其它蛋白来源选自大麦、低芥酸菜籽、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、大米、小麦、动物、乳品和蛋类。在另一个实施方案中, 蛋白质水解产物组合物可包含不同蛋白质水解产物的组合。在另一个实施方案中, 蛋白质水解产物组合物可包含分离的或合成的多肽, 该多肽选自由 SEQ IDNO :5-274 组成的氨基酸序列。

[0087] 取决于所需食物产品, 选择的合适可食用材料也将会不同。可食用材料可以是

植物来源的材料、动物来源的材料、或分离自植物来源材料、动物来源材料等的生物材料（即，蛋白质、碳水化合物、脂质等）。

[0088] 在一个实施方案中，食物产品可以是饮料。优选的饮料包括即饮型（RTD）饮料或干混型饮料（DBB）。该饮料可以是基本上浑浊的饮料或基本上清澈的饮料。合适饮料的非限制性实例包括牛奶饮料、类牛奶饮料（例如豆奶、米奶等）、体重控制饮料、蛋白质混合饮料、代餐饮料、咖啡饮料、营养饮料、能量饮料、婴儿代乳品、果汁饮料、水果饮料、果味饮料、蔬菜饮料、运动饮料等。饮料的 pH 一般将在约 PH 2.8 至约 PH 7.5 的范围内，优选地在约 PH 6.5 至约 PH 7.5 的范围内，更优选地为约 PH 7.0。

[0089] 在另一个实施方案中，食物产品可以是一种压成块的（精）加工食品，如格兰诺拉巴、谷类压成块的（精）加工食品、营养巴、或能量巴。在另一个实施方案中，食物产品可以是基于谷类的食物产品。基于谷类的食物产品的非限制性实例包括早餐谷类食物、意大利面食、面包、焙烤产品（即，粉饼、馅饼、卷状食品、饼干、薄脆饼干）和小吃品（例如炸土豆片、脆饼干等）。基于谷类的食物产品的可食用材料可来源于小麦（例如漂白面粉、全麦面粉、麦芽精、麦麸等）、玉米（例如玉米面、玉米粗粉、玉米淀粉等）、燕麦（例如膨化燕麦、燕麦片、燕麦粉等）、大米（例如膨化大米、米粉、大米淀粉）等等。在另一个实施方案中，食物产品可以是“固体”乳品食物产品。合适的“固体”乳品食物产品的非限制性实例包括硬质干酪产品、软质干酪产品、冰淇淋产品、酸奶产品、冷冻酸奶产品、搅打乳品样产品、果汁牛奶冻等。在另一个实施方案中，食物产品可以是一种营养补充剂。营养补充剂可以是液体或固体。在另一个实施方案中，食物产品可以是肉类产品或肉类类似物产品。肉类食物产品的实例包括但不限于加工肉制品、碎肉制品和全肉制品。肉类材料可以是动物肉或海产品肉。肉类类似物可以是组织化植物蛋白或组织化乳品蛋白，它们的质地模仿动物或海产品的肉。在肉类食物产品中肉类类似物可以是部分或全部肉类材料。

[0090] 取决于用于制造水解产物和所需食物产品的原料，蛋白质水解产物组合物的水解度也将不同。例如，对包括包含大豆的蛋白质水解产物组合物的饮料来说，可期望利用基本上更易溶解的和有时显著地更趋于半透明的大豆蛋白质水解产物组合物，如具有更接近 6% DH 而不是 1% DH 水解度的组合物。同样的，在期望最小化其苦味感官特性的食物产品中，可选择具有更接近 1% DH 而不是 6% DH 水解度的大豆蛋白质水解产物组合物。此外，在期望最小化其谷物和大豆 / 豆类感官特性感官特性的食物产品中，可选择具有更接近 6% DH 而不是 1% DH 水解度的大豆蛋白质水解产物组合物。

[0091] 如上文所详述，在一个优选的实施方案中食物产品可以是饮料。并且上文详述了蛋白质水解产物组合物的合适实例。合适的可食用材料的非限制性实例包括脱脂乳、降脂乳、2% 乳、全脂乳、奶油、炼乳、酸奶、酪乳、奶粉、脱脂奶粉、乳蛋白、酸酪蛋白、酪蛋白酸盐（例如酪蛋白酸钠、酪蛋白酸钙等）、乳清浓缩蛋白、乳清分离蛋白、大豆分离蛋白、大豆蛋白质水解产物、乳清水解产物、巧克力、可可粉、咖啡、茶、果汁、蔬菜汁等等。饮料食物产品还可包括甜味剂（如葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖糊精、三氯蔗糖、玉米糖浆、蜂蜜、槭树糖浆等）、调味剂（例如巧克力、可可、巧克力风味剂、香草精、香草风味剂、水果香料等）、乳化剂或增稠剂（例如卵磷脂、角叉菜胶、纤维素胶、纤维素凝胶、淀粉、齿龈、树脂、阿拉伯胶、黄原胶等）；稳定剂、脂质材料（例如低芥酸菜籽油、向日葵油、高油酸向日葵油、脂肪粉末等）、防腐剂（例如山梨酸钾、山梨酸等）、抗氧化剂（例如抗坏血酸、抗坏血酸钠等）、着色

剂、维生素、矿物质、以及它们的组合。

[0092] 定义

[0093] 为了更好的理解本发明,下文定义了几个术语。

[0094] 术语“水解度”是指裂解总肽键的百分比,它通过测定每 100 千克 (kg) 蛋白质中存在的 NH₂ 摩尔数进行测量。

[0095] 术语“肽链内切酶”是指在缩氨酸或多肽链中水解内部肽键的酶。肽链内切酶类包括酶亚类 EC 3.4.21 至 25(国际生物化学与分子生物学联盟酶分类体系)。

[0096] “食品级酶”是公认安全 (generally recognized as safe, GRAS) 认可的并且当被生物体如人消耗时是安全的酶。通常,酶和可从其中得到酶的产品可根据适用的法律法规进行制备。

[0097] “水解产物”是当化合物通过水效应裂解时获得的反应产物。在热降解、化学降解或酶降解后产生蛋白质水解产物。反应期间大分子裂解成较小的蛋白、可溶性蛋白、肽段和游离氨基酸。

[0098] 如那些用于描述术语象“谷物”、“大豆 / 豆类”、或“苦味”的术语“感官特性”,根据如实施例 6 中详述的 SQS 评分体系进行测定。

[0099] 术语“可溶性固体指数”是指可溶性蛋白或可溶性固体的百分比。

[0100] 如本文所用,术语“分离大豆蛋白”或“大豆分离蛋白”是指具有基于不含水分至少约 90% 的大豆蛋白的蛋白含量的大豆材料。大豆分离蛋白如下形成于大豆:将大豆的皮和胚芽从子叶上去除、将子叶压成片或碾碎并将片状或碾碎的子叶去油、将子叶的大豆蛋白和碳水化合物与子叶纤维分离开、并随后将大豆蛋白与碳水化合物分离开。

[0101] 如本文所用,术语“大豆浓缩蛋白”是指具有基于不含水分约 65% 至小于约 90% 的大豆蛋白的蛋白含量的大豆材料。大豆浓缩蛋白也包含大豆子叶纤维,通常基于不含水分按重量计约 3.5% 至最多约 20% 的大豆子叶纤维。大豆浓缩蛋白如下形成于大豆:去除大豆的皮和胚芽、将子叶压成片或碾碎并将片状或碾碎的子叶去油、并将大豆蛋白和大豆子叶纤维与子叶的可溶碳水化合物分离开。

[0102] 如本文所用,术语“大豆粉”是指脱脂的、部分脱脂的、或全脂的大豆材料的粉碎形式,其尺寸使得颗粒可通过 100 目(美国标准)筛网。利用常规的大豆研磨方法将大豆饼、碎片、薄片、粗粉、或这些材料的混合物粉碎成大豆粉。大豆粉具有基于不含水分约 49% 至约 65% 的大豆蛋白含量。优选地所述大豆粉研磨的非常细,最优选地使得小于约 1% 的大豆粉被保留在 300 目(美国标准)筛网上。

[0103] 如本文所用,术语“大豆子叶纤维”是指包含至少约 70% 的饮食纤维的大豆子叶多糖部分。大豆子叶纤维通常包含某种微量大豆蛋白,但是也可含 100% 纤维。如本文所用,大豆子叶纤维不涉及或包括大豆皮纤维。一般来讲,大豆子叶纤维如下形成于大豆:去除大豆的皮和胚芽、将子叶压成片或碾碎并将片状或碾碎的子叶去油、并将大豆子叶纤维与子叶的大豆材料及碳水化合物分离开。

[0104] “胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶”是一种优先在精氨酸残基或赖氨酸残基的羧基末端一侧裂解肽键的酶。

[0105] 当介绍本发明或其优选实施方案的要素时,冠词“一个”和“所述”旨在表示有一个或多个要素。术语“包含”、“包括”和“具有”旨在表示包容性并且表示除列出要素外还

可以有其它要素。

[0106] 在不脱离本发明范围的条件下,可对以上化合物、产品和方法进行各种更改,这意味着可将上文描述和下文实施例中包含的所有内容理解为例证性的而非限定性的。

[0107] 实施例

[0108] 以下实施例示出了本发明的实施方案。

[0109] 实施例 1:用胰蛋白酶样肽链内切酶 TL1 水解大豆分离蛋白

[0110] 将大豆分离蛋白水解成更小的肽段以试图提高其溶解度并改进其感官特性。真菌胰蛋白酶样肽链内切酶 TL1 来自尖孢镰孢,其序列表示为本专利申请的 SEQ ID NO:1,选择该酶是因为它裂解精氨酸或赖氨酸残基的 C 末端一侧的肽链,而其它肽酶已被证实裂解大豆蛋白的任意肽键。

[0111] 大豆分离蛋白 (ISP) 的 8% 浆液通过以下方法制备:将 320g SUPRO[®] 500E, Solae, St. Louis, MO) 分散在 3680g 水中,适度混合以减少泡沫。如需要的话加入两滴消泡剂。将该溶液加热到 80℃ 5 分钟以失活任何可能存在的丝氨酸蛋白酶抑制剂。将混合物冷却到 50℃ 并用食品级 KOH (50% w/w 溶液) 将 pH 调节到 8.0。在存在 0、75mg、350mg、650mg、或 950mg TL1/kg 大豆蛋白的情况下,将 8% 大豆蛋白浆液的等分试样 (800mL) 在 50℃ 培养 60 分钟。将样本加热到 85℃ 并保持 5 分钟以失活所述酶。用冰冷却样本并将其贮存于 4℃。

[0112] 水解度 (% DH) 是指被水解的特定肽键的百分比 (即,裂解肽键的数目占起始蛋白中存在的肽键总数的百分比)。使用三硝基苯磺酸 (TNBS) 方法估计 % DH。该方法是一种用于测定食物蛋白质水解产物水解度的精确的、可重复的和一般适用的方法。就该方法而言,将 0.1g 大豆蛋白质水解产物溶解在 100mL 的 0.025N 氢氧化钠中。将水解产物溶液的等分试样 (2.0mL) 与 8mL 的 0.05M 硼酸钠缓冲液 (PH 9.5) 混合。用 0.20mL 10% 三硝基苯磺酸处理两 mL 经缓冲的水解产物溶液,然后室温暗处培养 15 分钟。加入 4mL 0.1M 亚硫酸钠-0.1M 磷酸钠溶液 (1 : 99 比率) 终止反应,在 420nm 处读取吸光度。使用 0.1mM 的甘氨酸溶液作为标准品。使用以下计算公式以确定甘氨酸标准溶液的回收百分比: $[(\text{甘氨酸 } 420\text{nm 吸光度} - \text{空白 } 420\text{nm 吸光度}) \times (100/0.710)]$ 。94% 或更高的值被认为是可接受的。

[0113] 表 1 给出了每个样本的 TNBS 平均值和 % DH。它显示水解在 6% DH 左右时开始保持稳定水平,这能反映出易于裂解的精氨酸和赖氨酸位点的数目。该实验表明用 350mg/kg 的 TL1 消化一小时能制备足够的水解产物。

[0114] 表 1:大豆蛋白质水解产物的水解度

[0115]

样本 #	描述	TNBS 值 (每 100kg 蛋白的 NH ₂ 摩尔数)	% DH
0	0TL1mg/kg	24	0
23-1	75TL1mg/kg	51	3.0
23-2	350TL1mg/kg	70	5.2

23-3	650TL1mg/kg	75	5.8
24-4	950TL1mg/kg	78	6.1

[0116] 实施例 2 :TL1 水解产物的 SDS-PAGE 分析。

[0117] 基本上如实施例 1 所述制备具有 0.3% DH、2.2% DH、3.1% DH、4.0% DH 和 5.0% DH 的 TL1 水解产物。使用 SDS-PAGE 标准方法溶解每个水解产物的等分试样和未水解的大豆分离蛋白。该分析允许比较大豆水解产物中的多肽和那些起始大豆蛋白的分子大小。图 1 示出了考马斯亮蓝 (Coomassie) 染色凝胶的图像。未水解大豆分离蛋白包括大小约 5kDa 至约 100kDa 的多肽。虽然 0.3% DH 水解产物中的多肽大小范围与原料的大小范围相似,但该水解产物包含附加的小多肽片段。% DH 更高的水解产物基本上没有大于约 20 至 30kDa 的多肽,而是都有附加的小 (< 5kDa) 多肽。2.2% DH、3.1% DH 和 4.0% DH 的水解产物的多肽模式相当类似。然而 5.0% DH 的水解产物具有比其它水解产物更窄的多肽大小范围 (0.1-20kDa)。具体地讲,在 5.0% DH 水解产物中不存在 7S 和 11S 亚基条带 (参见图 1,泳道 8)。

[0118] 实施例 3 :TL1 水解产物中的肽段 LC-MS 分析。

[0119] 通过液相色谱质谱 (LC-MS) 鉴定实施例 1 制备的 TL1 水解产物中的肽段。用于 LC-MS 分析的样本通过以下方法制备:在玻璃小瓶中混合包含 2mg 各个 TL1 水解产物的等分试样和 0.1% 的甲酸 (1mL),涡旋 1 至 2 分钟。将混合物在 13,000rpm 离心 5 分钟。将上清液的等分试样 (25 μ L) 注入 C18 HPLC 分析柱中 (15cm x 2.1mm id, 5 μ m; DiscoveryBio Wide Pore, Supelco[®], Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 该分析柱在 HP[®]-1100 (Hewlett Packard; Palo Alto, CA) HPLC 仪器上。表 2 中示出了色谱流出曲线;溶剂 A 是 0.1% 甲酸;溶剂 B 是在乙腈中的 0.1% 甲酸,流量为 0.19mL/min,柱温为 25°C。

[0120] 表 2 :HPLC 溶剂色谱流出曲线

[0121]

时间 (分钟)	溶剂 A (%)	溶剂 B (%)
0	95	5
35	55	45
37	55	45
39	10	90
42	10	90
44	95	5
45	95	5

[0122] 用分路器体系将 LC 洗脱液的等分试样 (10 μ L) 递送到 ESI-MS 源以进行 MS 分析。

使用 Thermo Finnigan™ LCQ™ (Thermo Scientific, Waltham, MA) Deca 离子阱质谱仪分析所述肽,该仪器配备数据依赖型 MS/MS 和具有动态排除扫描功能的数据依赖型 MS/MS。ESI-MS 在阳离子模式下运行,毛细管温度为 225℃,电喷雾针设置为电压 5.0kV,扫描范围为 m/z 400-2000。MS/MS 原始数据通过 Sequest 搜索引擎 (BIOWORKS™ software, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 用无酶搜索参数解卷积。通过搜索标准数据库对肽进行鉴定,如在 National Institutes of Health 的 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 或来自 Swiss Institute of Bioinformatics 的 Swiss-Prot。

[0123] 表 3 中给出了所述肽。几乎每个肽段在羧基末端都具有精氨酸或赖氨酸(三个片段在羧基末端具有谷氨酰胺)。末端是精氨酸残基的片段大约是末端是赖氨酸残基的片段的两倍。

[0124] 肽段鉴定揭示了 β -大豆伴球蛋白 α -亚基、 β -大豆伴球蛋白 β -亚基、大豆球蛋白亚基 G1、大豆球蛋白亚基 G3 和大豆球蛋白 Gy4 的水解产物存在于每个 TL1 水解产物中。在每个水解产物中检测到了许多相同的肽段。5.8%和 6.1% DH 水解产物还包含来自 P 24 油质蛋白异构体 A 的片段。6.1% DH 水解产物揭示了来自其它蛋白的片段的存在,即胰蛋白酶抑制剂 Kti3。

[0125] 表 3 :具有不同水解度 (DH) 的水解产物中的肽段

[0126]

	3.0% DH		5.2% DH		5.8% DH		6.1% DH	
蛋白质	SEQ ID NO	序列	SEQ ID NO:	序列	SEQ ID NO:	序列	SEQ ID NO:	序列
β-大豆伴球 蛋白的 α-亚 基	5	YSNKL GK	23	SGDALR	24	FETLFK	38	SSSRK
	6	RFETLFK	24	FETLFK	8	SRDPIYSN K	23	SGDALR
	7	SPQLQNLR	7	SPQLQNLR	9	SSEDKPFNL R	24	FETLFK
	8	SRDPIYSNK	8	SRDPIYSN K	7	SPQLQNLR	7	SPQLQNL R
	9	SSEDKPFNLR	25	KTISSEDK PFNLR	36	EQQEEQPL EVR	39	FFEITPEK
					25	KTISSEDKP FNLR	8	SRDPIYS NK
					37	LQESVIVEI SKEQIR	37	LQESVIV EISKEQIR
β-大豆伴球 蛋白的 β-亚 基							40	VLFSREE GQQQGE QR
	10	SSEDEPFNLR	26	SPQLENL R	26	SPQLENLR	42	LLQR
	11	NFLAGEKDNV VR	27	LAGEKDN VVR	27	LAGEKDN VVR	43	FNKR
			11	NFLAGEK DNVVR	11	NFLAGEKD NVVR	26	SPQLENL R
			28	KTISSEDE PFNLR	41	LKVREDEN NPFYLR	11	NFLAGEK DNVVR
			29	VREDENN PFYLR				

[0127]

大豆球蛋白 亚基 G1 (前大豆球 蛋 白 A1aB1b)	12	NNNPFK	30	PPQESQK R	44	PDNR	45	TLNR
	13	LSAEFGSLR	13	LSAEFGS LR	45	TLNR	50	SQQR
	14	SQSDNFEYVSFK	31	LNALKPD NR	46	PQQR	47	YNFR
	15	PEEVIQHTFNLK	32	VFDGELQ EGR	47	YNFR	12	NNNPFK
	16	FYLAGNQE FLK	14	SQSDNFE YVSFK	12	NNNPFK	13	LSAEFGS LR
	17	RFYLAGNQE EFLK	15	PEEVIQHT FNLK	13	LSAEFGSL R	48	PQNFFV AAR
			16	FYLAGNQ EQEFLK	48	PQNFFVAA R	31	LNALKPD NR
					32	VFDGELQE GR	32	VFDGELQ EGR
					49	LAGNQE EFLK	14	SQSDNFE YVSFK
					14	SQSDNFEY VSFK	15	PEEVIQH TFNLK
					15	PEEVIQHTF NLK	16	FYLAGN QEFLK
					16	FYLAGNQ QEFLK		
大豆球蛋白 亚基 G3 (大 豆 球 蛋 白 A1bB2)	18	PPKESQR	18	PPKESQR	19	LSAQFGSL R	18	PPKESQR
	19	LSAQFGSLR	19	LSAQFGS LR	120	LAGNQE EFLQ	19	LSAQFGS LR
	20	FYLAGNQE FLQ	33	PEEVIQQT FNL	18	PPKESQR		
			20	FYLAGNQ EQEFLQ				

[0128]

大豆球蛋白 Gy4 A5A4B3	21	SKKTQPR	22	PSEVLAH SYNLR	51	ADFYNPK	51	ADFYNPK
	22	PSEVLAHSYNL R	34	ISTLNSLT LPALR	52	MIIAQ GK	52	MIIAQ GK
			35	KQIVTVEG GLSVISPK	53	PETMQQQ QQQK	53	PETMQQ QQQK
					22	PSEVLAHS YNLR	22	PSEVLAH SYNLR
					35	KQIVTVEG GLSVISPK	34	ISTLNSLT LPALR
							35	KQIVTVE GGLSVIS PK
P 24 油质蛋 白异构体 A					54	HSER	57	TKEVGQ DIQSK
					55	YEAGVVP GAR	56	HHLAEAA EYVGQK
					56	HHLAEAAE YVGQK		
胰蛋白酶抑 制剂 Kti3							58	LVVSK
							59	DAMDG WFR

[0129] **实施例 4** :通过 MALDI-MS 分析具有高水解度的 TL1 水解产物中的肽段

[0130] 还通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF/TOF-MS) 分析在实施例 1 中制备的 6.1% DH 的大豆水解产物中的肽段。如实施例 3 所述制备样本并通过 HPLC 分析样本,不同的是将最后的洗脱步骤延长至 50 分钟并在 Bio-Rad[®] (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 组分收集器上每隔 1 分钟收集组分。组分 #4-48 在 Genevac[®] (Genevac, Ltd, UK) 蒸发器上,在 < 30℃ 条件下被完全蒸发。

[0131] 就此而言,将干燥样本溶解在 200 μ L 1% 三氟乙酸 (TFA) 的 50% 乙腈溶液中。将每个样本的等分试样 (1.5 μ L) 与 1.5 μ L MALDI 基质溶液 (6.2mg α -氰基-4-羟基肉桂酸/mL 36% 甲醇 (v/v), 56% 乙腈 (v/v), 以及 8% 的水) 混合。将样本涡旋、离心,并将 1 μ L 样本加样在 MALDI 不锈钢靶板上。选择十三个具有高质量 MS 谱的样本用于进一步纯化和 MS/MS 分析。在 PCR 管中干燥每个组分并将其重悬浮在 10 μ L 0.1% 甲酸的 1% 乙腈溶液中,涡旋 30 秒,2000rpm 离心 10 秒。重复涡旋和离心步骤 5 次。使用 NuTip (10 μ L 多孔石墨

碳 SPE 枪头) 纯化肽混合物。使用预湿的 (0.1% 甲酸的 60% 乙腈溶液, 随后用 0.1% 甲酸平衡) 枪头从包含样本的 PCR 管中提取肽。将完整的样本溶液吸入枪头, 然后排回管中, 反复 50 次。然后用 0.1% 甲酸 (10 μ L) 洗涤 (吸入和排出) 加入样本的枪头五次。最后, 用 10 μ L 0.1% 甲酸的 60% 乙腈溶液从枪头洗脱所述肽。使用相同的溶剂混合物 (10 μ L) 重复洗脱过程十次。在高速真空下干燥所有样本洗脱液, 然后将其重悬浮在 1.5 μ L 1% TFA 的 50% 乙腈溶液中和 1.5 μ L MALDI 基质溶液中。涡旋混合物 30 秒, 2000rpm 离心 5 秒, 然后加样 1 μ L 在 MALDI 靶板上。在 MALDI-TOF/TOF 仪器 (ABI-4700) 上进行 MS 分析。该仪器配备 ND:YAG (335nm), 并且在 MS 和 MS/MS 模式下以 200Hz 的重复频率运行。用 20KeV 加速度能量, 在第一 TOF 处记录数据, 并将单透镜间电压设置为 6KeV。通过 MASCOT 搜索引擎 (MATRIX SCIENCE), 用无酶搜索参数解卷积 MS/MS 数据。通过搜索标准数据库如 NCBI 或 Swiss-Prot 来鉴定所述肽。

[0132] 表 4 给出了 MALDI-MS 鉴定的肽。在此分析中鉴定的一些相同肽段用 LC-MS (ESI) 进行鉴定。例如, β -大豆伴球蛋白的 α -亚基、 β -大豆伴球蛋白的 β -亚基、大豆球蛋白亚基 G1 和大豆球蛋白 Gy4 的片段在两种分析中都存在。MALDI-MS 分析检测到了其它多肽的片段, 如 β -大豆伴球蛋白的 α 主亚基、大豆球蛋白亚基 G2 和 62K 蔗糖-结合蛋白前体及种子成熟蛋白, LEA4。

[0133] 表 4 :6.1% DH 水解产物中的肽段 -MALDI-MS

[0134]

蛋白质	US2004214272 中的 SEQ ID NO:	序列
β -大豆伴球蛋白的 α -亚基	7	SPQLQNLR
	25	KTISSSEDKPFNLR
	40	VLFSREEGQQQGEQR
β -大豆伴球蛋白的 β -亚基	60	TISSEDEPFNLR
	28	KTISSSEDEPFNLR
	29	VREDENNPFFYLR
	61	FFEITPEKNPQLR
	62	SSNSFQTLFENQNGR
	63	QVQELAFPGSAQDVER
β -大豆伴球蛋白的 α -主亚基	64	QQQEEQPLEVR
	65	TISSEDKPFNLR
大豆球蛋白亚基 G1 (前大豆球蛋白 A1aB1b)	66	FLVPPQESQK
	67	FLVPPQESQKR
	68	VLIVPQNFVVAAR
	16	FYLAGNQEQEFLK
	69	RPSYTNGPQEIIYIQQGK
	70	VFYLAGNPDIEYPETMQQQQQQK
大豆球蛋白亚基 G2 A2B1a	71	EAFGVNMQIVR
	14	SQSDNFEYVSFK
	72	NNNPFSFLVPPQESQR
	73	NLQGENEGEDGEDKGAIIVTVK
	74	VFDGELQEGGV LIVPQNFAVAAK
	75	GKQQEEENECSNILSGFAPEFLK
	76	PQNFAVAAK
大豆球蛋白 Gy4 A5A4B3	77	NGLHLPSYSPYPR
	78	AIPSEVLAHSYNLR
	70	VFYLAGNPDIEYPETMQQQQQQK
	79	WQEQQDEDEDEDEDEDEDEQIPSHPPR
	80	KQGQHQQEEEEEGGSVLSGFSK

[0135]

62K 蔗糖结合蛋	81	LFDQQNEGSIFAISR
白前体	82	LTEVGPDDDEKSWLQR
种子成熟	83	TNRGPGGTATAHNTRA
蛋白; LEA4	84	HQTSAMPGHGTGQPTGH

[0136] 实施例 5 :用 TL1 或ALCALASE[®]水解大豆分离蛋白。

[0137] 用 TL1 或ALCALASE[®] 2. 4L 水解大豆分离蛋白以便能够比较不同水解产物的感官特性和功能,ALCALASE[®] 2. 4L 是得自 Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) 的微生物枯草杆菌蛋白酶。8%大豆分离蛋白的浆液通过将 72g SUPRO[®] 500E 在 828g 自来水中适度混合 5 分钟进行制备。加入两滴消泡剂。用 2N KOH 将浆液 pH 调节至 8. 0。将浆液的等分试样 (800g) 混合加热至 50℃。加入不同量的 TL1 肽酶或ALCALASE[®] (ALC) 蛋白酶以达到所需的水解度 0、1% DH、2% DH、4% DH 和 6% DH。使用自动滴定器使反应 pH 常数保持在 PH 8. 0。在 50℃培养一段时间以获得所需的水解度,然后将样本加热至 85℃并保持 5 分钟以失活酶,随后将溶液调节至 PH 7. 0。用冰冷却样本并将其贮存于 4℃。使用 TNBS 方法 (如实施例 1 所述) 测定水解度 (% DH)。表 5 给出了加入酶的量、反应时间、反应期间滴定 pH 时加入的 KOH 体积、平均 TNBS 值和 % DH。

[0138] 表 5 :TL1 和ALCALASE[®]水解产物

[0139]

样本#	酶	时间 (分钟)	KOH (mL)	TNBS 值 (每 100kg 蛋白 的 NH ₂ 摩尔数)	% DH
0	0	30	0	23.7	0
46-1	0.0182% ALCALASE [®]	30	3.2	34.8	1.3
46-2	0.0394% ALCALASE [®]	30	5.6	45.8	2.5
46-5	0.1018% ALCALASE [®]	30	8.7	52.1	3.2
46-9	0.3462% ALCALASE [®]	30	19.2	75.9	5.9
46-4	30mg/kg TL1	28	3.1	32.1	1.0
46-3	70mg/kg TL1	22	5.9	40.4	1.9
46-8	250mg/kg TL1	12	8.5	50.3	3.0
46-7	400mg/kg TL1	40	19.2	69.1	5.1

[0140] 实施例 6 :TL1 和 ALCALASE[®] 水解产物的感官分析

[0141] 使用一种专有的感官检测方法, Solae 定性检测 (SQS) 法, 来评估实施例 5 中制备的 TL1 和 ALCALASE[®] 水解产物的风味特性。该方法基于试验样本和对照样本之间的直接比较, 并且提供定性的和定向定量的差异。向一组七名经培训的评估员提供每个样本 (稀释至 5% 浆液) 的等分试样和对照样本, 对照样本是未水解的大豆分离蛋白的 5% 浆液。用食品级磷酸将每个溶液的 pH 调节至 7.0。

[0142] 评估规程包括涡旋样本杯三次, 保持杯底部在桌上。样本静置 2 秒钟后, 每个评估员呷入约 10mL (2 茶匙) 样本, 在他的 / 她的口中漱口 10 秒钟后吐出。评估员然后根据表 6 给出的量表评估试验样本和对照样本间的差异。

[0143] 表 6 :SQS 评分体系

[0144]

SQS 评分	量表	定义
5	相同	试验样本与对照样本的感官特性事实上相同, 如外观、香味、风味和质地。

4	轻微差异	试验样本与对照样本有一个或多个‘轻微’差异。这些差异如果不与对照物进行并列比较,可能不会被注意到。
3	中度差异	试验样本与对照样本有一个或多个‘中度’差异。在两个样本的并列比较中,人们品尝每个样本后会注意到这些差异。
2	极端差异	试验样本与对照样本有一个或多个‘极端’差异。这些差异甚至在不进行并列比较的情况下也会被注意到。
1	拒收	试验样本有明显的缺陷,使其不同于对照样本。

[0145] 表 7 给出了每个样本的平均 SQS 评分。TL1 水解产物的评分一般为与对照样本(它是未处理的大豆分离蛋白)有中度差异。ALCALASE[®] (ALC) 水解产物的评分为与对照样本有轻微至极端差异。

[0146] 表 7 :对 TL1 和 ALCALASE[®]水解产物的 SQS 评分

[0147]

% DH TL1	SQS 评分	%DH ALCALASE [®]	SQS 评分
0	4.7	0	4.7
1.0	3.6	1.3	3.9
1.9	3.1	2.5	3.6
3.0	3.1	3.2	3.9
5.1	3.3	5.9	2.3

[0148] 如果试验样本被评价为与对照样本不同(即, SQS 评分为 2、3、或 4), 然后还可对试验样本进行进一步评估以提供关于试验样本如何不同于对照样本的诊断信息。因此, 如果试验样本具有比对照样本轻微更多、中度更多、或极端更多的某项特性(参见表 8), 那么赋予它们的评分分别是 +1、+2、+3。同样的, 如果试验样本具有比对照样本轻微更少、中度更少、或极端更少的某项特性, 那么赋予它们的评分分别是 -1、-2、-3。该分析提供了对试验样本和对照样本之间的定向定量差异的评估。

[0149] 表 8 :SQS 专门词汇

[0150]

属性	定义	参考
----	----	----

绿色	与绿色植物相关的一般种类的香味,绿色植物包括茎、草、叶片和绿色香草。	新割过的草、青豆、番茄
谷物	与全部谷物相关的香味,可包括所有类型的谷物和加热的不同阶段。可包括小麦、全麦、燕麦、大米、全麦面粉等。	面团中的中筋面粉、麦乳、全麦意大利面食
大豆 / 豆类	与豆类 / 大豆相关的香味 ;可包括所有类型和不同的加热阶段。	无糖 SILK™ 豆奶、罐装大豆、豆腐
纸板 / 木质	与干木材相关的香味以及与轻微氧化的脂肪或油相关的,让人联想起纸板的香味。	牙签、浸泡纸板 1 小时后的水
甜味	由蔗糖或其它糖如果糖、葡萄糖等、及其它甜味物质如糖精、天冬甜素和丁磺氨 -K 刺激的舌头上的味道。	蔗糖溶液 :2%, 5%, 10%
酸味	由酸,例如柠檬酸、苹果酸、磷酸等刺激的舌头上的味道。	柠檬酸溶液 : 0.05%, 0.08%, 0.15%
盐	与钠盐有关的舌头上的味道。	氯化钠溶液 : 0.2%, 0.35%, 0.5%
苦味	与咖啡因和其它苦味物质,例如奎宁和酒花苦味质有关的舌头上的味道。	咖啡因溶液 : 0.05%, 0.08%, 0.15%
收敛性	由诸如单宁酸或明矾的物质造成的舌头表面的皱缩或缩拢。	明矾溶液 : 0.005%, 0.007%, 0.01%

[0151] 图 2A 和 2B 中给出了具有相似 % DH 水平的水解产物的九种风味特性的定向差异。在所有的 % DH 水平上, TL1 水解产物与 ALC 水解产物相比在谷物和大豆 / 豆类特性方面有较大幅度的减少, 在收敛性和苦味特性方面有较小幅度的增加。% DH 最高的 ALC 水解产物在苦味方面相对于对照物具有尤其大的增加。

[0152] 实施例 7: TL1 和 ALCALASE® 水解产物的溶解度。

[0153] 实施例 5 中制备的每个 TL1 和 **ALCALASE**[®] 水解产物的溶解度通过将水解产物稀释成 2.5% 固体并在 PH 7.0、4℃ 条件下贮藏一周进行估计。对样本进行视觉评估；图 3A 中给出了一个摄影图象。所有 TL1 水解产物具有少量沉淀，但是 5.1% DH 的 TL1 水解产物也具有相对于那些更低 % DH 的水解产物更高的透明性。相反的，具有最高 % DH 的 ALC 水解产物具有显著量的沉淀。图 3B 给出了 6.1% DH TL1 水解产物和 13.8% DH ALC 水解产物稀释成 2.5% 固体后在 PH 8.2、4℃ 条件下贮藏三周的管的图像。TL1 水解产物无沉淀产生，这指示它在 PH 8.2、4℃ 条件下可长期保持稳定，然而 ALC 水解产物有沉淀产生。

[0154] 在实施例 5 中制备的每个 TL1 和 ALC 水解产物中测试 pH 对溶解度的效应。将每个等分试样调节至 pH 2、pH 3、pH 4、pH 5、pH 6、pH 7、pH 8、或 pH 9，并且样本在 500x g 离心 10 分钟。将离心前溶液中固体物质的量与离心后溶液中固体物质的量进行比较以提供可溶性固体指数 (SSI)。TL1 和 ALC 水解产物的 % 可溶性固体在图 4A 和 4B 中分别对应于 pH 的函数给出。所有溶液在约 pH 4 至 pH 5 的 pH 水平上具有降低的溶解度（即，大豆蛋白的等电点），并且在更低的 pH 值时具有稍微提高的溶解度。然而，pH 值更高时，所有 TL1 水解产物在 pH 水平高于 pH 6.0 时具有优异的溶解度（图 4A），但是一些 ALC 水解产物在 pH 水平更高时具有降低的溶解度（图 4B）。图 4C 给出了 TL1 和 ALC 水解产物的溶解度在低和高 % DH 时对应于 pH 函数的直接比较。

[0155] **实施例 8**：TL1 水解产物的透射比。

[0156] 对实施例 5 中制备的一些 TL1 水解产物的透射比进行测量。为了此次测量，将 1% DH 和 5.1% DH 的 TL1 水解产物制备成不同的固体百分比（即，0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 和 2.5%）。将每个蛋白浆液的等分试样放置在 **TURBISCAN**[®] Lab Expert unit (Formulaction, l' Union, France) 中，并且记录每秒的透射比，总计 60 秒。表 9 给出了每个样本的平均透射百分比。5.1% DH 的 TL1 水解产物在 0.5% 固体情况下具有 37.4% 的透射比，与之相比，1.0% DH 的水解产物在 0.5% 固体情况下具有 1.3% 的透射比。这些数据证实了视觉观察的结果（参见图 3A）。

[0157] 表 9：TL1 水解产物的透射比

[0158]

	% 透射比				
% DH	2.5% 固体	2.0% 固体	1.5% 固体	1.0% 固体	0.5% 固体
1.0	0.0	0.0	0.1	0.2	1.3
5.1	2.1	4.2	8.0	16.6	37.4

[0159] **实施例 9**：用 TL1 或其它肽链内切酶制备的大豆水解产物的苦味分析。

[0160] 基本上如实施例 1 和 5 所述，大豆分离蛋白用来自水解无色杆菌 (SP3；SEQ ID NO：4) 的 TL1、**ALCALASE**[®] (ALC)、或赖氨酰肽链内切酶进行水解。选择酶浓度和反应条件以使 % DH 值为约 5 至 6% DH，水解度通过实施例 1 中描述的 TNBS 方法进行测定。将水解产物提供给一组五名评估员，使用实施例 6 中描述的 SQS 方法进行评估，主要评估苦味。

[0161] 表 10 中给出了平均 SQS 评分和诊断的苦味评分。TL1 和 SP3 水解产物的评分为与对照样本（未水解的大豆分离蛋白）有轻微差异。同样的，TL1 和 SP3 水解产物的评分为

苦味略少于对照样本。相反的,ALC 水解产物的评分为与对照样本有极端差异,并且苦味比对照样本大得多。

[0162] 表 10 :水解产物的 SQS 分析。

[0163]

样本	SQS 评分 (平均值)	苦味评分 (平均值)
无酶	4.5	-0.2
TL1	3.8	-0.7
SP3	4.3	-0.2
ALC	2.2	+2.8

[0164] 实施例 10 :中试 TL1 水解产物的物理特性。

[0165] 将大豆分离蛋白 TL1 水解产物的生产从小试规模提高到更大的中试规模,并且分析水解产物的感官特性和功能特性。就此而言,原料是大豆凝结蛋白。为了制备大豆凝结蛋白材料,用约 pH6.5 至约 pH10 的水溶液连续提取大豆粕、大豆粉、或大豆粗磨物,以将大豆粕 / 大豆粉 / 大豆粗磨物中的蛋白与不溶性材料如纤维分离开来。将低含量的亚硫酸盐加入到提取介质中,其浓度为基于大豆粕重量 0.05% -0.15%。用约 pH6.5-7.0 的氢氧化钠水溶液对大豆粕、大豆粉、或大豆粗磨物进行第一次提取,然后用约 pH8.5-10 的溶液进行第二次提取。水与大豆粕 / 大豆粉 / 大豆粗磨物材料的重量比率为约 8 : 1 至约 16 : 1。

[0166] 在提取后,通过过滤或离心方法将提取物从不溶性材料中分离出来。然后用合适的酸将分离提取物的 pH 调节到约大豆蛋白的等电点 (约 pH 4-5,或优选地 pH 4.4-4.6) 附近以沉淀大豆凝结蛋白,以便大豆蛋白能从大豆可溶物中分离出来,大豆可溶物包括引起肠胃胀气的低聚糖和其它水溶性碳水化合物。合适的可食用酸包括盐酸、硫酸、硝酸、或乙酸。通过离心将沉淀的蛋白材料 (凝结物) 从提取物 (乳清) 中分离以制备大豆凝结蛋白材料。用水洗涤分离的大豆凝结蛋白材料以移除残余的可溶物,水与蛋白材料的重量比率为约 5 : 1 至约 12 : 1。

[0167] 用碱性溶液或碱土溶液如氢氧化钠溶液或氢氧化钾溶液将大豆凝结蛋白材料首先中和至约 PH 8.0 至约 PH 9.0,优选地约 PH 8.0-8.5。将中和后的大豆凝结蛋白加热并冷却,优选地通过喷气加热和闪蒸冷却。然后用 TL1 酶在合适温度下处理大豆蛋白材料足够的时间,以便大豆蛋白水解产物具有约 35-55 的 TNBS 值。将酶加入到大豆蛋白材料中,其浓度为基于凝结蛋白 0.005% -0.02% 的酶蛋白。酶与大豆凝结蛋白材料在 40℃ 至 60℃,优选地在约 50℃ 下接触 30 分钟至 120 分钟,优选地 50 分钟至 70 分钟以水解蛋白。通过将水解的大豆蛋白材料加热至足以灭活酶的温度来终止水解。最优选地,水解的大豆凝结蛋白材料被如上所述喷气加热以灭活酶、闪蒸冷却然后喷雾干燥。

[0168] 表 11 给出了一组典型的水解产物的反应参数。基本上如实施例 1 所述,使用 TNBS 方法测定水解度。表 11 也给出了每个样本的 TNBS 值和 % DH。对照样本包括未水解的大豆蛋白 (即,SUPRO[®] 500E) 和基本可商购获得的大豆分离蛋白水解产物 (即,S 用酶混合物水解至 2.8% DH 的 UPRO[®] XT 219)。

[0169] 表 11 : 中试 TL1 水解产物。

[0170]

样本#	pH, 温度	时间 (分钟)	剂量 (mg 酶 蛋 白 /kg 固体)	TNBS 值 (每 100kg 蛋白的 NH ₂ 摩尔数)	% DH
5-2	对照物 (未水解的蛋白质)			24.3	0
5-3	对照物 (水解蛋白质)			49.3	2.8
5-7	8.0, 50°C	30	10	26.7	0.3
5-8	8.0, 50°C	30	25	32.1	0.9
5-4	9.5, 50°C	30	50	35.8	1.3
5-9	8.0, 50°C	30	50	38.1	1.6
5-5	8.0, 50°C	120	50	42.1	2.0
5-1	8.0, 50°C	120	50	48.0	2.7
5-6	8.0, 50°C	120	100	58.2	3.8
5-10	8.0, 50°C	120	200	69.9	5.2

[0171] 通过 SDS PAGE 使用标准方法分析 TL1 水解产物和对照样本, 图 5 给出了凝胶的图像。该分析揭示 TL1 裂解了所有主要大豆贮藏蛋白亚基。

[0172] 实施例 11 : 中试 TL1 水解产物的溶解度和粘度。

[0173] 还检查了实施例 10 中制备的中试 TL1 水解产物和对照样本的溶解度。基本上如实施例 7 所述, 将每个样本的等分试样调节至 PH 2、PH 3、PH 4、PH 5、PH 6、PH 7、PH 8 和 PH 9 并测定可溶性固体指数 (SSI)。如图 6 所示, 所有的 TL1 水解产物样本在 pH 水平为 PH 6 或更高时几乎 100% 可溶解, 然而水解的对照样本在 PH 6 时只有大约 40% 可溶解。此外, 随着水解度的增加, 在等电点 (即, 约 PH 4-5) 处的溶解度也增加。

[0174] 几种 TL1 水解产物和对照样本的粘度在不同固体百分比 (即, 12-20% 固体) 条件下进行测定。样本使用小型 **Waring**[®] (WaringLaboratory, Torrington CT) 共混机, 在总浆液含量为 70 克的条件下进行分散。样本共混总计四分钟, 使用最小剪切力以减少泡沫。然后用布氏粘度计, 使用小量样本承接器和锭子 18 在室温下分析样本。一式两份的制备和分析每个样本。图 7 是不同制备的粘度曲线图, 单位是厘泊 (cps)。批量分离物的粘度大于 10,000cps- 对布氏粘度计来说, 在 12% 固体情况下它过于粘稠了。该分析揭示随着水解度提高, 粘度降低, 然而随着固体百分比提高, 粘度提高。图 8 综合了粘度和溶解度数据。将溶解度表示为可溶性固体指数 (SSI) 和可溶性氮指数 (NSI, 它是水溶性氮百分比对应于总氮的函数)。如图 8 所示, 随着水解度提高, 粘度降低而溶解度增加

[0175] 几种存在于 TL1 水解产物中的挥发性风味剂的量与存在于未水解大豆分离蛋白中的那些挥发性风味剂的量进行比较。使用标准 GC 技术测定挥发性风味剂。与未水解的大豆分离蛋白相比, TL1 水解产物中的己醛、庚醛、戊醛、3- 辛烯 -2- 酮和 1- 辛烯 -3- 醇的

含量降低（图 9A 和 9B）。

[0176] 实施例 12 :中试 TL1 水解产物的感官分析。

[0177] 使用基本上如实施例 6 所述的 SQS 方法分析实施例 10 中制备的中试 TL1 水解产物的风味特性。以 11 或 12 个经培训的评估员为一组对水解产物进行评估,水解产物与对照样本（即,未水解的大豆分离蛋白）进行比较。表 12 给出了平均 SQS 评分,图 10A-D 给出了诊断评分的曲线图。一般来讲,TL1 水解产物相对于对照样本具有轻微减少的谷物和大豆 / 豆类特性以及较低的粘度,但是具有增加的苦味特性,尤其在水解度（% DH）较高的情况下更是如此。水解的对照样本（即,样本 5-3）具有轻微减少的谷物特性,但是具有中度增加的苦味和收敛特性。因此,TL1 水解产物的评分一般为苦味少于水解的对照样本。

[0178] 表 12 :中试 TL1 水解产物的 SQS 评分。

[0179]

样本 #	样本	SQS 评分
5-2	盲态对照物（为水解的对照物）	4.8
5-3	对照物	3.2
5-7	TL1, 0.3% DH	4.1
5-8	TL1, 0.9% DH	3.6
5-4	TL1, 1.3% DH	3.9
5-9	TL1, 1.6% DH	3.7
5-5	TL1, 2.0% DH	3.6
5-1	TL1, 2.7% DH	3.2
5-6	TL1, 3.8% DH	2.7
5-10	TL1, 5.2% DH	2.7

[0180] 图 11 给出了 TL1 水解产物的感官分析的总结,其中关键感官特性对应于水解度的函数进行绘图。当水解度增加时,水解产物的总体感官评分降低,然而当水解度增加时苦味评分提高。它显示具有小于约 2% DH 的水解产物风味最好,苦味最少。

[0181] 实施例 13 :大豆 TL1 水解产物中的肽段分析。

[0182] 具有不同水解度的大豆分离蛋白的 TL1 水解产物中的肽通过 LC-MS 分析进行鉴定,其中 LC-MS 使用Q-STAR® XL MS(AppliedBiosystems Inc. (ABI), Foster City, CA) 和 LCQ-Deca MS(ThermoFinnigan, Hertfordshire, Great Britain)。

[0183] 大约 (0.5-2.0mg) 每个样本被溶解于 0.5mL 的 50mM 碳酸氢铵中。将五 iL 注入 75um i.d. 柱中进行 LC-MS/MS 分析,使用数据依赖型采集 (LC 流量为 180nL/min)。进行 Nano-LC, LC Packings Ultimate nano-LC 使用 C18PepMap100 柱 (Dionex, UK)/Eksigent

2D nano-LC 使用 C18PepMap100 柱 (Dionex)。表 13 中给出了色谱流出曲线。溶剂 A 是在 MilliQ 水中的 5% 乙腈、0.1% 甲酸, 溶剂 B 是在 MilliQ 水中的 95% 乙腈、0.075% 甲酸)。

[0184] 表 13 :LC-Pump 梯度。

[0185]

时间 (分钟)	% B
0	5
3	5
8	25
40	60
45	95

[0186] 用配备有纳电喷雾源 (Protana XYZ 操纵器) 的 ABI QSTAR[®] XL 杂交 QTOF MS/MS 质谱仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 进行样本分析。阳离子模式纳电喷雾由硼硅酸根纳电喷雾针在 2.5kV 条件下生成。用来自制造商的标准品每日校准仪器的 m/z 响应。使用 Analyst QS 软件中的信息依赖型数据采集 (IDA) 部件获取 TOF 质谱和产物离子质谱, 采集参数如下: TOF MS 和 MS/MS 的质谱范围分别是 m/z 300-2000 和 70-2000。TOF MS 前离子质谱被每秒积聚, 随后是三个产物离子质谱, 每个 3 秒钟。TOF MS 至 MS/MS 的转换由肽的质谱范围 (m/z 300-2000)、前电荷态 (2-4) 和离子强度 (> 50counts) 触发。DP、DP2 和 FP 设置分别为 60、10 和 230, 并且使用滚动碰撞能量。

[0187] 使用 Analyst QS 软件 (Applied Biosystems) 处理肽电喷雾联用质谱。通过搜索标准数据库如 NCBI 或 Swiss-Prot 对肽进行鉴定, 搜索使用 MASCOT, 版本 1.9, 同时有以下限制: 无具有最多一个错误裂解位点的酶; MS 和 MS/MS 片段离子分别为 0.8/2.0 和 0.8Da 质量公差。选择的前离子电荷态为 1-3。

[0188] 就使用 LCQ-Deca MS 的 LC-MS 分析而言, 样本通过以下方法制备: 1) 将包含 2mg 每个 TL1 水解产物的等分试样与 0.1% 甲酸 (1mL) 在玻璃小瓶中混合, 涡旋 1-2 分钟, 然后在离心机中 13,000rpm 离心混合物 5 分钟; 或 2) 将包含 3mg 每个 TL1 水解产物的等分试样与 0.1% 甲酸 (300uL) 在微量离心管中混合, 涡旋混合物 1-2 分钟。然后将全部混合物转移至预先清洁的 C18 枪头中 (Glygen Corp., Columbia, MD) 用于肽分离。用 0.1% 甲酸的 60% 乙腈溶液 (300 μ L) 洗脱 C18 枪头进行清洁, 并用 0.1% 甲酸 (600 μ L) 进行平衡。弃去 0.1% 甲酸组分洗脱出的材料, 用 0.1% 甲酸的 60% 乙腈溶液 (600 μ L) 洗脱所述肽。将溶剂混合物在 Genevac 蒸发器上 300 $^{\circ}$ C 蒸发 10 分钟, 使得肽溶液的总体积减少到 200 μ L。基本上如实施例 3 所述进行 LC-MS 分析。

[0189] 表 14 给出了所有在大豆蛋白 TL1 水解产物中鉴定的肽。

[0190] 表 14 :大豆 TL1 水解产物中的肽。

[0191]

SEQ ID NO :	序列	
85	GYLADK	666.31
86	FQTLFE	783.42
24	FETLFK	784.39
87	PPQESQK	813.35
18	PPKESQR	841.47
51	ADFYNP	854.35
88	PQESQKR	872.51
52	MIITAAQK	873.44
89	NQYGRIR	906.85
7	SPQLQNL	955.57
30	PPQESQKR	969.69
13	LSAEFGSLR	978.54
19	LSAQFGSLR	978.86
90	PEKNPQLR	981.95
59	DAMDGWFR	997.42
48	PQNFVVAAR	1001.67
91	EVGQDIQSK	1003.75
39	FFEITPEK	1010.52
92	DYGSYAQGR	1016.83
93	PPRYEAGVK	1017.19

31	LNALKPDNR	1040.48
94	APSIYHSER	1060.05
95	FGVNMQIVR	1063.52
8	SRDPIYSNK	1079.91
27	LAGEKDNVVR	1100.68
55	YEAGVVPPGAR	1115.81
96	SSDFLTYYGLK	1130.55
97	AFGVNMQIVR	1134.48
32	VFDGELQEGR	1149.55
98	NILEASYDTK	1153.48
99	NPIYSNNFGK	1153.57
100	GIGTISSPYR	1163.64
101	ESYFVDAQPK	1183.57
102	HLSVVHPIYK	1192.74
103	LHENIARPSR	1193.19
10	SSEDEPFNLR	1193.40
104	NKPLVVQFQK	1200.52
105	AKDYGSYAQGR	1215.94
57	TKEVGQDIQSK	1233.46
71	EAFGVNMQIVR	1263.63
106	THHNAVTSYK	1270.46

107	LAGNQEQEFLQ	1276.11
49	LAGNQEQEFLK	1276.11
108	NKNPFLFGSNR	1293.66
67	FLVPPQESQKR	1328.82
34	NFLAGEKDNVVR	1361.77
109	SRDPIYSNKL GK	1378.25
36	EQQEEQPLEVR	1383.89
22	PSEVLAHSYNLR	1386.32
110	SRNP IYSNNFGK	1396.65
34	ISTLN SLTLPALR	1398.86
65	TISS EDKPFNLR	1406.73
68	VLIVPQNFVVAAR	1425.88
111	YLAGNQEQEFLK	1439.72
14	SQSDNFEYVSFK	1450.57
56	HHLA EAAEYVGQK	1453.52
15	PEEVIQHTFNLK	1454.98
112	PEFLEHAFVVDR	1459.51
113	PPHSVQVHTTTHR	1496.89
77	NGLHLPSYSPYPR	1500.78
114	QIVTVEGGLSVISPK	1526.94
25	KTISS EDKPFNLR	1534.93

29	VREDENNPFFYLR	1551.92
115	LPEEVIQHTFNLK	1568.22
78	AIPSEVLAHSYNLR	1569.72
116	FSREEGQQQGEQR	1579.15
117	NQRESYFVDAQPK	1582.77
118	LFEITPEKNPQLR	1584.81
16	FYLAGNQEQEFLK	1586.53
20	FYLAGNQEQEFLQ	1587.53
61	FFEITPEKNPQLR	1618.87
35	KQIVTVEGGLSVISPK	1655.01
119	QESVIVEISKEQIR	1658.84
120	HLAEAAEYVGQKTK	1681.97
121	AGRISTLNSLTLPALR	1683.00
122	FMPEKGS AEYEELR	1685.88
123	PFSFLVPPQESQRR	1687.82
124	LEASYDTKFEEINK	1687.91
125	LARPVLGGSTFPYPR	1717.87
62	SSNSFQTLFENQNGR	1728.71
17	RFYLAGNQEQEFLK	1742.88
126	NELDKGIGTIISPYR	1762.75
37	LQESVIVEISKEQIR	1770.71

127	THHNAVSSYIKDVFR	1774.05
63	QVQELAFPGSAQDVER	1774.90
128	THHNAVTSYLKDVFR	1788.52
41	LKVREDENNPFFYLR	1792.91
129	NPFLFGSNRFETLTK	1817.93
130	HFLAQSFNTNEDIAEK	1863.86
131	NNNPFSFLVPPKESQR	1873.99
132	LFLLDHHDPIIMPYLR	1880.00
133	SLSQIVQPAFESAFDLK	1880.06
134	DWVFTDQALPADLIKR	1888.05
135	NLQGENEGEDKGAIVTVK	1900.99
136	NILEASYDTKFEEINK	1913.97
137	NLQGENEEEDSGAIVTVK	1931.88
138	KESFFFFPFELPREER	1957.03
69	RPSYTNGPQEIIYIQQGK	1980.03
139	SSNSFQTLFENQNGRIR	1997.89
140	NNNPFSFLVPPQESQRR	2029.84
141	AIPSEVLSNSYNLGQSQVR	2061.96
142	HFLAQSFNTNEDTAEKLR	2121.87
143	QVQELAFPGSAQDVERLLK	2129.03
144	VPSGTTYVVNPDNNENLR	2152.00

145	IPAGTTYLVNPHDQNLK	2181.01
146	QEEENECSNLSGFAPEFLK	2239.48
147	KQGQHQQEEEGGSVLSGFSK	2288.13
148	NLQGENEEEDSGAIVTVKGGLR	2314.87
149	SVSQNVLPQLLSAFDLNFTPR	2346.32
150	QVKNNPFSFLVPPQESQRR	2384.93
74	VFDGELQEGGVLIVPQNFAVAAK	2402.06
80	KQGQHQQEEEGGSVLSGFSK	2418.85
151	QVKNNPFSFLVPPQESQRR	2457.12
152	NAMFVPHYTLNANSIIYALNGR	2480.21
153	TPVVAVSIIDTNSLENQLDQMPR	2541.23
75	GKQEEENECSNLSGFAPEFLK	2552.16
154	VFDGELQEGRVLIVPQNFVVAAR	2557.16
155	EPVVAISLLDTSNFNNQLDQTPR	2572.90
156	KNAMFVPHYTLNANSIIYALNGR	2608.37
157	DLDIFLSIVDMNEGALLLPHFNSK	2701.56
158	VFYLAGNPDIHPETMQQQQQK	2730.40
159	HFLAQSFNTNEDIAEKLQSPDDER	2804.41
160	LVFCPQQAEDDKCGDIGISIDHDDGTR	2946.31
161	SQQRQVKNNPFSFLVPPQESQRR	2956.36
162	VLFGEEEERQQEGVIVELSKEQIR	2973.47

163	NLQGENEEEDSGAIVTVKGGRLVTAPAMR	3041.33
79	WQEQQDEDEDEDEDEDEDEQIPSHPPR	3211.13
164	VFYLAGNPDI EYPETMQQQQQQKSHGGR	3249.31
165	DFVLDNEGNPLENGGTYIYILSDITAFGGIR	3261.53
166	HQQEEENEGGSILSGFTLEFLEHAFSVDK	3278.49
167	RQQEEENEGGSILSGFAPEFLEHAFVDR	3291.54
168	TNDTPMIGTLAGANSLLNALPEEVIQHTFNLK	3423.41
169	HNIGQTSSPD IYNPQAGSVTTATSLDFPALSCLR	3646.60
170	HQQEEENEGGSILSGFTLEFLEHAFSVDKQIAK	3717.92
171	NFLAGSQDNVISQIPSQVQELAFPGSAQAVEKLLK	3728.18
172	MITLAIPVKNKGRFESFFLSSTQAQQSYLQGFSK	3822.18
173	FREGDLIAVPTGVAVWWMYNNEDTPVAVSII DTNSLENQLDQMPR	5105.43
270	LSAEFGSLRK	1107.69
271	IGENKDAMDGWFR	1538.75
40	VLFSREEGQQQGEQR	1791.01
177	NAMFVPHYNLNANSIIYALNGR	2493.17
272	KNAMFVPHYNLNANSIIYALNGR	2621.46
273	TNDRPSIGNLAGANSLLNALPEEVIQHTFNLK	3446.52
274	TNDRPSIGNLAGANSLLNALPEEVIQQTFLNR	3466.74

[0192]

[0193]

[0194]

[0195]

[0196] 实施例 14 :用其它肽链内切酶水解大豆蛋白。

[0197] 用不同的肽链内切酶(例如 SP3, 来自茄病镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶(TL5 ;SEQ ID NO :2)、来自 *Fusarium cf. solani* 的胰蛋白酶样蛋白酶(TL6 ;SEQ ID NO :3)、猪胰蛋白酶、或牛胰蛋白酶)处理大豆分离蛋白以测定是否胰蛋白酶或来自另一来源的胰蛋白酶样蛋白酶能被用于水解大豆蛋白。

[0198] 制备大豆分离蛋白的 8% 浆液(即, SUPRO[®] 500E), 调节至 PH 8, 并与其中一种肽链内切酶混合使得终浓度为 100mg 蛋白酶/kg 大豆蛋白。包括一种不包含蛋白酶的对照样本。浆液在 50℃ 水浴混合培养 2 小时, 然后加热灭活(80℃, 30 分钟)蛋白酶。将去离子水加入到每个样本中, 得到终浓度 5% 的大豆蛋白。

[0199] 为了评估水解度, 将每个样本的等分试样用 SDS-PAGE 溶解在 4-20% 的 Tris- 甘氨酸凝胶上 (Novex Inc., Wadsworth, OH)。如图 12 所示, TL1、SP3、TL5 和 TL6 将大豆蛋白水解成更小的多肽片段, 然而用猪或牛胰蛋白酶处理的大豆蛋白只有很少的水解或没有水解(参见泳道 7 和 8)。在 37℃ 和 50℃ (PH 8) 能观察到猪或牛胰蛋白酶不能裂解大豆蛋白的情况。

[0200] 实施例 15 :Bowman-Birk 抑制剂抑制胰蛋白酶样蛋白酶。

[0201] 猪或牛胰蛋白酶不能水解大豆蛋白材料的情况是可能的, 因为大豆包含活性蛋白酶抑制剂, 该抑制剂在大豆材料生产期间经热处理后依然存在。为了验证该假设, 将蛋白酶与不同浓度的商业制备的 Bowman-Birk 抑制剂一起培养, 然后测量残余酶活性。

[0202] 用检测分析缓冲液 (0.1M Tris, 0.02% Brij 35, PH 8.0) 将蛋白酶稀释至 0.001mg/mL, 然后在微孔板的孔内与不同浓度的 Bowman-Birk 抑制剂 (Cat#T-9777, Sigma-Aldrich) 混合。板在室温下搅拌培养 1 小时。通过加入 0.6mg/mL 底物, Boc-Val-L-leu-Gly-Arg-p-nitroanilide (L-1205 ;Bachem Biosciences, Prussia, PA), 测量残余活性。在室温下, 每隔 10 秒测量 405nm 处的吸光度, 持续 3 分钟。从测得的 405nm 处吸光度的起始斜率计算活性。残余活性被计算为一个有抑制剂的孔中的活性相对于一个无抑制剂的孔中的活性的比值。

[0203] 如表 15 所示, 猪和牛胰蛋白酶与微生物蛋白酶相比, 被浓度更低的 Bowman-Birk 抑制剂抑制。因此, 它显示大豆材料包含抑制动物来源的胰蛋白酶活性的化合物。

[0204] 表 15 :动物来源的蛋白酶的抑制

[0205]

Bowman-Birk 抑制剂 (mg/mL)	蛋白酶 (% 残余活性)				
	TL1	TL5	TL6	猪胰蛋白酶	牛胰蛋白酶
0.5	0.8	0.5	1.3	0.1	0.0
0.25	2.2	1.2	2.9	0.1	0.0
0.125	5.8	3.1	9.5	0.2	0.0
0.0625	13	7.2	26	0.4	0.0
0.0313	32	19	55	1.0	0.1
0.0156	61	29	66	2.2	-1.5
0.0078	82	43	84	3.2	0.0
0.0039	109	55	97	6.2	-0.4
0.00195	103	57	94	8.3	0.1
0.00097	111	71	107	9.4	5.3
0.00048	117	78	104	11	0.9
0	100	100	100	100	100.0

[0206] 实施例 16 :胰蛋白酶比率和胰蛋白酶样蛋白酶的鉴定。

[0207] 开发了一种用于鉴定具有胰蛋白酶样活性的酶的检测分析法。就该方法而言,胰蛋白酶样活性使用显色底物和通式 Suc-Ala-Ala-Pro-Xxx-pNA (Bachem Biosciences, King of Prussia, PA) 一起进行测量,其中 Xxx 是二十种天然氨基酸残基中的任一个的三字母缩写形式, pNA 是 para-nitroanilide。如果肽链内切酶在 Xxx 的羧基末端一侧裂解肽键,那么然后释放出 para-nitroaniline 并生成黄色,基本上如实施例 15 所述进行测量。使用十种 pNA 底物,其中 Xxx 是 Ala、Arg、Asp、Glu、Ile、Leu、Lys、Met、Phe 或 Val。

[0208] 测试以下肽链内切酶:ALCALASE[®]、SP3、TL1 和猪胰蛋白酶。通过色谱法纯化所有酶以得到高纯度,即,在每个肽酶在考马斯亮蓝染色的 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上仅能看到一条带。测量每个酶的活性时,其 pH 值应使酶活性不低于最佳 pH 值时酶活性的一半,底物为 Suc-Ala-Ala-Pro-Xxx-pNA。相对于这些底物,ALC 的最佳 pH 是 PH 9,其它三种肽酶的最佳 pH 是 PH 10。检测分析缓冲液是 100mM 的琥珀酸、100mM HEPES、100mM CHES、100mM CABS、1mM CaCl₂、150mM KCl 和 0.01% Triton X-100, pH 9.0。将二十 μ L 每个肽酶的稀释液(稀释在 0.01% Triton X-100 中)加入微孔板的十个孔内。将十种 pNA 底物的其中一种加入 200 μ L 到每个孔内,开始检测(将 50mg 底物溶解在 1.0mLDMSO 中,并用检测分析缓冲液进一步稀释到 90x)。监控 OD405 是否开始提高,将其作为肽酶活性的量度。如果在 4 分钟的测量时间内不能获得线性曲线,则将肽酶进一步稀释并重复所述检测。

[0209] 胰蛋白酶比率如下计算:底物包含精氨酸或赖氨酸时的最高活性除以底物为八种其它底物中的任何一种时的最高活性。将胰蛋白酶样肽链内切酶定义为一种具有大于 100 的胰蛋白酶比率的肽链内切酶。

[0210] 表 16 给出了相对于底物为 Suc-Ala-Ala-Pro-Xxx-pNA 时的最高活性的活性水平, 以及胰蛋白酶的比率。虽然该检测分析在 PH 9 条件下进行并且三个受试肽酶的最佳 pH 大于 PH 9, 这三个肽酶在 PH 9 的活性大于在最佳 pH 时的活性的一半。因此, 该分析揭示水解无色杆菌蛋白酶 (SP3)、镰孢属胰蛋白酶样蛋白酶 (TL1) 和猪胰蛋白酶是胰蛋白酶样肽链内切酶, 相反 **ALCALASE[®]** (ALC) 不是胰蛋白酶样肽链内切酶。

[0211] 表 16 : 不同肽酶的活性和胰蛋白酶比率。

[0212]

底物 (Xxx)	ALC	SP3	TL1	猪胰蛋白酶
Ala	0.02497	0.00001	0.00000	0.00001
Arg	0.01182	0.00001	1.00000	1.00000
Asp	0.00053	0.00000	0.00000	0.00000
Ile	0.00026	0.00000	0.00000	0.00000
Met	0.37582	0.00023	0.00002	0.00031
Val	0.00033	0.00000	0.00000	0.00000
Leu	0.86502	0.00001	0.00000	0.00002
Glu	0.00289	0.00000	0.00000	0.00000
Lys	0.01900	1.00000	0.53071	0.51396
Phe	1.00000	0.00001	0.00003	0.00057
Arg 或 Lys 的最大值	0.01900	1.00000	1.00000	1.00000
非 Arg/Lys 的最大值	1.00000	0.00023	0.00003	0.00057
胰蛋白酶比率	0.019	4300	33000	1750

[0213]

[0214] 实施例 17 : 来源于大豆和乳品蛋白的组合物 TL1 水解产物。

[0215] 用 TL1 将大豆分离蛋白和乳品分离蛋白的组合水解至不同的水解度, 以便能够评估该组合的功能特性和感官特性。

[0216] 通过适度混合将大豆分离蛋白 (**SUPRO[®] 500E**) 和酪蛋白酸钠 (**Alanate[®] 180**, NZMP Inc., Wellington, New Zealand) 的 50/50 混合物分散在水中来制备大豆和乳品蛋白的 5% 浆液。将混合物加热到 80°C 并保持五分钟, 冷却至 50°C, 然后用 1M NaOH 将 pH 调节至 8.0。将浆液等分试样适度混合并加热至 50°C, 然后加入不同量的 TL1 (17-600mg 酶蛋白

每 kg 完整蛋白) 以获得所需的 % DH 值 (0.2% DH、4% DH 和 6% DH)。在 50℃ 培养一段时间 (约 60 分钟) 以获得所需的水解度, 然后将样本加热至 90℃ 并保持 3 分钟以灭活酶。用冰冷却样本并将其贮存于 4℃。使用 TNBS 方法 (如实施例 1 所述) 测定水解度 (% DH)。

[0217] 在两种大豆 / 乳品 TL1 水解产物 (即, 4.3% DH 和 6.7% DH) 中测试 pH 对溶解度的效应。将每个等分试样调节至 PH 5、PH 6、PH 7、或 PH 8, 并且样本在 500xg 离心 10 分钟。将离心前溶液中固体物质的量与离心后溶液中固体物质的量进行比较以提供可溶性固体指数 (SSI), 在图 13 中给出了 % 可溶性固体对应于 pH 函数的曲线图。两种溶液在 PH 5 的 pH 水平上都具有降低的溶解度 (即, 在大豆蛋白的等电点附近)。然而, 两种大豆 / 乳品 TL1 水解产物在约 pH 6.0 及更高的水平上都具有优异的溶解度。

[0218] 实施例 18: 大豆 / 乳品的 TL1 水解产物中的肽段分析。

[0219] 实施例 17 中制备的大豆 / 乳品 TL1 水解产物中的肽段通过液相色谱质谱 (LC-MS)、使用上文详述的方法 (参见实施例 3、4 和 13) 进行鉴定。在此研究中鉴定的肽段序列在表 17 中列出。鉴定了四种新的大豆来源的肽 (即, SEQ ID NOs: 174、175、176 和 177)。乳品来源的序列是 SEQ ID NO: 178-197。

[0220] 表 17: 大豆 / 乳品 TL1 水解产物中的肽段*。

[0221]

SEQ ID NO:	序列	MH+
13	LSAEFGSLR	979.45
96	SSDFLT YGLK	1130.50
174	EAFGVNMQIVR	1263.55
34	ISTLNSLTLPALR	1398.83
175	ISPLPVLKEIFR	1411.76
68	VLIVPQNFVVAAR	1425.67
14	SQSDNFEYVSFK	1450.50
56	HHLAEAAEYVGQK	1452.65
78	AIPSEVLAHSYNLR	1569.65
16	FYLAGNQEQEFLK	1586.65
61	FFEITPEKNPQLR	1618.66
121	AGRISTLNSLTLPALR	1682.88
176	YEAGVVPPARFEAPR	1658.76
37	LQESVIVEISKEQIR	1770.84
72	NNNPFSFLVPPQESQR	1873.80
69	RPSYTNGPQEIIYQQGK	1978.84
140	NNNPFSFLVPPQESQRR	2029.93
149	SVSQNVLP LLQSAFDLNFTPR	2346.00
152	NAMFVPHYTLNANSIIYALNGR	2479.02
177	NAMFVPHYNLNANSIIYALNGR	2492.02
156	KNAMFVPHYTLNANSIIYALNGR	2607.38
178	YIPIQYVLSR	1251.58
179	YLGYLEQLLR	1268.39
180	HIQKEDVP SER	1337.60
181	FFVAPFPEVFGK	1384.76
182	FVAPFPEVFGKEK	1494.68
183	HPHLSFMAIPPKK	1502.71
184	YLGYLEQLRLK	1509.39

[0222]

185	IAKYIPIQYVLSR	1563.77
186	HPHPHLSFMAIPPK	1608.72
187	FFVAPFPEVFGKEK	1642.29
188	HPHPHLSFMAIPPKK	1736.78
189	HQGLPQEVLENENLLR	1759.80
190	SPAQILQWQVLSNTVPAK	1979.96
191	HPHPHLSFMAIPPKKNQDK	2222.18
192	HPIKHQGLPQEVLENENLLR	2235.07
193	RPKHPIKHQGLPQEVLENENLLR	2616.33
194	YYQQKPVALINNQFLPYYPYAKPAAVR	3216.39
195	LHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR	3804.52
196	LITLAIPVUNKPGRFESFFLSSTEAQQSYLQGFSR	3832.67
197	YPSYGLNYYQQKPVALINNQFLPYYPYAKPAAVR	4010.66
* 乳品来源的肽段 = SEQ ID NO: 178-197; 大豆来源的肽段 = 所有其它 SEQ ID NO.		

[0223] 实施例 19 : 来源于其它蛋白材料的 TL1 水解产物。

[0224] 用 TL1 处理多种其它植物来源的蛋白材料以生成其它水解产物。小规模制备这些水解产物 (即, 实验室规模)。就此而言, 低芥酸菜籽分离蛋白、小麦谷朊粉、或玉米胚芽蛋白的 5% 浆液在高于 80°C 的温度下变性五分钟。蛋白浆液用碱性溶液或碱土溶液如氢氧化钠溶液或氢氧化钾溶液中和至约 PH 8.0-8.5。然后用 TL1 酶在合适温度下处理每个蛋白浆液足够的时间。将 TL1 酶加入到蛋白浆液中, 其浓度为基于凝结蛋白 0.01% -0.08% 的酶蛋白。该酶在约 50°C 接触凝结蛋白材料 50 分钟至 70 分钟以水解蛋白。通过将水解的大豆蛋白材料加热至足以灭活酶的温度来终止水解反应。

[0225] 表 18 给出了一般的水解产物的反应参数。TL1 酶的活性基于 % DH 进行测量, % DH 通过测定每 100kg 蛋白中存在的 NH₂ 摩尔数进行测量。提高的 TNBS 值证明了酶的活性。酶活性显示受蛋白材料的悬浮状况或溶解度影响, 虽然每个蛋白的活性不是最优化的。

[0226] 表 18 : 反应参数。

[0227]

样本	pH, 温度	时间 (分钟)	剂量 (mg 酶 蛋白/kg 固体)	TNBS 值 (每 100kg 蛋白的 NH ₂ 摩尔数) *
低芥酸菜籽 D	8.0, 50℃	60	400	38.8
低芥酸菜籽 E	8.0, 50℃	60	800	46.1
玉米胚芽 B	8.0, 50℃	60	100	41.0
玉米胚芽 D	8.0, 50℃	60	400	48.9
玉米胚芽 E	8.0, 50℃	60	800	57.2
小麦 E	8.0, 50℃	60	800	20.8
* TNBS 值 = 试验样本的 TNBS 值-对照样本的 TNBS 值 (即, 未水解的蛋白质)				

[0228] 通过 SDS PAGE 使用标准方法分析 TL1 低芥酸菜籽、玉米、或小麦水解产物和未水解的对照样本。图 14 给出了凝胶的图像。该分析揭示 TL1 裂解了每个蛋白材料的所有主要蛋白亚基。

[0229] 使用上文详述的方法鉴定低芥酸菜籽、玉米、或小麦 TL1 水解产物中的代表性的肽。表 19、20 和 21 分别给出了在低芥酸菜籽、玉米和小麦 TL1 水解产物中鉴定的代表性的肽。

[0230] 表 19 :低芥酸菜籽分离蛋白的 TL1 水解产物中的肽。

[0231]

SEQ ID NO :	肽	MH+
198	QTATHLPR	923.43
199	LQNQQVNR	999.47
200	YQTATHLPR	1086.48
201	GPFQVVRPPL	1109.57
202	MADAVGYAGQK	1110.45
203	EFQQAQHLR	1156.51
204	NNFEWISFK	1184.51
205	GASKAVKQQIR	1185.56
206	VQGQFGVIRPP	1197.60

207	IYQTATHLPR	1199.50
208	MADAVGYAGQKGK	1295.50
209	VQGPFSVIRPPL	1309.70
210	VQQQFGVIRPPL	1310.68
211	GLYLPSFFSTAK	1330.64
212	TNANAQINTLAGR	1343.61
213	ISYVVQGMGISGR	1366.63
214	NILNGFTPEVLAK	1415.71
215	TAQQLQNQQDNR	1443.61
216	RMADAVGYAGQKGK	1451.62
217	ATSQQFQWIEFK	1512.63
218	AGNNPQGQQWLQGR	1553.66
219	GQLLVVPQGFVVKR	1610.88
220	TLLFGKPVTVFGIR	1676.86
221	LLAGNNPQGQQWLQGR	1779.82
222	VTSVNSYTLPIQYIR	1866.93
223	MNQFFHGWYMEPLTK	1928.79
224	TAQQLQNQQDNRGNIVR	1982.91
225	PFLLAGNNPQGQQWLQGR	2023.94
226	FGIVEGLMTTVHSITATQK	2032.96
227	GLPLEVISNGYQISPQEAR	2070.99
228	WFLPFDESDPASIEAAER	2079.83
229	GLPLEVISNGYQISLEEAR	2088.00

230	ALPLEVITNAFQISLEEAR	2114.49
231	QQGQQGQQGQQQLQHEISR	2205.89
232	NFGKDFIFGVASSAYQIEGGR	2262.97
233	ALPLEVITNAFQISLEEAR	2270.49
234	THENIDDPARADVYPNLGR	2281.00
235	FNTIETTTLTHSSGPASYGRPR	2291.97
236	NLRPFLLAGNNPQGQQWLQGR	2406.69
237	VFDQEISKGQLLVVPQGFVVKR	2557.27

[0232]

[0233]

表 20: 玉米 TL1 水解产物中的肽。

SEQ ID		
NO:	肽	MH+
238	VAVLEANPR	968.60
239	RPYVFDRR	1108.69
240	HGQDKGIIVR	1122.74
241	AIGFDGLGDPGR	1174.69
242	VLRPFDEVSR	1217.76
243	NPESFLSSFSK	1242.68
244	VFLAGADNVLQK	1274.80
245	DIGFNGLADPNR	1288.75
246	NALENYAYNMR	1358.73
247	VPTVDVSVDLTVR	1498.34
248	QISWNYNYGPAGR	1525.83
249	ARFEELNMDLFR	1540.98
250	REQLGQQGYSEMGK	1610.84
251	TLLFGDKPVTVFGIR	1663.11
252	REQLGQQGYSEMGKK	1739.04
253	GPLQISWNYNYGPAGR	1793.05
254	ALSFASKAEEVDEVLGSR	1908.10
255	AVGKVLPDLNGKLTGMSFR	2003.30
256	ALSFASKAEEVDEVLGSR	2064.30
257	LSPGTAFVVPAGHPFVAVASR	2080.53
258	DQRPSIANQHGYLYEADAR	2169.30
259	ARLSPGTAFVVPAGHPFVAVASR	2307.41
260	RHASEGGHGWPLPPFGESR	2308.34
261	YYGRGPLQISWNYNYGPAGR	2332.25

[0234] 表 21 :小麦 TL1 水解产物中的肽

[0235]

SEQ ID		
NO :	肽	MH+

262	WSTGLQMR	978. 53
263	QVVDQQLAGR	1113. 62
264	QYEQTVVPPK	1188. 70
265	QGGQGGYYPTSPQHTGQR	1933. 07
266	QVVDQQLAGRLPWSTGLQMR	2283. 30
267	QGYDSPYHVSAEQQAASPMVAK	2364. 25
268	SLQQPGQQGQIGQQGQGGYYPTSPQHTGQR	3154. 78
269	QGGYYPTSLQQPGQQGQIGQQGQGGYYPTSPQHTGQR	3864. 02

[0236] 实施例 20 :大豆水解产物和完整乳品蛋白的组合物感官分析。

[0237] 大豆 TL1 水解产物与完整乳品蛋白进行组合（即，酪蛋白酸盐或乳清）。使用 SQS 方法比较大豆水解产物和完整乳品蛋白的这些组合与未水解（完整）大豆与完整乳品蛋白的感官特性，在上文的实施例 6 中详述了 SQS 方法。将具有约 2.1% DH 水解度的 TL1 大豆水解产物稀释成 5% 浆液。将未水解的大豆蛋白也稀释成 5% 浆液。在第一次试验中，TL1 水解产物与酪蛋白酸钠混合（1 : 1）并对对照样本进行评估，对照样本是未水解大豆蛋白与酪蛋白酸钠的混合物（1 : 1）。在第二次试验中，TL1 水解产物与甜味乳品乳清混合（4 : 1）并对对照样本进行评估，对照样本是未水解大豆蛋白与甜味乳品乳清的混合物（4 : 1）。

[0238] 表 22 给出了每个样本的平均 SQS 评分和诊断评分。包括 TL1 水解产物的组合的评分一般为与对照样本有轻微差异。诊断评分显示 TL1 水解产物和完整乳品蛋白的组合相对于对照样本（即，未水解的大豆和完整乳品蛋白的组合）具有改善的感官特性。

[0239] 表 22 :SQS 分析。

[0240]	样本	SQS 评分	诊断评分*
	TL1 水解产物 + 酪蛋白	3.7	↓ 谷物
	TL1 水解产物 + 乳品乳清	3.6	↓ 大豆/豆类
	* ↓ = 轻微小于对照样本		

[0241] 实施例 21 :对包括蛋白质水解产物的饮料的分析。

[0242] 使用具有不同水解度的 TL1 大豆分离蛋白水解产物制备几种典型即饮型 (RTD) 中性饮料和一种干混饮料的混合物。该饮料包括豆奶型饮料（即，包含 4% 大豆分离蛋白，具有 8.5g 蛋白 /8 盎司每份的无味低脂肪豆奶饮料）、组合型饮料（即，包含 8g 蛋白 /8 盎司每份的无味饮料，其中总蛋白的一半来自大豆，另一半蛋白来自脱脂乳）和干混型饮料。RTD 饮料的物理特性和感官特性与那些用不同来源的未水解大豆蛋白和 / 或乳品蛋白制备的饮料进行比较。

[0243] 表 23 给出了豆奶型饮料的配方。为了制备豆奶型饮料，将柠檬酸盐溶解在水中，

加入大豆蛋白,提高混合速率以将蛋白分散在水中。在蛋白完全分散后,提高浆液温度至 77℃ (170° F),降低混合速率,混合浆液 10 分钟。将麦芽糖糊精、糖和稳定剂预混在一起并加入到蛋白浆液中。低速混合浆液 5 分钟。将向日葵油加入到浆液中,继续低速混合直至混合物均一化(大约 3 分钟)。用 45%氢氧化钾将浆液 pH 调节至约 7.0-7.2。该浆液在 500psi(第二相)和 2500psi(第一相)是均一化的。浆液通过超高温(UHT)在 141℃ (286° F) 处理 6 秒钟进行巴氏灭菌。将混合物冷却至 31℃ (88° F) 并包装在无菌瓶中。低温贮存产品。

[0244] 表 23 :豆奶型饮料配方。

[0245]

成分	浓缩 (%)
蒸馏水	89.4
麦芽糖糊精	4.2
大豆分离蛋白(未水解的或经 TL1 水解的) (根据按原样的蛋白质含量调节所用的水解产物的量。)	4.0
糖	1.4
高油酸向日葵油	0.7
柠檬酸钾	0.3
稳定剂	0.03

[0246] 表 24 给出了组合型饮料的配方。为了制备组合型饮料,将柠檬酸盐适度混合溶解于水中。加入大豆蛋白,提高混合速率以使蛋白分散在水中。在蛋白完全分散后,提高浆液温度至 77℃ (170° F),降低混合速率,混合浆液 10 分钟。将麦芽糖糊精、糖、维生素 / 矿物质预混物、磷酸镁、纤维素和稳定剂预混在一起并加入到蛋白浆液中。低速混合浆液 5 分钟。将向日葵油加入到浆液中,继续低速混合直至混合物均一化(大约 3 分钟)。用 45%氢氧化钾或 50%柠檬酸将浆液 pH 调节至约 6.9-7.1。将脱脂乳缓慢加热至 72℃ (162° F),然后将大豆蛋白浆液加入到热脱脂乳中,将混合物缓慢混合 3 分钟。该混合物在 500psi(第二相)和 2500psi(第一相)是均一化的。混合物通过超高温(UHT)在 141℃ (286° F) 处理 6 秒钟进行巴氏灭菌。将混合物冷却至 31℃ (88° F) 并包装在无菌瓶中。低温贮存产品。

[0247] 表 24 :组合型饮料配方。

[0248]

成分	浓缩 (%)

脱脂乳	50.0
蒸馏水	44.0
麦芽糖糊精	2.0
大豆分离蛋白（未水解的或经 TL1 水解的） （根据按原样的蛋白质含量调节所用的水解产物的量。）	1.8
糖	1.0
高油酸向日葵油	0.8
纤维素凝胶	0.3
无水柠檬酸钠	0.05
磷酸氢镁	0.04
稳定剂	0.02
维生素 / 矿物质预混物	0.006

[0249] 表 25 给出了干混型饮料的配方。为了制备该饮料混合物，将大豆蛋白和可可粉过筛并与所有其它成分在中速下混合 15 分钟。将干粉贮存在清洁容器中。

[0250] 表 25 :干混型饮料配方。

[0251]

成分	浓缩 (%)
大豆分离蛋白（未水解的或经 TL1 水解的） （根据按原样的蛋白质含量调节所用的水解产物的量。）	17.0
乳清分离蛋白	16.0
糖	3.3
果糖	3.3
可可	3.0
脂肪粉末	1.4

稳定剂	0.4
甜味增强剂	0.30
巧克力风味剂	0.70
奶油	0.20
维生素预混物	0.06
三氯蔗糖	0.04
总计	45.5

[0252] 为了测量饮料的粘度,振摇豆奶型和组合型饮料以获得均匀分散体,并将一份量的干混型饮料干粉完全分散在特定量的水中,分散时使用共混机低速分散 30-40 秒或直至完全分散。将每个样本立即灌入 180mL 烧杯中 (#14070, Kimax[®], USA),将其灌满直至到达烧杯弯曲部分的底部。在测量前移除任何可见的泡沫。经固定时间后,使用布氏粘度计 (DV-II+ 型) (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA) 测量粘度,单位为厘泊 (cP),使用转子 #1, RPM60 测量 1 分钟 (温度为 25-30℃)。

[0253] 为了评估豆奶型饮料的稳定性,经 UHT 处理后将样本收集在 250-mL 无菌方型培养基瓶中。这些瓶子在室温 (25℃) 下贮存 (无干扰) 4 周。然后将瓶子放在平坦表面上,用直尺 (最少 100mm, 最小刻度 1mm) 测量沉淀物的含量。使用以下公式获得沉淀百分比: (沉淀 (mm) / 总液体体积 (mm)) x 100。当直尺靠着样本瓶一侧放置时,如果沉淀层在瓶底,并且在直尺末端之下,则将其记录为痕迹沉淀。

[0254] 表 26 和 27 分别给出了豆奶型和组合型饮料的粘度和稳定性。豆奶型饮料的粘度测量结果与未水解的大豆对照样本相当。组合型饮料的粘度测量结果在包含大豆的对照样本的范围内,轻微低于牛奶对照样本。所有豆奶型和组合型饮料都具有良好的稳定性。这些数据揭示模型饮料的功能特性不受具有不同水解度的 TL1 大豆分离蛋白水解产物的负面影响。

[0255] 表 26 :豆奶型饮料的特性。

[0256]

样本描述	粘度 (cP)	稳定性 (%悬浮液)
对照物 1 (未水解的大豆)	5.8-6.7	93.2-93.7%
对照物 2 (未水解的大豆)	5.6	98.9%
TL1, 1.2% DH	5.8	98.9%

TL1, 1. 4% DH	5. 5	98. 9%
TL1, 1. 5% DH	5. 3	98. 9%
TL1, 2. 2% DH	5. 6	98. 9%
TL1, 3. 2% DH	5. 1	96. 1%

[0257] 表 27 :组合型饮料的特性。

[0258]

样本描述	粘度 (cP)
对照物 1 (100%脱脂乳)	13. 1
对照物 2 (50%未水解大豆和 50%脱脂乳)	9. 7-12. 6
TL1, 1. 2% DH	12. 7
TL1, 1. 4% DH	10. 1
TL1, 1. 4% DH	10. 6
TL1, 1. 5% DH	12. 2
TL1, 2. 2% DH	11. 3
TL1, 2. 3% DH	9. 4
TL1, 3. 2% DH	10. 7

[0259] 使用九点嗜好程度来评估不同模型饮料的感官和风味特性的消费者测试。对饮料进行如下标注 :程度 1 表示极端不喜欢,程度 9 表示极度喜欢,5 表示既不喜欢也不讨厌。图 15 给出了豆奶型饮料的强制排名,即,两个对照样本和 TL1 的 2. 2% DH 样本。TL1 水解产物样本的排名在“总体嗜好”、“风味嗜好”和“余味嗜好”方面显著高于两个对照样本。此外,当强制排名时消费者把 TL12. 2% DH 样本作为该组的优选样本。图 16 给出了组合型饮料的强制排名,即,100%脱脂乳对照物、50%未水解大豆 /50%脱脂乳和 50% TL12. 2% DH 大豆水解产物 /50%脱脂乳。包含 TL1 水解产物的样本的排名在几乎所有嗜好特性方面显著高于未水解的包含大豆样本,并且在所有嗜好特性方面(即,总体嗜好、颜色嗜好、风味嗜好、口感嗜好、浓度嗜好和余味嗜好)与 100%脱脂乳对照样本相当。

[0260] 还使用 SQS 方法(如实施例 6 中详述的方法)分析豆奶型和组合型饮料及它们对应的蛋白浆液。表 28 给出了 SQS 评分和诊断评分。如表中所示,每个试验样本与对照样本进行比较。一般来讲,包含 TL1 水解产物的样本具有相对于对照样本降低的大豆 / 豆类、谷物和纸板 / 木质感官特性。

[0261] 表 28 :模型饮料的 SQS 评分和诊断*。

[0262]

样本描述	蛋白质浆液	豆奶型	组合型	干混型
对照物	未水解的大豆	具有未水解大豆的饮料	具有未水解大豆的饮料	具有未水解大豆的饮料
TL11.2% DH	SQS = 3.5 ↓ 谷物 ↓ 大豆/豆类 ↑ 苦味	SQS = 3.6 ↓ 大豆/豆类 ↓ 纸板/ 木质	SQS = 4.0 无差异	SQS = 4.0 ↓ 纸板/木质
TL11.4% DH	SQS = 3.8 ↓ 谷物 ↓ 大豆/豆类 ↓ 纸板/ 木质 ↓ 粘度	SQS = 3.7 ↓ 谷物 ↓ 大豆/豆类 ↓ 纸板/ 木质		SQS = 3.4 ↓ 纸板/木质

[0263]

TL11.5% DH	SQS = 3.9 ↓ 大豆/豆类	SQS = 3.7 ↓ 大豆/豆类 ↓ 纸板/ 木质		
TL12.2% DH	SQS = 3.4 ↓ 谷物 ↓ 大豆/豆类 ↑ 苦味	SQS = 3.5 ↓ 大豆/豆类	SQS = 3.8 ↓ 大豆/豆类	SQS = 3.4 ↓ 粘度 ↓ 颗粒数量
TL13.2% DH	SQS = 3.4 ↓ 谷物 ↑ 苦味	SQS = 3.5 ↓ 大豆/豆类	SQS = 3.9 ↓ 大豆/豆类	SQS = 3.6 ↓ 粘度 ↓ 颗粒数量
* ↑↑↑ 比对照样本极端更多, ↑↑中度更多, ↑ 轻微更多。 * ↓↓↓ 比对照样本极端更少, ↓↓中度更少, ↓ 轻微更少。				

序列表

<110>The Solae Company

Wong, Theodore M.

Kerr, Phillip S.

Ghosh, Parthasarathi

Lombardi, Jason

Mal donado, Yadi lka

Lynglev, Gitte B.

Hoff, Tine

Christensen, Lars LH

Oestergaard, Peter R.

<120> 具有改善的感官特性和物理特性的蛋白质水解产物组合物

<130>SP-1477

<150>US 60/911, 935

<151>2007-04-16

<160>274

<170>PatentIn 版本 3.5

<210>1

<211>248

<212>PRT

<213> 尖孢镰孢

<400>1

Met Val Lys Phe Ala Ser Val Val Ala Leu Val Ala Pro Leu Ala Ala

1 5 10 15

Ala Ala Pro Gln Glu Ile Pro Asn Ile Val Gly Gly Thr Ser Ala Ser

20 25 30

Ala Gly Asp Phe Pro Phe Ile Val Ser Ile Ser Arg Asn Gly Gly Pro

35 40 45

Trp Cys Gly Gly Ser Leu Leu Asn Ala Asn Thr Val Leu Thr Ala Ala

50 55 60

His Cys Val Ser Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Phe Gln Ile Arg Ala Gly

Met	Val	Lys	Phe	Ala	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Val	Ala	Pro	Leu	Val	Ala
1				5					10					15	
Ala	Arg	Pro	Gln	Asp	Ser	Ser	Pro	Met	Ile	Val	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
			20					25					30		
Ser	Ala	Gly	Asp	Phe	Pro	Phe	Ile	Val	Ser	Ile	Ala	Tyr	Asn	Gly	Gly
		35					40					45			
Pro	Trp	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Leu	Asn	Ala	Asn	Thr	Val	Met	Thr	Ala
	50					55					60				
Ala	His	Cys	Thr	Gln	Gly	Arg	Ser	Ala	Ser	Ala	Phe	Gln	Val	Arg	Ala

65	70	75	80
Gly Ser Leu Asn Arg Asn Ser Gly Gly Val Thr Ser Ser Val Ser Ser			
	85	90	95
Ile Arg Ile His Pro Ser Phe Ser Ser Ser Thr Leu Asn Asn Asp Val			
	100	105	110
Ser Ile Leu Lys Leu Ser Thr Pro Ile Ser Thr Ser Ser Thr Ile Ser			
	115	120	125
Tyr Gly Arg Leu Ala Ala Ser Gly Ser Asp Pro Val Ala Gly Ser Asp			
	130	135	140
Ala Thr Val Ala Gly Trp Gly Val Thr Ser Gln Gly Ser Ser Ser Ser			
145	150	155	160
Pro Val Ala Leu Arg Lys Val Thr Ile Pro Ile Val Ser Arg Thr Thr			
	165	170	175
Cys Arg Ser Gln Tyr Gly Thr Ser Ala Ile Thr Thr Asn Met Phe Cys			
	180	185	190
Ala Gly Leu Ala Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly			
	195	200	205
Gly Pro Ile Val Asp Thr Ser Asn Thr Val Ile Gly Ile Val Ser Trp			
	210	215	220
Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Leu Ser Gly Val Tyr Ala Arg Val			
225	230	235	240
Gly Ser Leu Arg Thr Tyr Ile Asp Gly Gln Leu			
	245	250	

<210>3

<211>250

<212>PRT

<213>Fusarium cf. solani

<400>3

Met Val Lys Phe Ala Ala Ile Leu Ala Leu Val Ala Pro Leu Val Ala			
1	5	10	15
Ala Arg Pro Gln Asp Arg Pro Met Ile Val Gly Gly Thr Ala Ala Ser			
	20	25	30
Ala Gly Asp Phe Pro Phe Ile Val Ser Ile Ala Tyr Asn Gly Gly Pro			
	35	40	45
Trp Cys Gly Gly Thr Leu Leu Asn Ala Ser Thr Val Leu Thr Ala Ala			
	50	55	60
His Cys Thr Gln Gly Arg Ser Ala Ser Ala Phe Gln Val Arg Ala Gly			

65	70	75	80
Asn Ser Gly Ala Trp Glu Tyr Thr Ala Asp Gly Gln Phe Ala Val Trp			
	85	90	95
Arg Gln Arg Val Arg Ser Glu Lys Ala Leu Ser Leu Asn Phe Gly Phe			
	100	105	110
Thr Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Gly Gly Arg Leu Leu Val Tyr Pro Ala			
	115	120	125
Thr Gln Ala Pro Ala Gly Asp Arg Gly Leu Ile Ser Gln Tyr Asp Ala			
	130	135	140
Ser Asn Asn Asn Ser Ala Arg Gln Leu Trp Thr Ala Val Val Pro Gly			
145	150	155	160
Ala Glu Ala Val Ile Glu Ala Val Ile Pro Arg Asp Lys Val Gly Glu			
	165	170	175
Phe Lys Leu Arg Leu Thr Lys Val Asn His Asp Tyr Val Gly Phe Gly			
	180	185	190
Pro Leu Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Gly Glu Lys Gly Val Ser			
	195	200	205
Gly Ser Cys Asn Ile Asp Val Val Cys Pro Glu Gly Asp Gly Arg Arg			
	210	215	220
Asp Ile Ile Arg Ala Val Gly Ala Tyr Ser Lys Ser Gly Thr Leu Ala			
225	230	235	240
Cys Thr Gly Ser Leu Val Asn Asn Thr Ala Asn Asp Arg Lys Met Tyr			
	245	250	255
Phe Leu Thr Ala His His Cys Gly Met Gly Thr Ala Ser Thr Ala Ala			
	260	265	270
Ser Ile Val Val Tyr Trp Asn Tyr Gln Asn Ser Thr Cys Arg Ala Pro			
	275	280	285
Asn Thr Pro Ala Ser Gly Ala Asn Gly Asp Gly Ser Met Ser Gln Thr			
	290	295	300
Gln Ser Gly Ser Thr Val Lys Ala Thr Tyr Ala Thr Ser Asp Phe Thr			
305	310	315	320
Leu Leu Glu Leu Asn Asn Ala Ala Asn Pro Ala Phe Asn Leu Phe Trp			
	325	330	335
Ala Gly Trp Asp Arg Arg Asp Gln Asn Tyr Pro Gly Ala Ile Ala Ile			
	340	345	350
His His Pro Asn Val Ala Glu Lys Arg Ile Ser Asn Ser Thr Ser Pro			
	355	360	365
Thr Ser Phe Val Ala Trp Gly Gly Gly Ala Gly Thr Thr His Leu Asn			
	370	375	380

Val	Gln	Trp	Gln	Pro	Ser	Gly	Gly	Val	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly
385					390					395					400
Ser	Pro	Ile	Tyr	Ser	Pro	Glu	Lys	Arg	Val	Leu	Gly	Gln	Leu	His	Gly
				405					410					415	
Gly	Pro	Ser	Ser	Cys	Ser	Ala	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Ser	Asp	Gln	Tyr
				420				425					430		
Gly	Arg	Val	Phe	Thr	Ser	Trp	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Arg
				435				440					445		
Leu	Ser	Asp	Trp	Leu	Asp	Pro	Ala	Ser	Thr	Gly	Ala	Gln	Phe	Ile	Asp
				450				455					460		
Gly	Leu	Asp	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Pro	Asn	Thr	Pro	Pro	Val	Ala	Asn
465					470					475					480
Phe	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Gly	Leu	Thr	Ala	Thr	Phe	Thr	Asp	Ser	Ser
					485				490						495
Thr	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Ile	Ala	Ser	Arg	Ser	Trp	Asn	Phe	Gly	Asp
				500					505					510	
Gly	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Asn	Pro	Ser	Lys	Thr	Tyr	Ala	Ala	Ala
				515				520						525	
Gly	Thr	Tyr	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Val	Thr	Asp	Asn	Gly	Gly	Ala	Thr
				530				535						540	
Asn	Thr	Lys	Thr	Gly	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Pro	Gly	Ala	Gln
545					550					555					560
Thr	Tyr	Thr	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Ala	Ile	Pro	Asp	Asn	Ala	Thr	Val
				565					570					575	
Glu	Ser	Pro	Ile	Thr	Val	Ser	Gly	Arg	Thr	Gly	Asn	Gly	Ser	Ala	Thr
				580					585					590	
Thr	Pro	Ile	Gln	Val	Thr	Ile	Tyr	His	Thr	Tyr	Lys	Ser	Asp	Leu	Lys
				595				600						605	
Val	Asp	Leu	Val	Ala	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Tyr	Asn	Leu	His	Asn	Arg
				610				615						620	
Thr	Gly	Gly	Ser	Ala	His	Asn	Ile	Ile	Gln	Thr	Phe	Thr	Lys	Asp	Leu
625					630					635					640
Ser	Ser	Glu	Ala	Ala	Gln	Arg	Ala	Pro	Gly	Ser	Cys	Gly			
				645					650						

<210>5

<211>7

<212>PRT

<213> 大豆

<400>5

Tyr Ser Asn Lys Leu Gly Lys

1 5

<210>6

<211>7

<212>PRT

<213> 大豆

<400>6

Arg Phe Glu Thr Leu Phe Lys

1 5

<210>7

<211>8

<212>PRT

<213> 大豆

<400>7

Ser Pro Gln Leu Gln Leu Asn Arg

1 5

<210>8

<211>9

<212>PRT

<213> 大豆

<400>8

Ser Arg Asp Pro Ile Ser Tyr Asn Lys

1 5

<210>9

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>9

Ser Ser Glu Asp Lys Pro Phe Asn Leu Arg

1	5	10
---	---	----

<210>10

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>10

Ser Ser Glu Asp Glu Pro Phe Asn Leu Arg

1	5	10
---	---	----

<210>11

<211>12

<212>PRT

<213> 大豆

<400>11

Asn Phe Leu Ala Gly Glu Lys Asp Asn Val Val Arg

1	5	10
---	---	----

<210>12

<211>6

<212>PRT

<213> 大豆

<400>12

Asn Asn Asn Pro Phe Lys

1	5
---	---

<210>13

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>13

Leu Ser Ala Ala Glu Phe Gly Ser Leu Arg

1	5	10
---	---	----

<210>14

<211>12

<212>PRT

<213> 大豆

<400>14

Ser Gln Ser Asp Asn Phe Glu Tyr Val Ser Phe Lys

1

5

10

<210>15

<211>12

<212>PRT

<213> 大豆

<400>15

Pro Glu Glu Val Ile Gln His Thr Phe Asn Leu Lys

1

5

10

<210>16

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>16

Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Gln Glu Gln Glu Phe Leu Lys

1

5

10

<210>17

<211>14

<212>PRT

<213> 大豆

<400>17

Arg Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Gln Glu Gln Glu Phe Leu Lys

1

5

10

<210>18

<211>7

<212>PRT

<213> 大豆

<400>18

Pro Pro Lys Glu Ser Gln Arg

1

5

<210>19

<211>9

<212>PRT

<213> 大豆

<400>19

Leu Ser Ala Gln Phe Gly Ser Leu Arg

1

5

<210>20

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>20

Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Gln Glu Gln Glu Phe Leu Gln

1

5

10

<210>21

<211>7

<212>PRT

<213> 大豆

<400>21

Ser Lys Lys Thr Gln Pro Arg

1

5

<210>22

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>22

Pro Ser Glu Val Leu Ala His Ser Tyr Asn Leu Ala Arg

1	5	10
---	---	----

<210>23

<211>6

<212>PRT

<213> 大豆

<400>23

Ser Gly Asp Ala Leu Arg

1 5

<210>24

<211>6

<212>PRT

<213> 大豆

<400>24

Phe Glu Thr Leu Phe Lys

1 5

<210>25

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>25

Lys Thr Ile Ser Ser Glu Asp Lys Pro Phe Asn Leu Arg

1 5 10

<210>26

<211>8

<212>PRT

<213> 大豆

<400>26

Ser Pro Gln Leu Glu Asn Leu Arg

1 5

<210>27

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>27

Leu Ala Gly Glu Lys Asp Asn Val Val Arg

1 5 10

<210>28

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>28

Lys Thr Ile Ser Ser Glu Asp Glu Pro Phe Asn Leu Arg

1 5 10

<210>29

<211>12

<212>PRT

<213> 大豆

<400>29

Val Arg Glu Asp Glu Asn Asn Pro Phe Tyr Leu Arg

1 5 10

<210>30

<211>8

<212>PRT

<213> 大豆

<400>30

Pro Pro Gln Glu Ser Gln Lys Arg

1 5

<210>31

<211>9

<212>PRT

<213> 大豆

<400>31

Leu Asn Ala Leu Lys Pro Asp Asn Arg

1

5

<210>32

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>32

Val Phe Asp Gly Glu Leu Gln Glu Gly Arg

1

5

10

<210>33

<211>12

<212>PRT

<213> 大豆

<400>33

Pro Glu Glu Val Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Arg

1

5

10

<210>34

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>34

Ile Ser Thr Leu Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ala Leu Arg

1

5

10

<210>35

<211>16

<212>PRT

<213> 大豆

<400>35

Lys Gln Ile Val Thr Val Glu Gly Gly Leu Ser Val Ile Ser Pro Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210>36

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>36

Glu Gln Gln Glu Glu Gln Pro Leu Glu Val Arg

1	5	10
---	---	----

<210>37

<211>15

<212>PRT

<213> 大豆

<400>37

Leu Gln Glu Ser Val Ile Val Glu Ile Ser Lys Glu Gln Ile Arg

1	5	10	15
---	---	----	----

<210>38

<211>5

<212>PRT

<213> 大豆

<400>38

Ser Ser Ser Arg Lys

1	5
---	---

<210>39

<211>8

<212>PRT

<213> 大豆

<400>39

Phe Phe Glu Ile Thr Pro Glu Lys

1	5
---	---

<210>40

<211>15

<212>PRT

<213> 大豆

<400>40

Val Leu Phe Ser Arg Glu Glu Gly Gln Gln Gln Gly Glu Gln Arg

1

5

10

15

<210>41

<211>14

<212>PRT

<213> 大豆

<400>41

Leu Lys Val Arg Glu Asp Glu Asn Asn Pro Phe Tyr Leu Arg

1

5

10

<210>42

<211>4

<212>PRT

<213> 大豆

<400>42

Leu Leu Gln Arg

1

<210>43

<211>4

<212>PRT

<213> 大豆

<400>43

Phe Asn Lys Arg

1

<210>44

<211>4

<212>PRT

<213> 大豆

<400>44

Pro Asp Asn Arg

1

<210>45

<211>4

<212>PRT

<213> 大豆

<400>45

Thr Leu Asn Arg

1

<210>46

<211>4

<212>PRT

<213> 大豆

<400>46

Pro Gln Gln Arg

1

<210>47

<211>4

<212>PRT

<213> 大豆

<400>47

Tyr Asn Phe Arg

1

<210>48

<211>9

<212>PRT

<213> 大豆

<400>48

Pro Gln Asn Phe Val Val Ala Ala Arg

1

5

<210>49

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>49

Leu Ala Gly Asn Gln Glu Gln Glu Phe Leu Lys

1

5

10

<210>50

<211>5

<212>PRT

<213> 大豆

<400>50

Ser Gln Gln Ala Arg

1

5

<210>51

<211>7

<212>PRT

<213> 大豆

<400>51

Ala Asp Phe Tyr Asn Pro Lys

1

5

<210>52

<211>8

<212>PRT

<213> 大豆

<400>52

Met Ile Ile Ile Ala Gln Gly Lys

1

5

<210>53

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>53

Pro Glu Thr Met Gln Gln Gln Gln Gln Gln Lys

1

5

10

<210>54

<211>4

<212>PRT

<213> 大豆

<400>54

His Ser Glu Arg

1

<210>55

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>55

Tyr Glu Ala Gly Val Val Pro Pro Gly Ala Arg

1

5

10

<210>56

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>56

His His Leu Ala Glu Ala Ala Glu Tyr Val Gly Gln Lys

1

5

10

<210>57

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>57

Thr Lys Glu Val Gly Gln Asp Ile Gln Ser Lys

1 5 10

<210>58

<211>5

<212>PRT

<213> 大豆

<400>58

Leu Val Val Ser Lys

1 5

<210>59

<211>8

<212>PRT

<213> 大豆

<400>59

Asp Ala Met Asp Gly Trp Phe Arg

1 5

<210>60

<211>12

<212>PRT

<213> 大豆

<400>60

Thr Ile Ser Ser Glu Asp Glu Pro Phe Asn Leu Arg

1 5 10

<210>61

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>61

Phe Phe Glu Ile Thr Pro Glu Lys Asn Pro Gln Leu Arg

1	5	10
---	---	----

<210>62

<211>15

<212>PRT

<213> 大豆

<400>62

Ser Ser Asn Ser Phe Gln Thr Leu Phe Glu Asn Gln Asn Gly Arg

1	5	10	15
---	---	----	----

<210>63

<211>16

<212>PRT

<213> 大豆

<400>63

Gln Val Gln Glu Leu Ala Phe Pro Gly Ser Ala Gln Asp Val Glu Arg

1	5	10	15
---	---	----	----

<210>64

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>64

Gln Gln Gln Glu Glu Gln Pro Leu Glu Val Arg

1	5	10
---	---	----

<210>65

<211>12

<212>PRT

<213> 大豆

<400>65

Thr Ile Ser Ser Glu Asp Lys Pro Phe Asn Leu Arg

1	5	10
---	---	----

<210>66

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>66

Phe Leu Val Pro Pro Gln Glu Ser Gln Lys

1 5 10

<210>67

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>67

Phe Leu Val Pro Pro Gln Glu Ser Gln Lys Arg

1 5 10

<210>68

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>68

Val Leu Ile Val Pro Gln Asn Phe Val Val Ala Ala Arg

1 5 10

<210>69

<211>17

<212>PRT

<213> 大豆

<400>69

Arg Pro Ser Tyr Thr Asn Gly Pro Gln Glu Ile Tyr Ile Gln Gln Gly

1 5 10 15

Lys

<210>70

<211>23

<212>PRT

<213> 大豆

<400>70

Val Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Pro Asp Ile Glu Tyr Pro Glu Thr Met
1 5 10 15
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Lys
20

<210>71

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>71

Glu Ala Phe Gly Val Asn Met Gln Ile Val Arg
1 5 10

<210>72

<211>16

<212>PRT

<213> 大豆

<400>72

Asn Asn Asn Pro Phe Ser Phe Leu Val Pro Pro Gln Glu Ser Gln Arg
1 5 10 15

<210>73

<211>21

<212>PRT

<213> 大豆

<400>73

Asn Leu Gln Gly Glu Asn Glu Gly Glu Asp Gly Glu Asp Lys Gly Ala
1 5 10 15
Ile Val Thr Val Lys
20

<210>74

<211>23

<212>PRT

<213> 大豆

<400>74

Val Phe Asp Gly Glu Leu Gln Glu Gly Gly Val Leu Ile Val Pro Gln

1 5 10 15

Asn Phe Ala Val Ala Ala Lys

20

<210>75

<211>23

<212>PRT

<213> 大豆

<400>75

Gly Lys Gln Gln Glu Glu Glu Asn Glu Gly Ser Asn Ile Leu Ser Gly

1 5 10 15

Phe Ala Pro Glu Phe Leu Lys

20

<210>76

<211>9

<212>PRT

<213> 大豆

<400>76

Pro Gln Asn Phe Ala Val Ala Ala Lys

1 5

<210>77

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>77

Asn Gly Leu His Leu Pro Ser Tyr Ser Pro Tyr Pro Arg

1 5 10

<210>78

<211>14

<212>PRT

<213> 大豆

<400>78

Ala Ile Pro Ser Glu Val Leu Ala His Ser Tyr Asn Leu Arg

1 5 10

<210>79

<211>26

<212>PRT

<213> 大豆

<400>79

Trp Gln Glu Gln Gln Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Asp Glu

1 5 10 15

Asp Glu Gln Ile Pro Ser His Pro Pro Arg

20 25

<210>80

<211>22

<212>PRT

<213> 大豆

<400>80

Lys Gln Gly Gln His Gln Gln Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly Ser Val

1 5 10 15

Leu Ser Gly Phe Ser Lys

20

<210>81

<211>15

<212>PRT

<213> 大豆

<400>81

Leu Phe Asp Gln Gln Asn Glu Gly Ser Ile Phe Ala Ile Ser Arg

1 5 10 15

<210>82

<211>16

<212>PRT

<213> 大豆

<400>82

Leu Thr Glu Val Gly Pro Asp Asp Asp Glu Lys Ser Trp Leu Gln Arg

1

5

10

15

<210>83

<211>16

<212>PRT

<213> 大豆

<400>83

Thr Asn Arg Gly Pro Gly Gly Thr Ala Thr Ala His Asn Thr Arg Ala

1

5

10

15

<210>84

<211>17

<212>PRT

<213> 大豆

<400>84

His Gln Thr Ser Ala Met Pro Gly His Gly Thr Gly Gln Pro Thr Gly

1

5

10

15

His

<210>85

<211>6

<212>PRT

<213> 大豆

<400>85

Gly Tyr Leu Ala Asp Lys

1

5

<210>86

<211>6

<212>PRT

<213> 大豆

<400>86

Phe Gln Thr Leu Phe Glu

1

5

<210>87

<211>7

<212>PRT

<213> 大豆

<400>87

Pro Pro Gln Glu Ser Gln Lys

1

5

<210>88

<211>7

<212>PRT

<213> 大豆

<400>88

Pro Gln Glu Ser Gln Lys Arg

1

5

<210>89

<211>7

<212>PRT

<213> 大豆

<400>89

Asn Gln Tyr Gly Arg Ile Arg

1

5

<210>90

<211>8

<212>PRT

<213> 大豆

<400>90

Pro Glu Lys Asn Pro Gln Leu Arg

1

5

<210>91

<211>9

<212>PRT

<213> 大豆

<400>91

Glu Val Gly Gln Asp Ile Gln Ser Lys

1

5

<210>92

<211>9

<212>PRT

<213> 大豆

<400>92

Asp Tyr Gly Ser Tyr Ala Gln Gly Arg

1

5

<210>93

<211>9

<212>PRT

<213> 大豆

<400>93

Pro Pro Arg Tyr Glu Ala Gly Val Lys

1

5

<210>94

<211>9

<212>PRT

<213> 大豆

<400>94

Ala Pro Ser Ile Tyr His Ser Glu Arg

1

5

<210>95

<211>9

<212>PRT

<213> 大豆

<400>95

Phe Gly Val Asn Met Gln Ile Val Arg

1 5

<210>96

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>96

Ser Ser Asp Phe Leu Thr Tyr Gly Leu Lys

1 5 10

<210>97

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>97

Ala Phe Gly Val Asn Met Gln Ile Val Arg

1 5 10

<210>98

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>98

Asn Ile Leu Glu Ala Ser Tyr Asp Thr Lys

1 5 10

<210>99

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>99

Asn Pro Ile Tyr Ser Asn Asn Phe Gly Lys

1 5 10

<210>100

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>100

Gly Ile Gly Thr Ile Ile Ser Ser Pro Tyr Arg

1 5 10

<210>101

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>101

Glu Ser Tyr Phe Val Asp Ala Gln Pro Lys

1 5 10

<210>102

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>102

His Leu Ser Val Val His Pro Ile Tyr Lys

1 5 10

<210>103

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>103

Leu His Glu Asn Ile Ala Arg Pro Ser Arg

1 5 10

<210>104

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>104

Asn Lys Pro Leu Val Val Gln Phe Gln Lys

1 5 10

<210>105

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>105

Ala Lys Asp Tyr Gly Ser Tyr Ala Gln Gly Arg

1 5 10

<210>106

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>106

Thr His His Asn Ala Val Thr Ser Tyr Leu Lys

1 5 10

<210>107

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>107

Leu Ala Gly Asn Gln Glu Gln Glu Phe Leu Gln

1 5 10

<210>108

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>108

Asn Lys Asn Pro Phe Leu Phe Gly Ser Asn Arg

1 5 10

<210>109

<211>12

<212>PRT

<213> 大豆

<400>109

Ser Arg Asp Pro Ile Tyr Ser Asn Lys Leu Gly Lys

1 5 10

<210>110

<211>12

<212>PRT

<213> 大豆

<400>110

Ser Arg Asn Pro Ile Tyr Ser Asn Asn Phe Gly Lys

1 5 10

<210>111

<211>12

<212>PRT

<213> 大豆

<400>111

Tyr Leu Ala Gly Asn Gln Glu Gln Glu Phe Leu Lys

1 5 10

<210>112

<211>12

<212>PRT

<213> 大豆

<400>112

Pro Glu Phe Leu Glu His Ala Phe Val Val Asp Arg

1

5

10

<210>113

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>113

Pro Pro His Ser Val Gln Val His Thr Thr Thr His Arg

1

5

10

<210>114

<211>15

<212>PRT

<213> 大豆

<400>114

Gln Ile Val Thr Val Glu Gly Gly Leu Ser Val Ile Ser Pro Lys

1

5

10

15

<210>115

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>115

Leu Pro Glu Glu Val Ile Gln His Thr Phe Asn Leu Lys

1

5

10

<210>116

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>116

Phe Ser Arg Glu Glu Gly Gln Gln Gln Gly Glu Gln Arg

1 5 10

<210>117

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>117

Asn Gln Arg Glu Ser Tyr Phe Val Asp Ala Gln Pro Lys

1 5 10

<210>118

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>118

Leu Phe Glu Ile Thr Pro Glu Lys Asn Pro Gln Leu Arg

1 5 10

<210>119

<211>14

<212>PRT

<213> 大豆

<400>119

Gln Glu Ser Val Ile Val Glu Ile Ser Lys Glu Gln Ile Arg

1 5 10

<210>120

<211>14

<212>PRT

<213> 大豆

<400>120

His Leu Ala Glu Ala Ala Glu Tyr Val Gly Gln Lys Thr Lys

1 5 10

<210>121

<211>16

<212>PRT

<213> 大豆

<400>121

Ala Gly Arg Ile Ser Thr Leu Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ala Leu Arg

1

5

10

15

<210>122

<211>14

<212>PRT

<213> 大豆

<400>122

Phe Met Pro Glu Lys Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Glu Leu Arg

1

5

10

<210>123

<211>14

<212>PRT

<213> 大豆

<400>123

Pro Phe Ser Phe Leu Val Pro Pro Gln Glu Ser Gln Arg Arg

1

5

10

<210>124

<211>14

<212>PRT

<213> 大豆

<400>124

Leu Glu Ala Ser Tyr Asp Thr Lys Phe Glu Glu Ile Asn Lys

1

5

10

<210>125

<211>16

<212>PRT

<213> 大豆

<400>125

Leu Ala Arg Pro Val Leu Gly Gly Ser Ser Thr Phe Pro Tyr Pro Arg

1

5

10

15

<210>126

<211>16

<212>PRT

<213> 大豆

<400>126

Asn Glu Leu Asp Lys Gly Ile Gly Thr Ile Ile Ser Ser Pro Tyr Arg

1

5

10

15

<210>127

<211>15

<212>PRT

<213> 大豆

<400>127

Thr His His Asn Ala Val Ser Ser Tyr Ile Lys Asp Val Phe Arg

1

5

10

15

<210>128

<211>15

<212>PRT

<213> 大豆

<400>128

Thr His His Asn Ala Val Thr Ser Tyr Leu Lys Asp Val Phe Arg

1

5

10

15

<210>129

<211>15

<212>PRT

<213> 大豆

<400>129

Asn Pro Phe Leu Phe Gly Ser Asn Arg Phe Glu Thr Leu Phe Lys
1 5 10 15

<210>130

<211>16

<212>PRT

<213> 大豆

<400>130

His Phe Leu Ala Gln Ser Phe Asn Thr Asn Glu Asp Ile Ala Glu Lys
1 5 10 15

<210>131

<211>16

<212>PRT

<213> 大豆

<400>131

Asn Asn Asn Pro Phe Ser Phe Leu Val Pro Pro Lys Glu Ser Gln Arg
1 5 10 15

<210>132

<211>15

<212>PRT

<213> 大豆

<400>132

Leu Phe Leu Leu Asp His His Asp Pro Ile Met Pro Tyr Leu Arg
1 5 10 15

<210>133

<211>17

<212>PRT

<213> 大豆

<400>133

Ser Leu Ser Gln Ile Val Gln Pro Ala Phe Glu Ser Ala Phe Asp Leu
1 5 10 15

Lys

<210>134

<211>16

<212>PRT

<213> 大豆

<400>134

Asp Trp Val Phe Thr Asp Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg

1 5 10 15

<210>135

<211>18

<212>PRT

<213> 大豆

<400>135

Asn Leu Gln Gly Glu Asn Glu Gly Glu Asp Lys Gly Ala Ile Val Thr

1 5 10 15

Val Lys

<210>136

<211>16

<212>PRT

<213> 大豆

<400>136

Asn Ile Leu Glu Ala Ser Tyr Asp Thr Lys Phe Glu Glu Ile Asn Lys

1 5 10 15

<210>137

<211>18

<212>PRT

<213> 大豆

<400>137

Asn Leu Gln Gly Glu Asn Glu Glu Glu Asp Ser Gly Ala Ile Val Thr

1 5 10 15

Val Lys

<210>138

<211>15

<212>PRT

<213> 大豆

<400>138

Lys Glu Ser Phe Phe Phe Pro Phe Glu Leu Pro Arg Glu Glu Arg

1

5

10

15

<210>139

<211>17

<212>PRT

<213> 大豆

<400>139

Ser Ser Asn Ser Phe Gln Thr Leu Phe Glu Asn Gln Asn Gly Arg Ile

1

5

10

15

Arg

<210>140

<211>17

<212>PRT

<213> 大豆

<400>140

Asn Asn Asn Pro Phe Ser Phe Leu Val Pro Pro Gln Glu Ser Gln Arg

1

5

10

15

Arg

<210>141

<211>19

<212>PRT

<213> 大豆

<400>141

Ala Ile Pro Ser Glu Val Leu Ser Asn Ser Tyr Asn Leu Gly Gln Ser

1

5

10

15

Gln Val Arg

<210>142

<211>18

<212>PRT

<213> 大豆

<400>142

His Phe Leu Ala Gln Ser Phe Asn Thr Asn Glu Asp Thr Ala Glu Lys

1 5 10 15

Leu Arg

<210>143

<211>19

<212>PRT

<213> 大豆

<400>143

Gln Val Gln Glu Leu Ala Phe Pro Gly Ser Ala Gln Asp Val Glu Arg

1 5 10 15

Leu Leu Lys

<210>144

<211>19

<212>PRT

<213> 大豆

<400>144

Val Pro Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Val Val Asn Pro Asp Asn Asn Glu

1 5 10 15

Asn Leu Arg

<210>145

<211>19

<212>PRT

<213> 大豆

<400>145

Ile Pro Ala Gly Thr Thr Tyr Tyr Leu Val Asn Pro His Asp His Gln

1 5 10 15

Asn Leu Lys

<210>146

<211>20

<212>PRT

<213> 大豆

<400>146

Gln Glu Glu Glu Asn Glu Gly Ser Asn Ile Leu Ser Gly Phe Ala Pro

1 5 10 15

Glu Phe Leu Lys

20

<210>147

<211>21

<212>PRT

<213> 大豆

<400>147

Lys Gln Gly Gln His Gln Gln Gln Glu Glu Glu Gly Gly Ser Val Leu

1 5 10 15

Ser Gly Phe Ser Lys

20

<210>148

<211>22

<212>PRT

<213> 大豆

<400>148

Asn Leu Gln Gly Glu Asn Glu Glu Glu Asp Ser Gly Ala Ile Val Thr

1 5 10 15

Val Lys Gly Gly Leu Arg

20

<210>149

<211>21

<212>PRT

<213> 大豆

<400>149

Ser Val Ser Gln Asn Val Leu Pro Leu Leu Gln Ser Ala Phe Asp Leu
1 5 10 15
Asn Phe Thr Pro Arg
20

<210>150

<211>20

<212>PRT

<213> 大豆

<400>150

Gln Val Lys Asn Asn Asn Pro Phe Ser Phe Leu Val Pro Pro Gln Glu
1 5 10 15
Ser Gln Arg Arg
20

<210>151

<211>21

<212>PRT

<213> 大豆

<400>151

Gln Val Lys Asn Asn Asn Pro Phe Ser Phe Leu Val Pro Pro Gln Glu
1 5 10 15
Ser Gln Arg Arg Ala
20

<210>152

<211>22

<212>PRT

<213> 大豆

<400>152

Asn Ala Met Phe Val Pro His Tyr Thr Leu Asn Ala Asn Ser Ile Ile
1 5 10 15
Tyr Ala Leu Asn Gly Arg
20

<210>153

<211>23

<212>PRT

<213> 大豆

<400>153

Thr Pro Val Val Ala Val Ser Ile Ile Asp Thr Asn Ser Leu Glu Asn

1 5 10 15

Gln Leu Asp Gln Met Pro Arg

20

<210>154

<211>23

<212>PRT

<213> 大豆

<400>154

Val Phe Asp Gly Glu Leu Gln Glu Gly Arg Val Leu Ile Val Pro Gln

1 5 10 15

Asn Phe Val Val Ala Ala Arg

20

<210>155

<211>23

<212>PRT

<213> 大豆

<400>155

Glu Pro Val Val Ala Ile Ser Leu Leu Asp Thr Ser Asn Phe Asn Asn

1 5 10 15

Gln Leu Asp Gln Thr Pro Arg

20

<210>156

<211>23

<212>PRT

<213> 大豆

<400>156

Lys Asn Ala Met Phe Val Pro His Tyr Thr Leu Asn Ala Asn Ser Ile
1 5 10 15
Ile Tyr Ala Leu Asn Gly Arg
20

<210>157

<211>24

<212>PRT

<213> 大豆

<400>157

Asp Leu Asp Ile Phe Leu Ser Ile Val Asp Met Asn Glu Gly Ala Leu
1 5 10 15
Leu Leu Pro His Phe Asn Ser Lys
20

<210>158

<211>23

<212>PRT

<213> 大豆

<400>158

Val Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Pro Asp Ile Glu His Pro Glu Thr Met
1 5 10 15
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Lys
20

<210>159

<211>24

<212>PRT

<213> 大豆

<400>159

His Phe Leu Ala Gln Ser Phe Asn Thr Asn Glu Asp Ile Ala Glu Lys
1 5 10 15
Leu Gln Ser Pro Asp Asp Glu Arg
20

<210>160

<211>27

<212>PRT

<213> 大豆

<400>160

Leu Val Phe Cys Pro Gln Gln Ala Glu Asp Asp Lys Cys Gly Asp Ile

1 5 10 15

Gly Ile Ser Ile Asp His Asp Asp Gly Thr Arg

20 25

<210>161

<211>25

<212>PRT

<213> 大豆

<400>161

Ser Gln Gln Ala Arg Gln Val Lys Asn Asn Asn Pro Phe Ser Phe Leu

1 5 10 15

Val Pro Pro Gln Glu Ser Gln Arg Arg

20 25

<210>162

<211>25

<212>PRT

<213> 大豆

<400>162

Val Leu Phe Gly Glu Glu Glu Glu Gln Arg Gln Gln Glu Gly Val Ile

1 5 10 15

Val Glu Leu Ser Lys Glu Gln Ile Arg

20 25

<210>163

<211>29

<212>PRT

<213> 大豆

<400>163

Asn Leu Gln Gly Glu Asn Glu Glu Glu Asp Ser Gly Ala Ile Val Thr
1 5 10 15
Val Lys Gly Gly Leu Arg Val Thr Ala Pro Ala Met Arg
 20 25

<210>164

<211>28

<212>PRT

<213> 大豆

<400>164

Val Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Pro Asp Ile Glu Tyr Pro Glu Thr Met
1 5 10 15
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Lys Ser His Gly Gly Arg
 20 25

<210>165

<211>30

<212>PRT

<213> 大豆

<400>165

Asp Phe Val Leu Asp Asn Glu Gly Asn Pro Leu Glu Asn Gly Gly Thr
1 5 10 15
Tyr Tyr Ile Leu Ser Asp Ile Thr Ala Phe Gly Gly Ile Arg
 20 25 30

<210>166

<211>29

<212>PRT

<213> 大豆

<400>166

His Gln Gln Glu Glu Glu Asn Glu Gly Gly Ser Ile Leu Ser Gly Phe
1 5 10 15
Thr Leu Glu Phe Leu Glu His Ala Phe Ser Val Asp Lys
 20 25

<210>167

<211>29

<212>PRT

<213> 大豆

<400>167

Arg Gln Gln Glu Glu Glu Asn Glu Gly Gly Ser Ile Leu Ser Gly Phe
1 5 10 15
Ala Pro Glu Phe Leu Glu His Ala Phe Val Val Asp Arg
 20 25

<210>168

<211>32

<212>PRT

<213> 大豆

<400>168

Thr Asn Asp Thr Pro Met Ile Gly Thr Leu Ala Gly Ala Asn Ser Leu
1 5 10 15
Leu Asn Ala Leu Pro Glu Glu Val Ile Gln His Thr Phe Asn Leu Lys
 20 25 30

<210>169

<211>34

<212>PRT

<213> 大豆

<400>169

His Asn Ile Gly Gln Thr Ser Ser Pro Asp Ile Tyr Asn Pro Gln Ala
1 5 10 15
Gly Ser Val Thr Thr Ala Thr Ser Leu Asp Phe Pro Ala Leu Ser Trp
 20 25 30
Leu Arg

<210>170

<211>33

<212>PRT

<213> 大豆

<400>170

His Gln Gln Glu Glu Glu Asn Glu Gly Gly Ser Ile Leu Ser Gly Phe
1 5 10 15
Thr Leu Glu Phe Leu Glu His Ala Phe Ser Val Asp Lys Gln Ile Ala
 20 25 30
Lys

<210>171

<211>35

<212>PRT

<213> 大豆

<400>171

Asn Phe Leu Ala Gly Ser Gln Asp Asn Val Ile Ser Gln Ile Pro Ser
1 5 10 15
Gln Val Gln Glu Leu Ala Phe Pro Gly Ser Ala Gln Ala Val Glu Lys
 20 25 30
Leu Leu Lys
 35

<210>172

<211>34

<212>PRT

<213> 大豆

<400>172

Met Ile Thr Leu Ala Ile Pro Val Asn Lys Pro Gly Arg Phe Glu Ser
1 5 10 15
Phe Phe Leu Ser Ser Thr Gln Ala Gln Gln Ser Tyr Leu Gln Gly Phe
 20 25 30
Ser Lys

<210>173

<211>45

<212>PRT

<213> 大豆

<400>173

Phe Arg Glu Gly Asp Leu Ile Ala Val Pro Thr Gly Val Ala Trp Trp
1 5 10 15

Met Tyr Asn Asn Glu Asp Thr Pro Val Val Ala Val Ser Ile Ile Asp
20 25 30
Thr Asn Ser Leu Glu Asn Gln Leu Asp Gln Met Pro Arg
35 40 45

<210>174

<211>11

<212>PRT

<213> 大豆

<400>174

Glu Ala Phe Gly Val Asn Met Gln Ile Val Arg
1 5 10

<210>175

<211>12

<212>PRT

<213> 大豆

<400>175

Ile Ser Pro Leu Pro Val Leu Lys Glu Ile Phe Arg
1 5 10

<210>176

<211>15

<212>PRT

<213> 大豆

<400>176

Tyr Glu Ala Gly Val Val Pro Pro Ala Arg Phe Glu Ala Pro Arg
1 5 10 15

<210>177

<211>22

<212>PRT

<213> 大豆

<400>177

Asn Ala Met Phe Val Pro His Tyr Asn Leu Asn Ala Asn Ser Ile Ile

1	5	10	15
Tyr Ala Leu Asn Gly Arg			
20			

<210>178

<211>10

<212>PRT

<213> 牛

<400>178

Tyr Ile Pro Ile Gln Tyr Val Leu Ser Arg

1	5	10
---	---	----

<210>179

<211>10

<212>PRT

<213> 牛

<400>179

Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu Gln Leu Leu Arg

1	5	10
---	---	----

<210>180

<211>11

<212>PRT

<213> 牛

<400>180

His Ile Gln Lys Glu Asp Val Pro Ser Glu Arg

1	5	10
---	---	----

<210>181

<211>12

<212>PRT

<213> 牛

<400>181

Phe Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val Phe Gly Lys

1	5	10
---	---	----

<210>182

<211>13

<212>PRT

<213> 牛

<400>182

Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val Phe Gly Lys Glu Lys

1 5 10

<210>183

<211>13

<212>PRT

<213> 牛

<400>183

His Pro His Leu Ser Phe Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys

1 5 10

<210>184

<211>12

<212>PRT

<213> 牛

<400>184

Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu Gln Leu Leu Arg Leu Lys

1 5 10

<210>185

<211>13

<212>PRT

<213> 牛

<400>185

Ile Ala Lys Tyr Ile Pro Ile Gln Tyr Val Leu Ser Arg

1 5 10

<210>186

<211>14

<212>PRT

<213> 牛

<400>186

His Pro His Pro His Leu Ser Phe Met Ala Ile Pro Pro Lys

1

5

10

<210>187

<211>14

<212>PRT

<213> 牛

<400>187

Phe Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val Phe Gly Lys Glu Lys

1

5

10

<210>188

<211>15

<212>PRT

<213> 牛

<400>188

His Pro His Pro His Leu Ser Phe Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys

1

5

10

15

<210>189

<211>15

<212>PRT

<213> 牛

<400>189

His Gln Gly Leu Pro Gln Glu Val Leu Asn Glu Asn Leu Leu Arg

1

5

10

15

<210>190

<211>18

<212>PRT

<213> 牛

<400>190

Ser Pro Ala Gln Ile Leu Gln Trp Gln Val Leu Ser Asn Thr Val Pro

1 5 10 15

Ala Lys

<210>191

<211>19

<212>PRT

<213> 牛

<400>191

His Pro His Pro His Leu Ser Phe Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn

1 5 10 15

Gln Asp Lys

<210>192

<211>19

<212>PRT

<213> 牛

<400>192

His Pro Ile Lys His Gln Gly Leu Pro Gln Glu Val Leu Asn Glu Asn

1 5 10 15

Leu Leu Arg

<210>193

<211>22

<212>PRT

<213> 牛

<400>193

Arg Pro Lys His Pro Ile Lys His Gln Gly Leu Pro Gln Glu Val Leu

1 5 10 15

Asn Glu Asn Leu Leu Arg

20

<210>194

<211>27

<212>PRT

<213> 牛

<400>194

Tyr Tyr Gln Gln Lys Pro Val Ala Leu Ile Asn Asn Gln Phe Leu Pro
1 5 10 15
Tyr Pro Tyr Tyr Ala Lys Pro Ala Ala Val Arg
20 25

<210>195

<211>32

<212>PRT

<213> 牛

<400>195

Leu His Ser Met Lys Glu Gly Ile His Ala Gln Gln Lys Glu Pro Met
1 5 10 15
Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu Ala Tyr Phe Tyr Pro Glu Leu Phe Arg
20 25 30

<210>196

<211>34

<212>PRT

<213> 牛

<400>196

Leu Ile Thr Leu Ala Ile Pro Val Asn Lys Pro Gly Arg Phe Glu Ser
1 5 10 15
Phe Phe Leu Ser Ser Thr Glu Ala Gln Gln Ser Tyr Leu Gln Gly Phe
20 25 30
Ser Arg

<210>197

<211>34

<212>PRT

<213> 牛

<400>197

Tyr Pro Ser Tyr Gly Leu Asn Tyr Tyr Gln Gln Lys Pro Val Ala Leu
1 5 10 15

Ile Asn Asn Gln Phe Leu Pro Tyr Pro Tyr Tyr Ala Lys Pro Ala Ala
20 25 30

Val Arg

<210>198

<211>8

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>198

Gln Thr Ala Thr His Leu Pro Arg

1 5

<210>199

<211>8

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>199

Leu Gln Asn Gln Gln Val Asn Arg

1 5

<210>200

<211>9

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>200

Tyr Gln Thr Ala Thr His Leu Pro Arg

1 5

<210>201

<211>10

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>201

Gly Pro Phe Gln Val Val Arg Pro Pro Leu

1 5 10

<210>202

<211>11

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>202

Met Ala Asp Ala Val Gly Tyr Ala Gly Gln Lys

1

5

10

<210>203

<211>9

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>203

Glu Phe Gln Gln Ala Gln His Leu Arg

1

5

<210>204

<211>9

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>204

Asn Asn Phe Glu Trp Ile Ser Phe Lys

1

5

<210>205

<211>11

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>205

Gly Ala Ser Lys Ala Val Lys Gln Gln Ile Arg

1

5

10

<210>206

<211>11

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>206

Val Gln Gly Gln Phe Gly Val Ile Arg Pro Pro

1 5 10

<210>207

<211>10

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>207

Ile Tyr Gln Thr Ala Thr His Leu Pro Arg

1 5 10

<210>208

<211>13

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>208

Met Ala Asp Ala Val Gly Tyr Ala Gly Gln Lys Gly Lys

1 5 10

<210>209

<211>12

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>209

Val Gln Gly Pro Phe Ser Val Ile Arg Pro Pro Leu

1 5 10

<210>210

<211>12

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>210

Val Gln Gly Gln Phe Gly Val Ile Arg Pro Pro Leu
1 5 10

<210>211

<211>12

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>211

Gly Leu Tyr Leu Pro Ser Phe Phe Ser Thr Ala Lys
1 5 10

<210>212

<211>13

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>212

Thr Asn Ala Asn Ala Gln Ile Asn Thr Leu Ala Gly Arg
1 5 10

<210>213

<211>13

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>213

Ile Ser Tyr Val Val Gln Gly Met Gly Ile Ser Gly Arg
1 5 10

<210>214

<211>13

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>214

Asn Ile Leu Asn Gly Phe Thr Pro Glu Val Leu Ala Lys
1 5 10

<210>215

<211>12

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>215

Thr Ala Gln Gln Leu Gln Asn Gln Gln Asp Asn Arg

1 5 10

<210>216

<211>14

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>216

Arg Met Ala Asp Ala Val Gly Tyr Ala Gly Gln Lys Gly Lys

1 5 10

<210>217

<211>12

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>217

Ala Thr Ser Gln Gln Phe Gln Trp Ile Glu Phe Lys

1 5 10

<210>218

<211>14

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>218

Ala Gly Asn Asn Pro Gln Gly Gln Gln Trp Leu Gln Gly Arg

1 5 10

<210>219

<211>15

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>219

Gly Gln Leu Leu Val Val Pro Gln Gly Phe Ala Val Val Lys Arg
1 5 10 15

<210>220

<211>15

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>220

Thr Leu Leu Phe Gly Glu Lys Pro Val Thr Val Phe Gly Ile Arg
1 5 10 15

<210>221

<211>16

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>221

Leu Leu Ala Gly Asn Asn Pro Gln Gly Gln Gln Trp Leu Gln Gly Arg
1 5 10 15

<210>222

<211>16

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>222

Val Thr Ser Val Asn Ser Tyr Thr Leu Pro Ile Leu Gln Tyr Ile Arg
1 5 10 15

<210>223

<211>15

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>223

Met Asn Gln Phe Phe His Gly Trp Tyr Met Glu Pro Leu Thr Lys
1 5 10 15

<210>224

<211>17

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>224

Thr Ala Gln Gln Leu Gln Asn Gln Gln Asp Asn Arg Gly Asn Ile Val
1 5 10 15
Arg

<210>225

<211>18

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>225

Pro Phe Leu Leu Ala Gly Asn Asn Pro Gln Gly Gln Gln Trp Leu Gln
1 5 10 15
Gly Arg

<210>226

<211>19

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>226

Phe Gly Ile Val Glu Gly Leu Met Thr Thr Val His Ser Ile Thr Ala
1 5 10 15
Thr Gln Lys

<210>227

<211>19

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>227

Gly Leu Pro Leu Glu Val Ile Ser Asn Gly Tyr Gln Ile Ser Pro Gln
1 5 10 15
Glu Ala Arg

<210>228

<211>18

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>228

Trp Phe Leu Pro Phe Asp Glu Ser Asp Pro Ala Ser Ile Glu Ala Ala
1 5 10 15
Glu Arg

<210>229

<211>19

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>229

Gly Leu Pro Leu Glu Val Ile Ser Asn Gly Tyr Gln Ile Ser Leu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Arg

<210>230

<211>19

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>230

Ala Leu Pro Leu Glu Val Ile Thr Asn Ala Phe Gln Ile Ser Leu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Arg

<210>231

<211>19

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>231

Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gly Gln Gln Leu Gln His Glu
1 5 10 15
Ile Ser Arg

<210>232

<211>21

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>232

Asn Phe Gly Lys Asp Phe Ile Phe Gly Val Ala Ser Ser Ala Tyr Gln
1 5 10 15
Ile Glu Gly Gly Arg
20

<210>233

<211>20

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>233

Ala Leu Pro Leu Glu Val Ile Thr Asn Ala Phe Gln Ile Ser Leu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Arg Arg
20

<210>234

<211>20

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>234

Thr His Glu Asn Ile Asp Asp Pro Ala Arg Ala Asp Val Tyr Lys Pro
1 5 10 15
Asn Leu Gly Arg
20

<210>235

<211>21

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>235

Phe Asn Thr Ile Glu Thr Thr Leu Thr His Ser Ser Gly Pro Ala Ser
1 5 10 15
Tyr Gly Arg Pro Arg
 20

<210>236

<211>21

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>236

Asn Leu Arg Pro Phe Leu Leu Ala Gly Asn Asn Pro Gln Gly Gln Gln
1 5 10 15
Trp Leu Gln Gly Arg
 20

<210>237

<211>23

<212>PRT

<213> 芥菜

<400>237

Val Phe Asp Gln Glu Ile Ser Lys Gly Gln Leu Leu Val Val Pro Gln
1 5 10 15
Gly Phe Ala Val Val Lys Arg
 20

<210>238

<211>9

<212>PRT

<213> 玉米

<400>238

Val Ala Val Leu Glu Ala Asn Pro Arg

1 5

<210>239

<211>8

<212>PRT

<213> 玉米

<400>239

Arg Pro Tyr Val Phe Asp Arg Arg

1 5

<210>240

<211>10

<212>PRT

<213> 玉米

<400>240

His Gly Gln Asp Lys Gly Ile Ile Val Arg

1 5 10

<210>241

<211>12

<212>PRT

<213> 玉米

<400>241

Ala Ile Gly Phe Asp Gly Leu Gly Asp Pro Gly Arg

1 5 10

<210>242

<211>10

<212>PRT

<213> 玉米

<400>242

Val Leu Arg Pro Phe Asp Glu Val Ser Arg

1 5 10

<210>243

<211>11

<212>PRT

<213> 玉米

<400>243

Asn Pro Glu Ser Phe Leu Ser Ser Phe Ser Lys

1 5 10

<210>244

<211>12

<212>PRT

<213> 玉米

<400>244

Val Phe Leu Ala Gly Ala Asp Asn Val Leu Gln Lys

1 5 10

<210>245

<211>12

<212>PRT

<213> 玉米

<400>245

Asp Ile Gly Phe Asn Gly Leu Ala Asp Pro Asn Arg

1 5 10

<210>246

<211>11

<212>PRT

<213> 玉米

<400>246

Asn Ala Leu Glu Asn Tyr Ala Tyr Asn Met Arg

1 5 10

<210>247

<211>14

<212>PRT

<213> 玉米

<400>247

Val Pro Thr Val Asp Val Ser Val Val Asp Leu Thr Val Arg

1 5 10

<210>248

<211>13

<212>PRT

<213> 玉米

<400>248

Gln Ile Ser Trp Asn Tyr Asn Tyr Gly Pro Ala Gly Arg

1 5 10

<210>249

<211>12

<212>PRT

<213> 玉米

<400>249

Ala Arg Phe Glu Glu Leu Asn Met Asp Leu Phe Arg

1 5 10

<210>250

<211>14

<212>PRT

<213> 玉米

<400>250

Arg Glu Gln Leu Gly Gln Gln Gly Tyr Ser Glu Met Gly Lys

1 5 10

<210>251

<211>15

<212>PRT

<213> 玉米

<400>251

Thr Leu Leu Phe Gly Asp Lys Pro Val Thr Val Phe Gly Ile Arg

1	5	10	15
---	---	----	----

<210>252

<211>15

<212>PRT

<213> 玉米

<400>252

Arg Glu Gln Leu Gly Gln Gln Gly Tyr Ser Glu Met Gly Lys Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210>253

<211>16

<212>PRT

<213> 玉米

<400>253

Gly Pro Leu Gln Ile Ser Trp Asn Tyr Asn Tyr Gly Pro Ala Gly Arg

1	5	10	15
---	---	----	----

<210>254

<211>18

<212>PRT

<213> 玉米

<400>254

Ala Leu Ser Phe Ala Ser Lys Ala Glu Glu Val Asp Glu Val Leu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Arg

<210>255

<211>19

<212>PRT

<213> 玉米

<400>255

Ala Val Gly Lys Val Leu Pro Asp Leu Asn Gly Lys Leu Thr Gly Met

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Phe Arg

<210>256

<211>19

<212>PRT

<213> 玉米

<400>256

Ala Leu Ser Phe Ala Ser Lys Ala Glu Glu Val Asp Glu Val Leu Gly
1 5 10 15
Ser Arg Arg

<210>257

<211>21

<212>PRT

<213> 玉米

<400>257

Leu Ser Pro Gly Thr Ala Phe Val Val Pro Ala Gly His Pro Phe Val
1 5 10 15
Ala Val Ala Ser Arg
20

<210>258

<211>19

<212>PRT

<213> 玉米

<400>258

Asp Gln Arg Pro Ser Ile Ala Asn Gln His Gly Gln Leu Tyr Glu Ala
1 5 10 15
Asp Ala Arg

<210>259

<211>23

<212>PRT

<213> 玉米

<400>259

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Thr Ala Phe Val Val Pro Ala Gly His Pro

1	5	10	15
Phe Val Ala Val Ala Ser Arg			
	20		

<210>260

<211>21

<212>PRT

<213> 玉米

<400>260

Arg His Ala Ser Glu Gly Gly His Gly Pro His Trp Pro Leu Pro Pro			
1	5	10	15
Phe Gly Glu Ser Arg			
	20		

<210>261

<211>20

<212>PRT

<213> 玉米

<400>261

Tyr Tyr Gly Arg Gly Pro Leu Gln Ile Ser Trp Asn Tyr Asn Tyr Gly			
1	5	10	15
Pro Ala Gly Arg			
	20		

<210>262

<211>8

<212>PRT

<213> 小麦属

<400>262

Trp Ser Thr Gly Leu Gln Met Arg	
1	5

<210>263

<211>10

<212>PRT

<213> 小麦属

<400>263

Gln Val Val Asp Gln Gln Leu Ala Gly Arg

1 5 10

<210>264

<211>10

<212>PRT

<213> 小麦属

<400>264

Gln Tyr Glu Gln Thr Val Val Pro Pro Lys

1 5 10

<210>265

<211>17

<212>PRT

<213> 小麦属

<400>265

Gln Gly Gln Gln Gly Tyr Tyr Pro Thr Ser Pro Gln His Thr Gly Gln

1 5 10 15

Arg

<210>266

<211>20

<212>PRT

<213> 小麦属

<400>266

Gln Val Val Asp Gln Gln Leu Ala Gly Arg Leu Pro Trp Ser Thr Gly

1 5 10 15

Leu Gln Met Arg

20

<210>267

<211>22

<212>PRT

<213> 小麦属

<400>267

Gln Gly Tyr Asp Ser Pro Tyr His Val Ser Ala Glu Gln Gln Ala Ala
1 5 10 15
Ser Pro Met Val Ala Lys
20

<210>268

<211>29

<212>PRT

<213> 小麦属

<400>268

Ser Leu Gln Gln Pro Gly Gln Gly Gln Gln Ile Gly Gln Gly Gln Gln
1 5 10 15
Gly Tyr Tyr Pro Thr Ser Pro Gln His Thr Gly Gln Arg
20 25

<210>269

<211>35

<212>PRT

<213> 小麦属

<400>269

Gln Gly Tyr Tyr Pro Thr Ser Leu Gln Gln Pro Gly Gln Gly Gln Gln
1 5 10 15
Ile Gly Gln Gly Gln Gln Gly Tyr Tyr Pro Thr Ser Pro Gln His Thr
20 25 30
Gly Gln Arg
35

<210>270

<211>10

<212>PRT

<213> 大豆

<400>270

Leu Ser Ala Glu Phe Gly Ser Leu Arg Lys
1 5 10

<210>271

<211>13

<212>PRT

<213> 大豆

<400>271

Ile Gly Glu Asn Lys Asp Ala Met Asp Gly Trp Phe Arg

1 5 10

<210>272

<211>23

<212>PRT

<213> 大豆

<400>272

Lys Asn Ala Met Phe Val Pro His Tyr Asn Leu Asn Ala Asn Ser Ile

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Leu Asn Gly Arg

20

<210>273

<211>32

<212>PRT

<213> 大豆

<400>273

Thr Asn Asp Arg Pro Ser Ile Gly Asn Leu Ala Gly Ala Asn Ser Leu

1 5 10 15

Leu Asn Ala Leu Pro Glu Glu Val Ile Gln His Thr Phe Asn Leu Lys

20 25 30

<210>274

<211>32

<212>PRT

<213> 大豆

<400>274

Thr Asn Asp Arg Pro Ser Ile Gly Asn Leu Ala Gly Ala Asn Ser Leu

1	5				10				15						
Leu	Asn	Ala	Leu	Pro	Glu	Glu	Val	Ile	Gln	Gln	Thr	Phe	Asn	Leu	Arg
20				25				30							

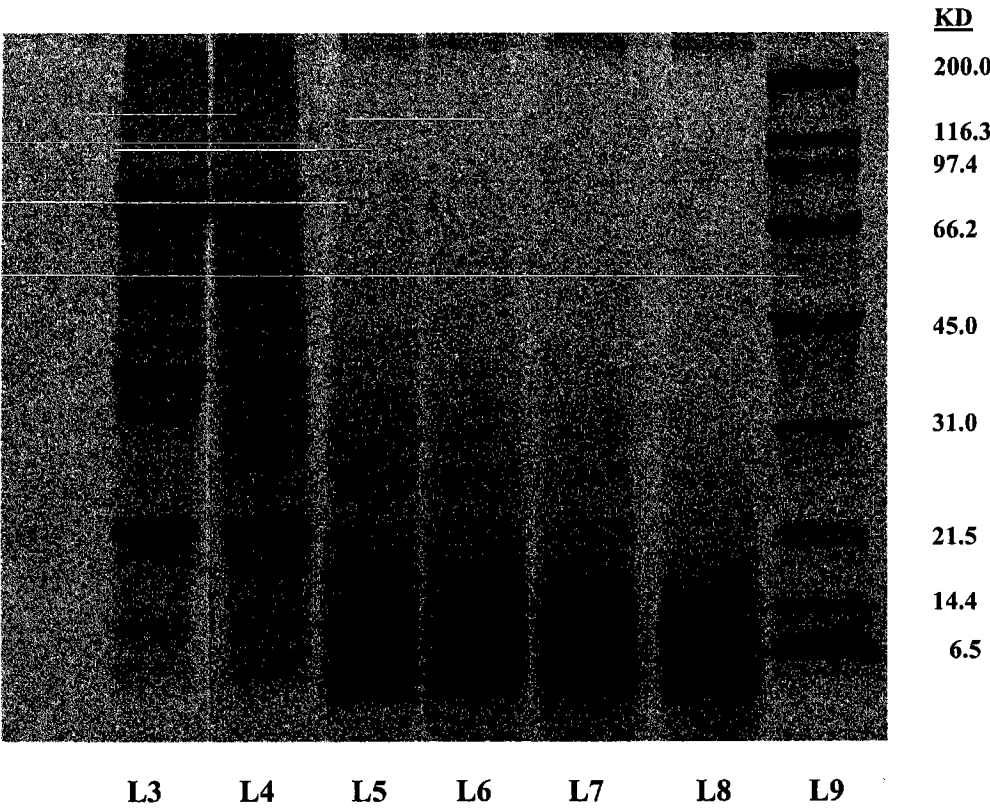


图 1

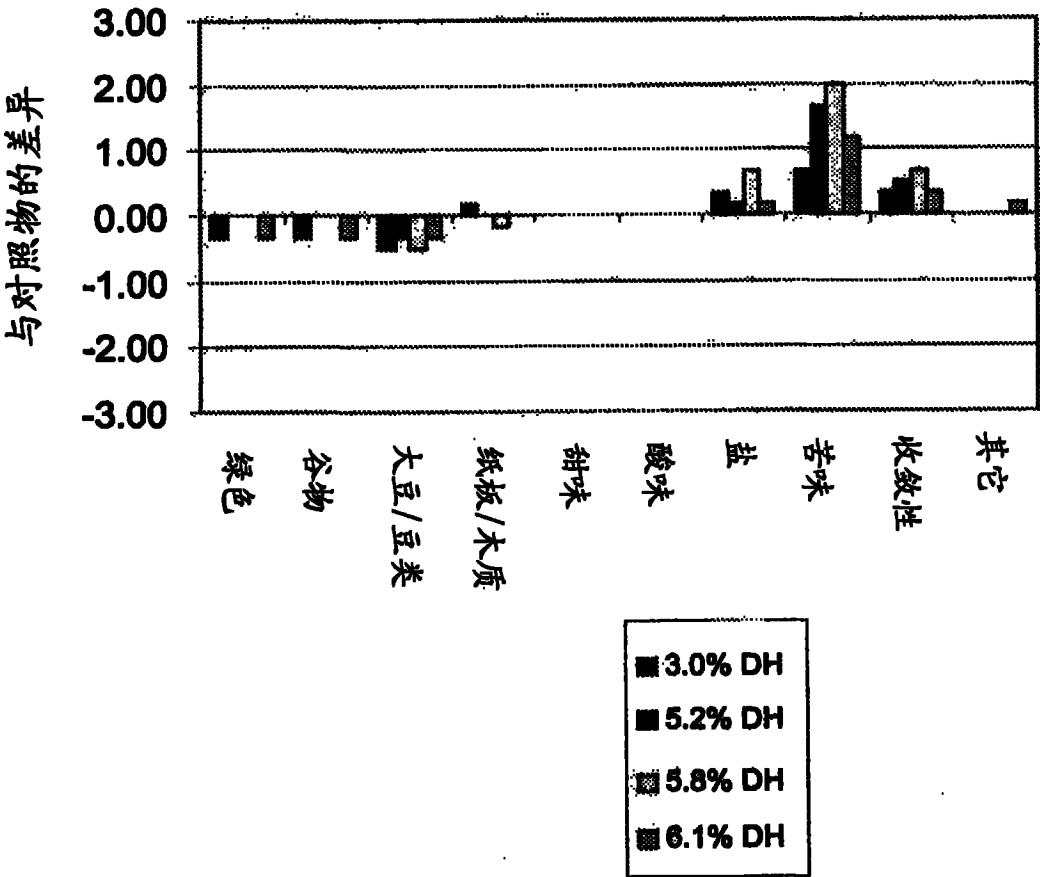


图 2

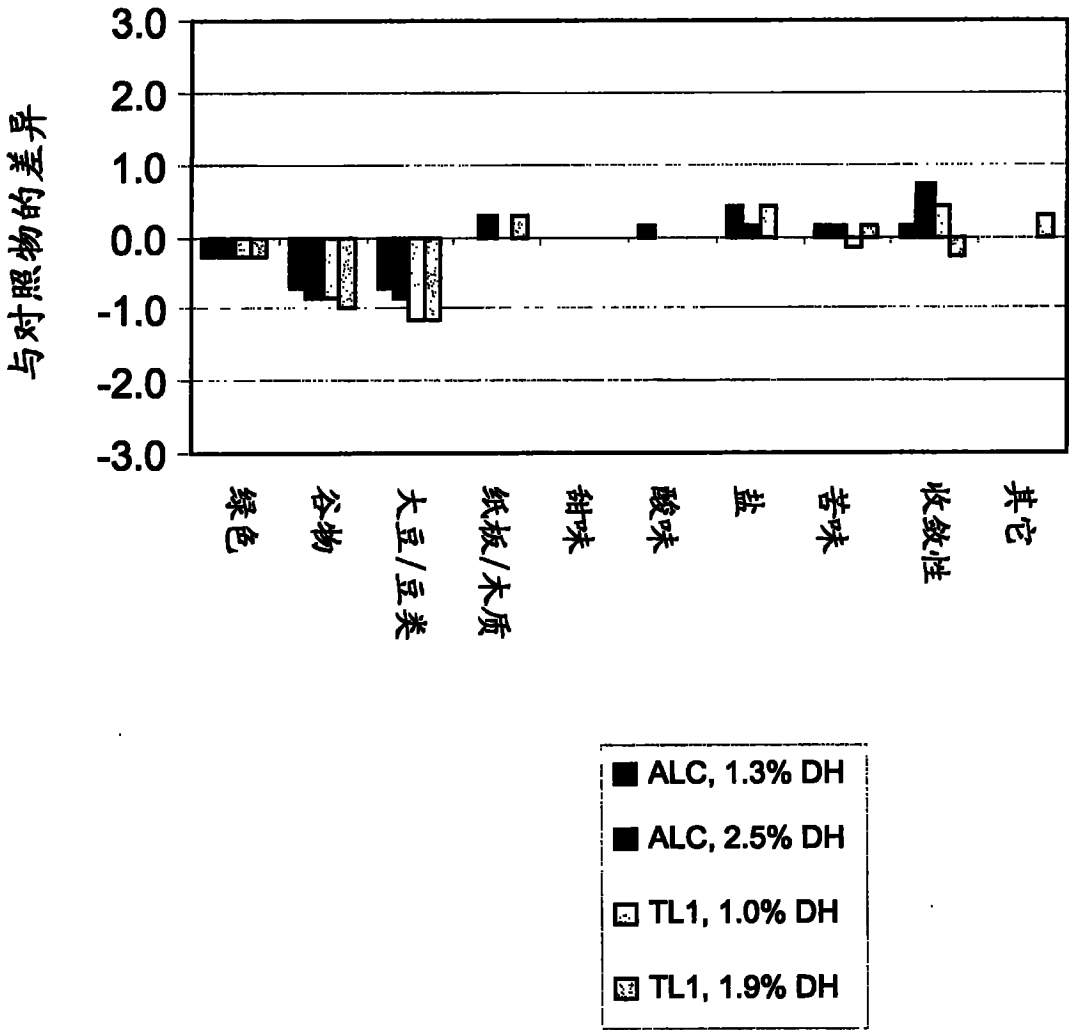


图 2A

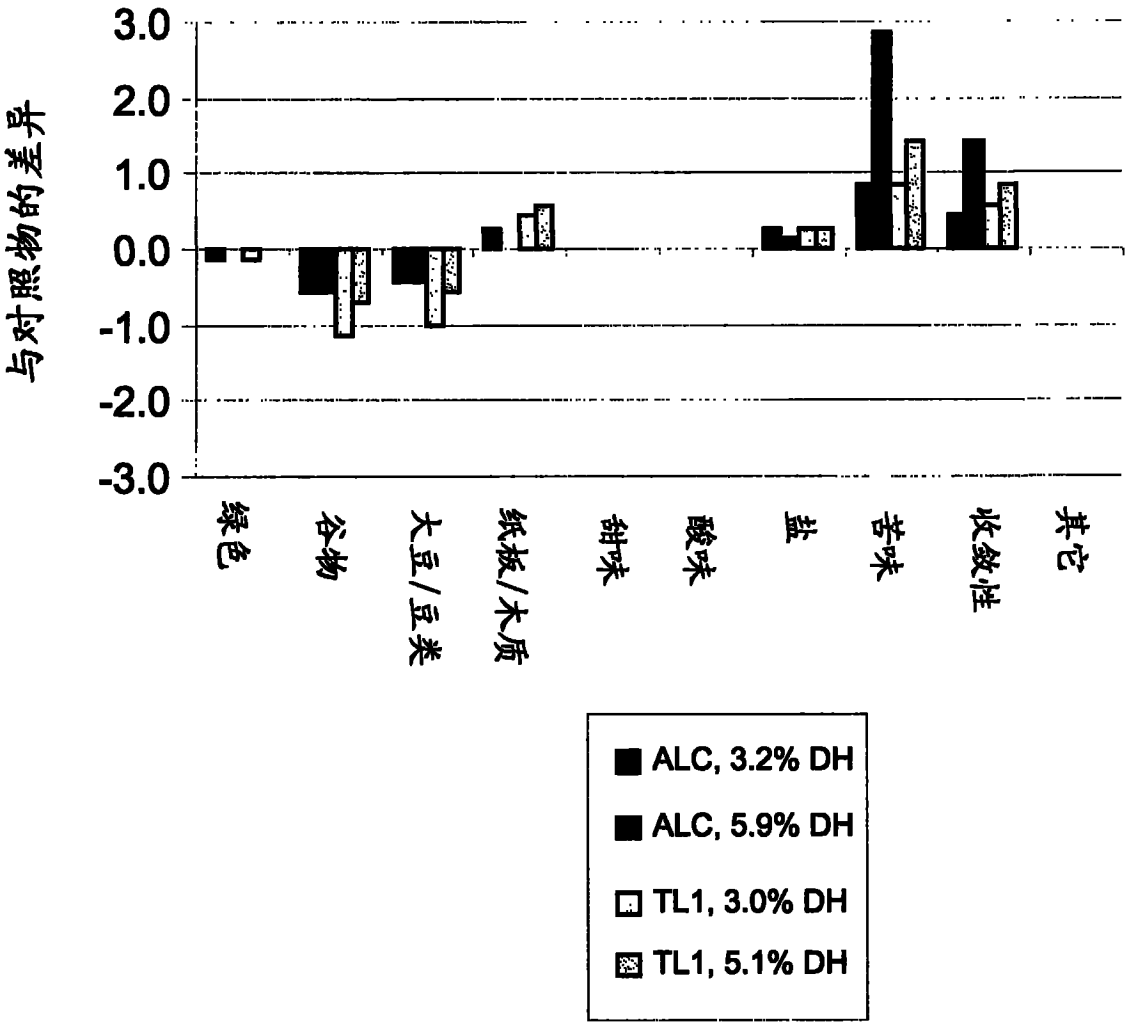


图 2B

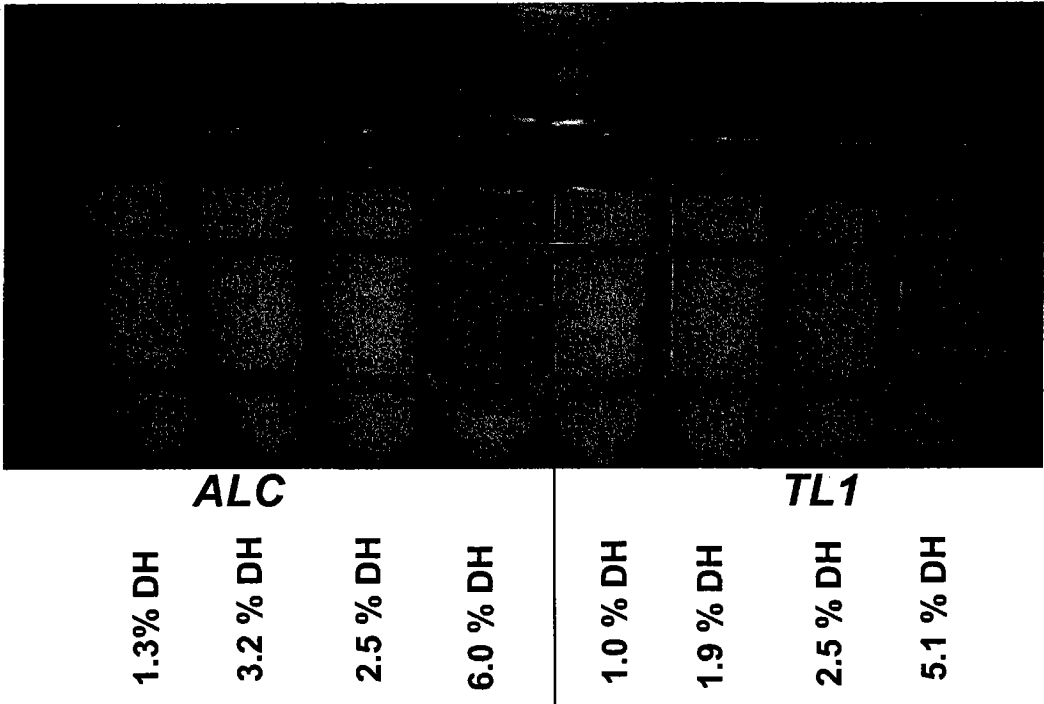


图 3A

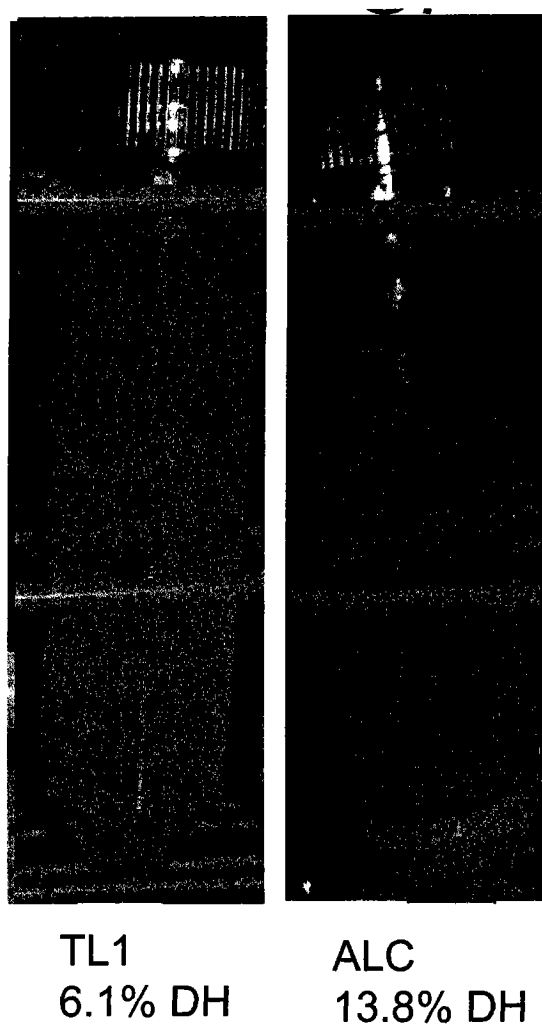


图 3B

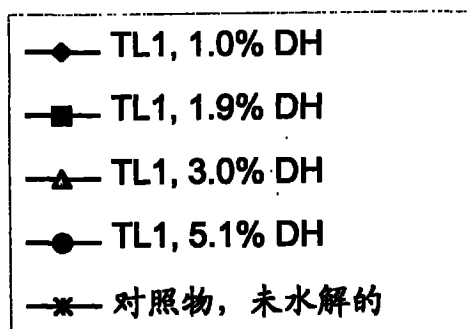
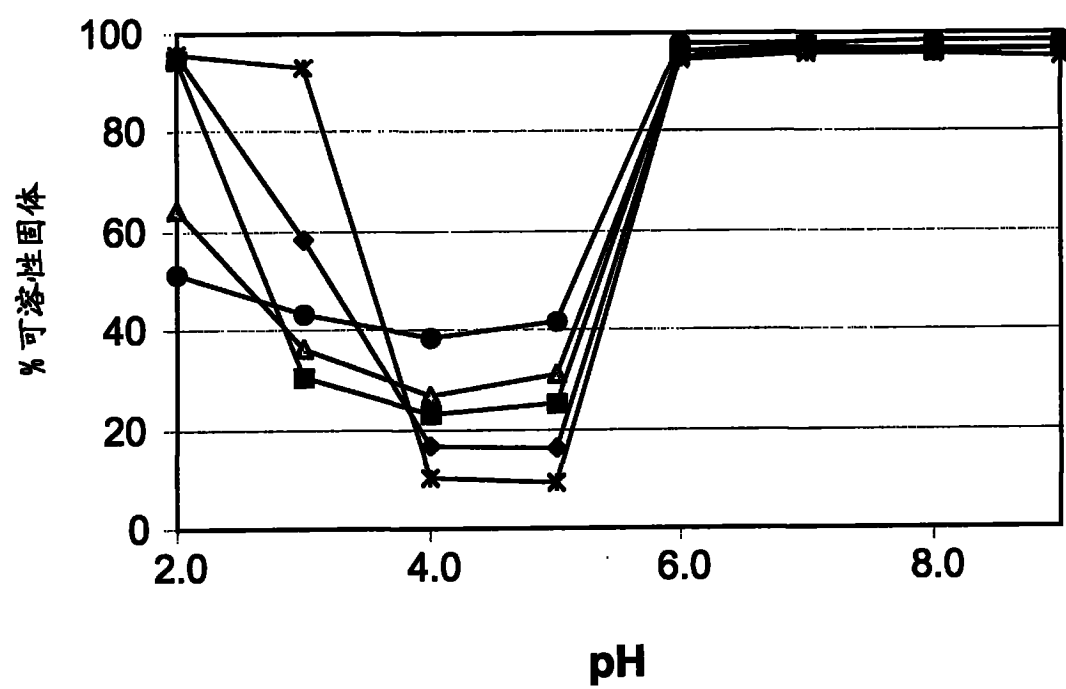


图 4A

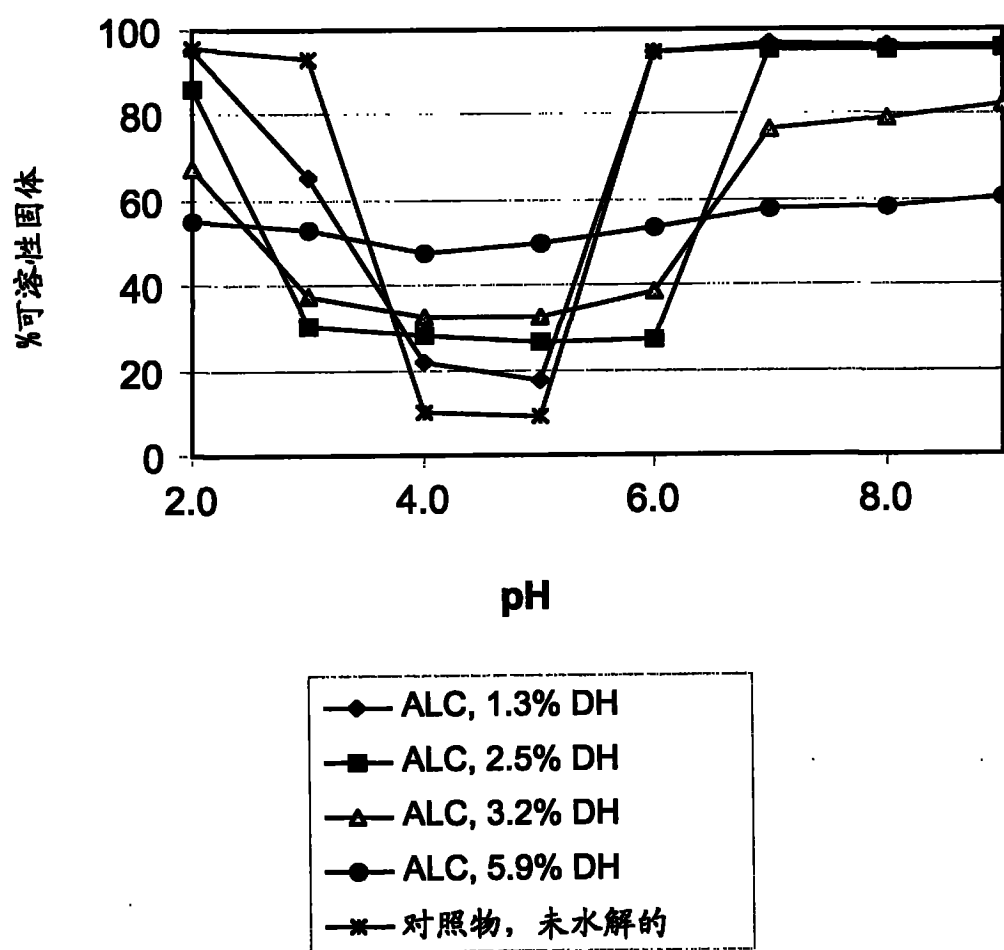


图 4B

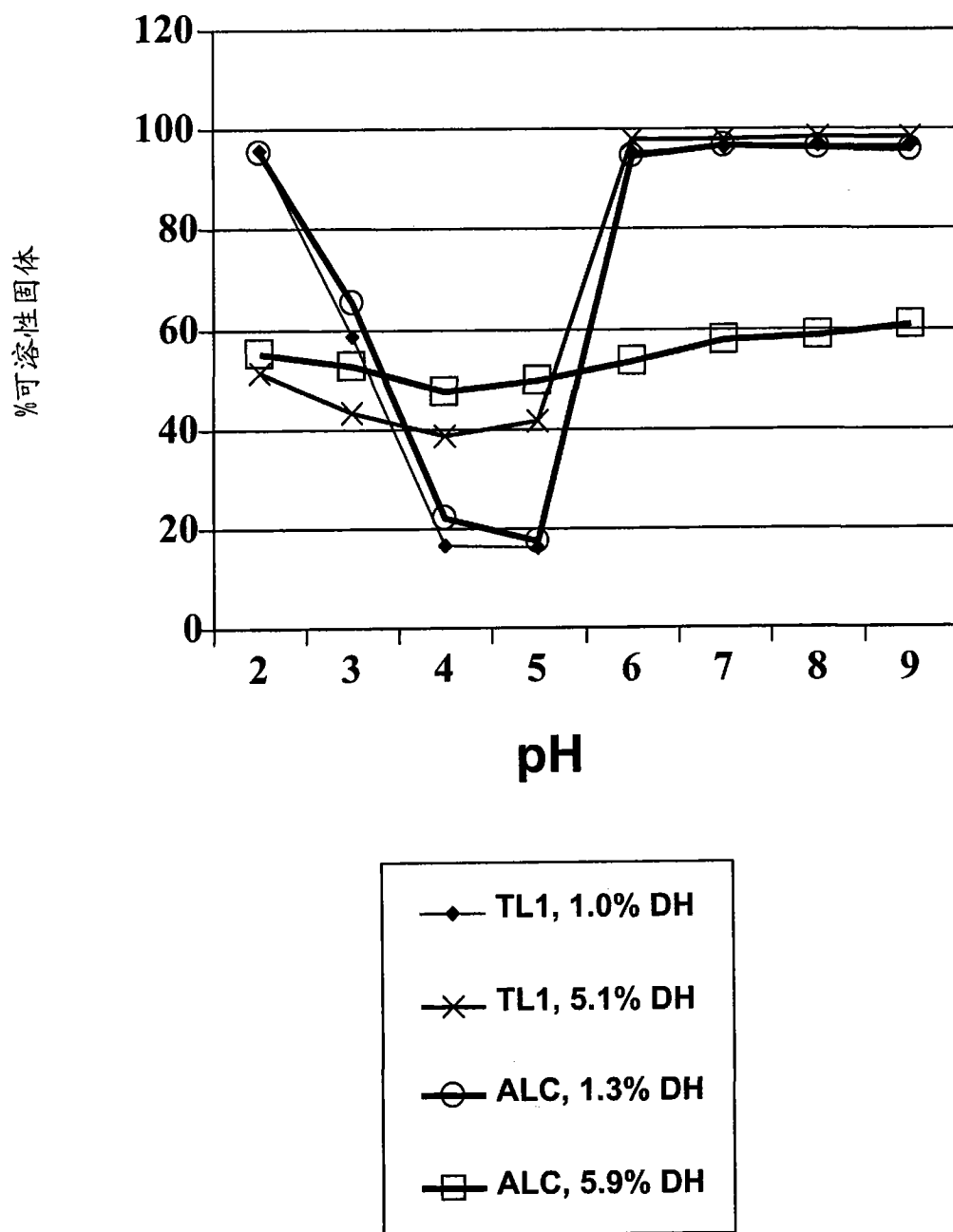


图 4C

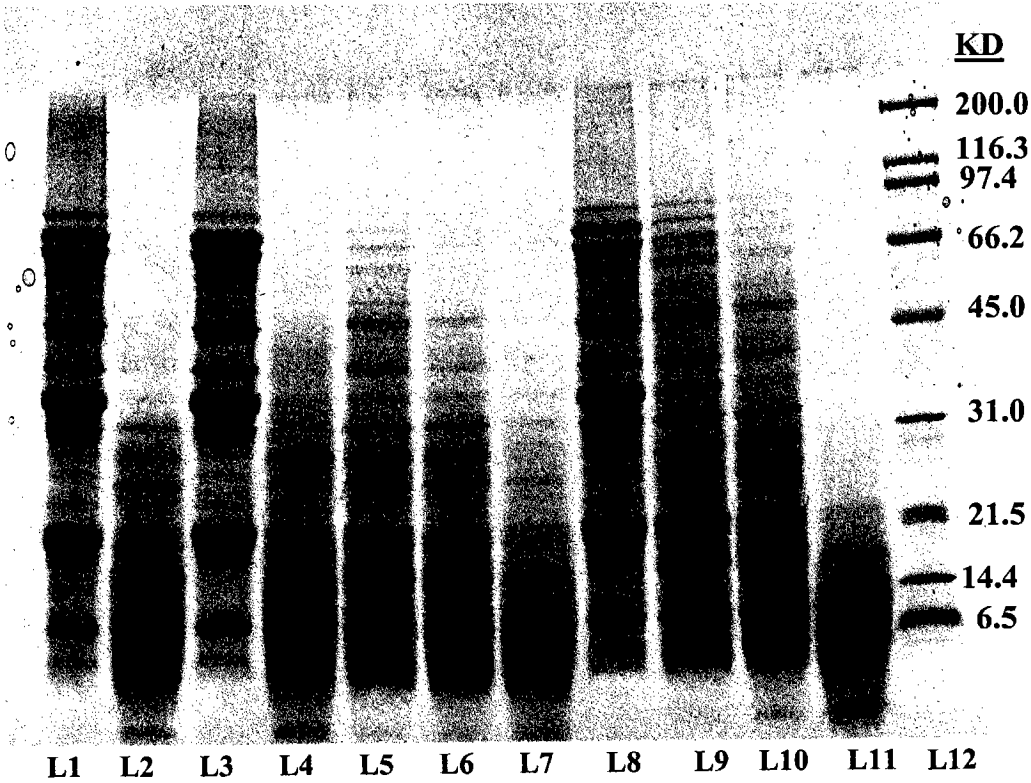


图 5

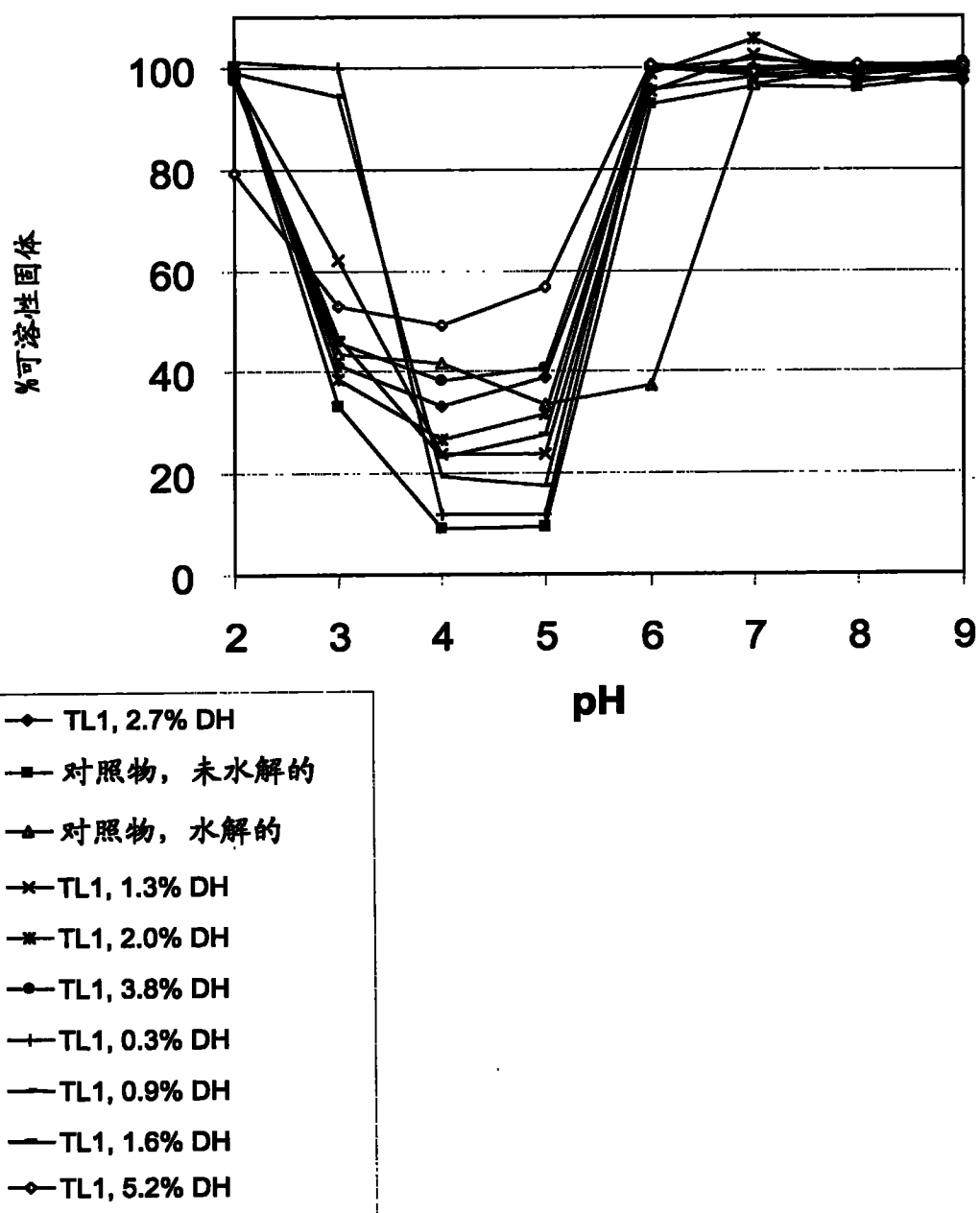


图 6

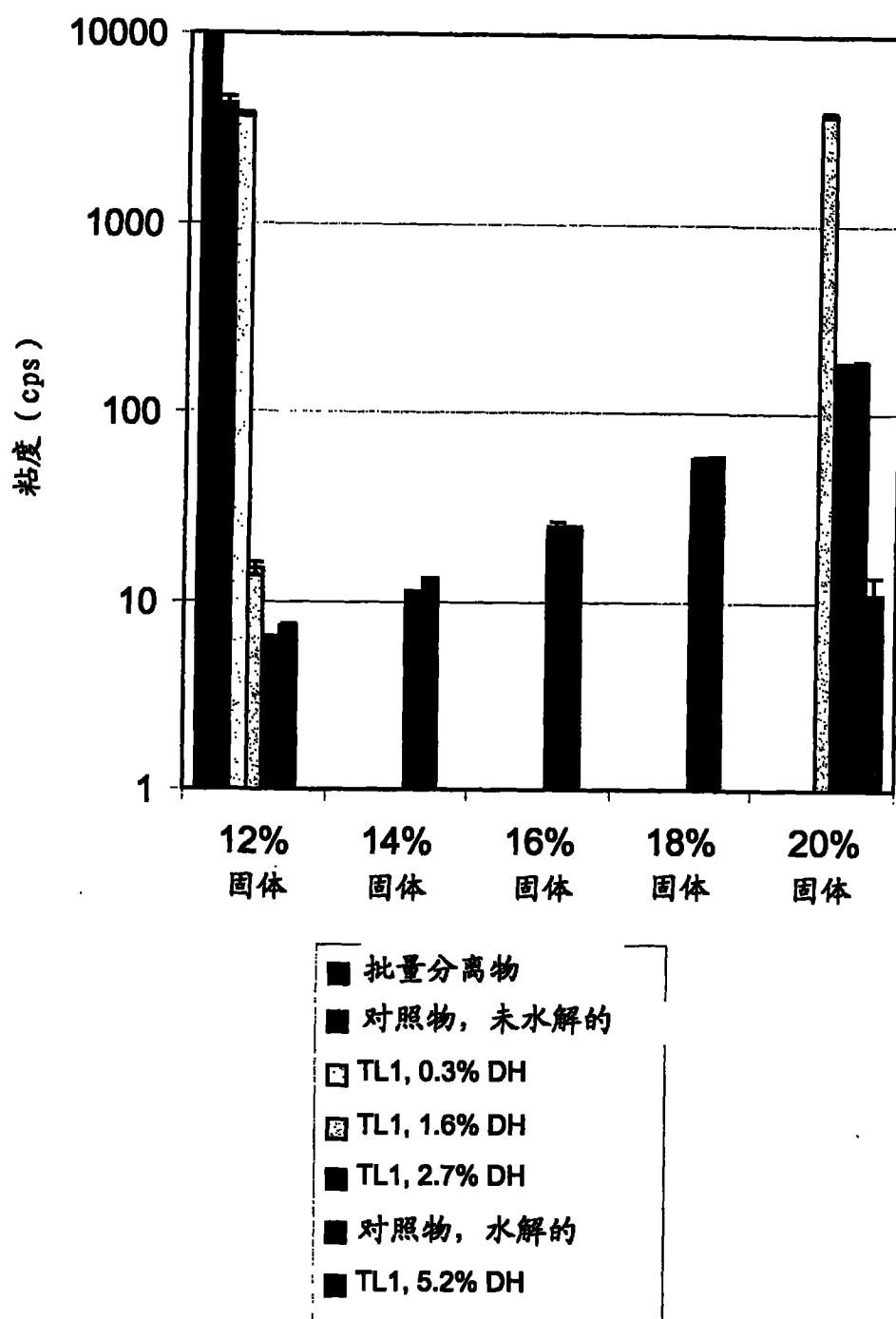


图 7

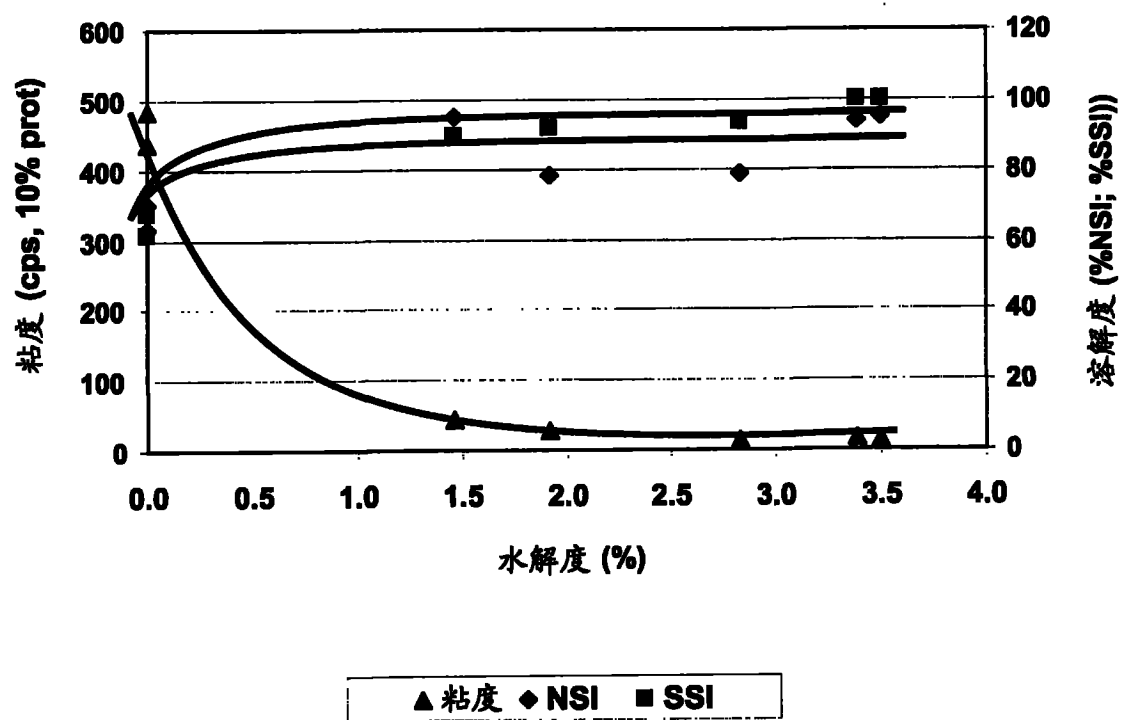


图 8

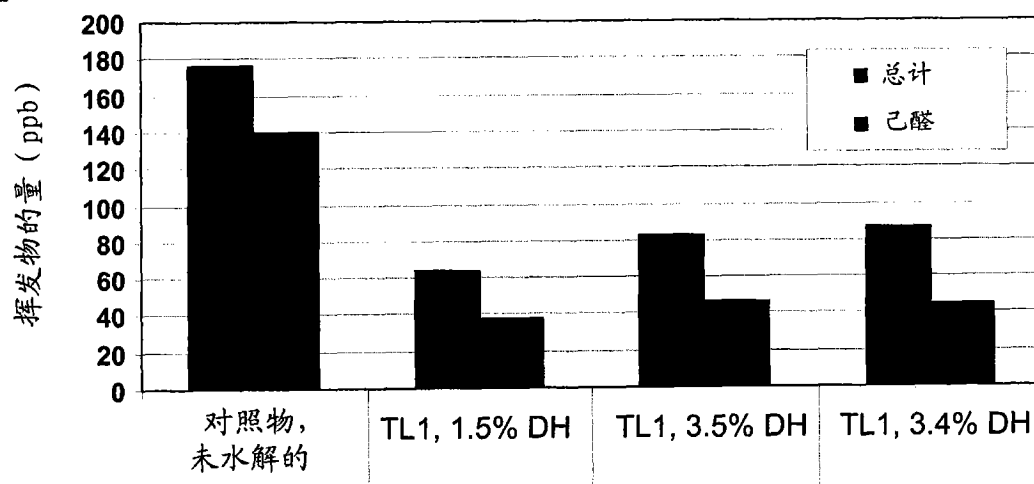
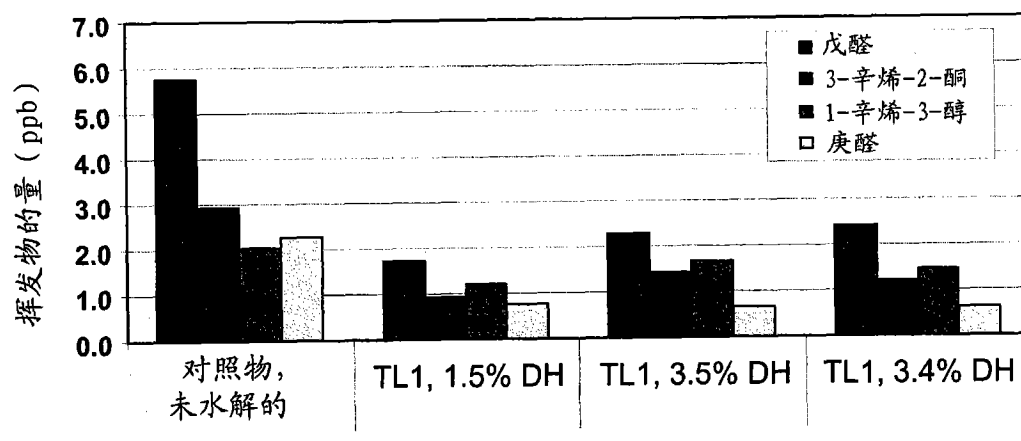
A**B**

图 9

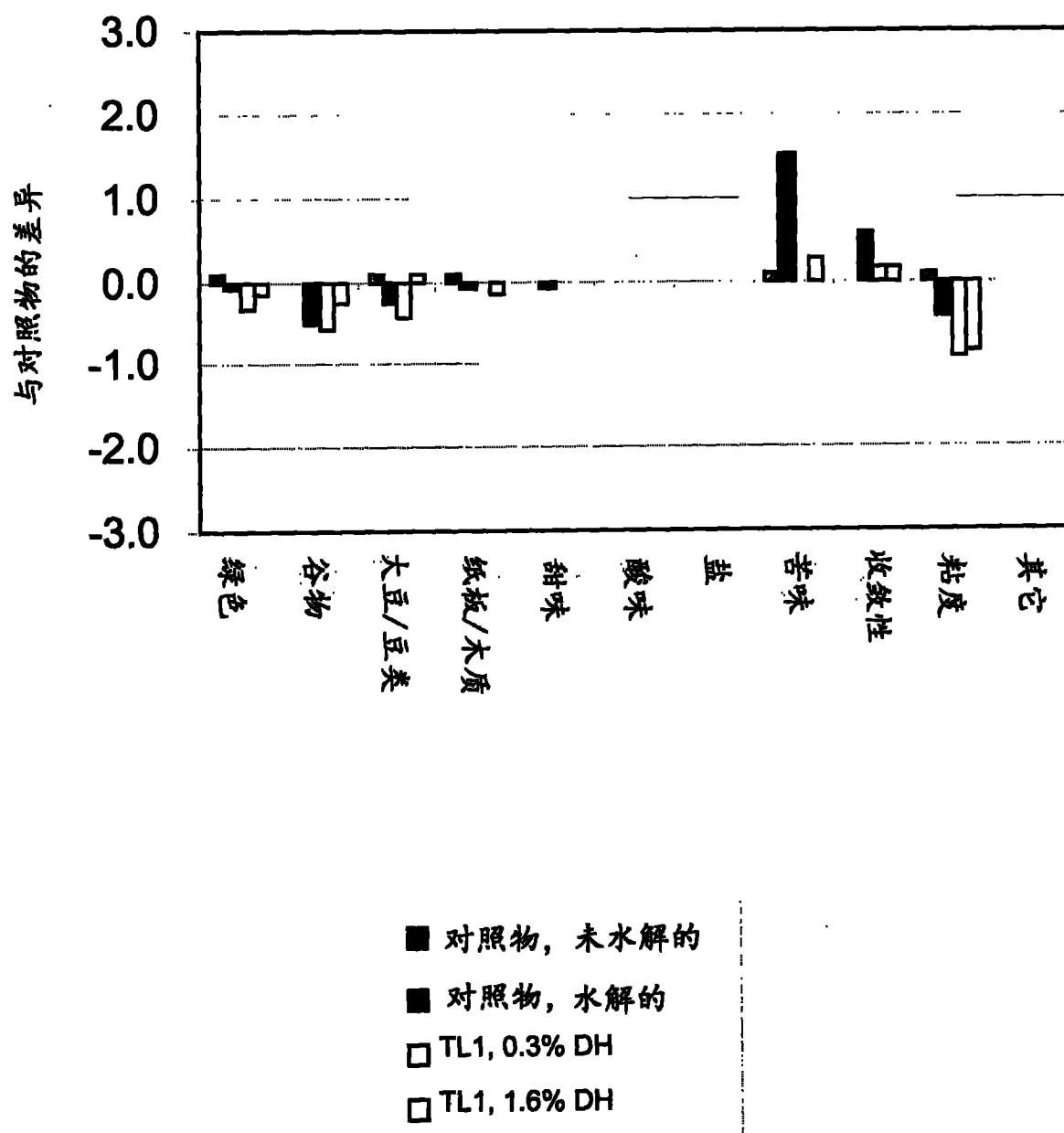


图 10A

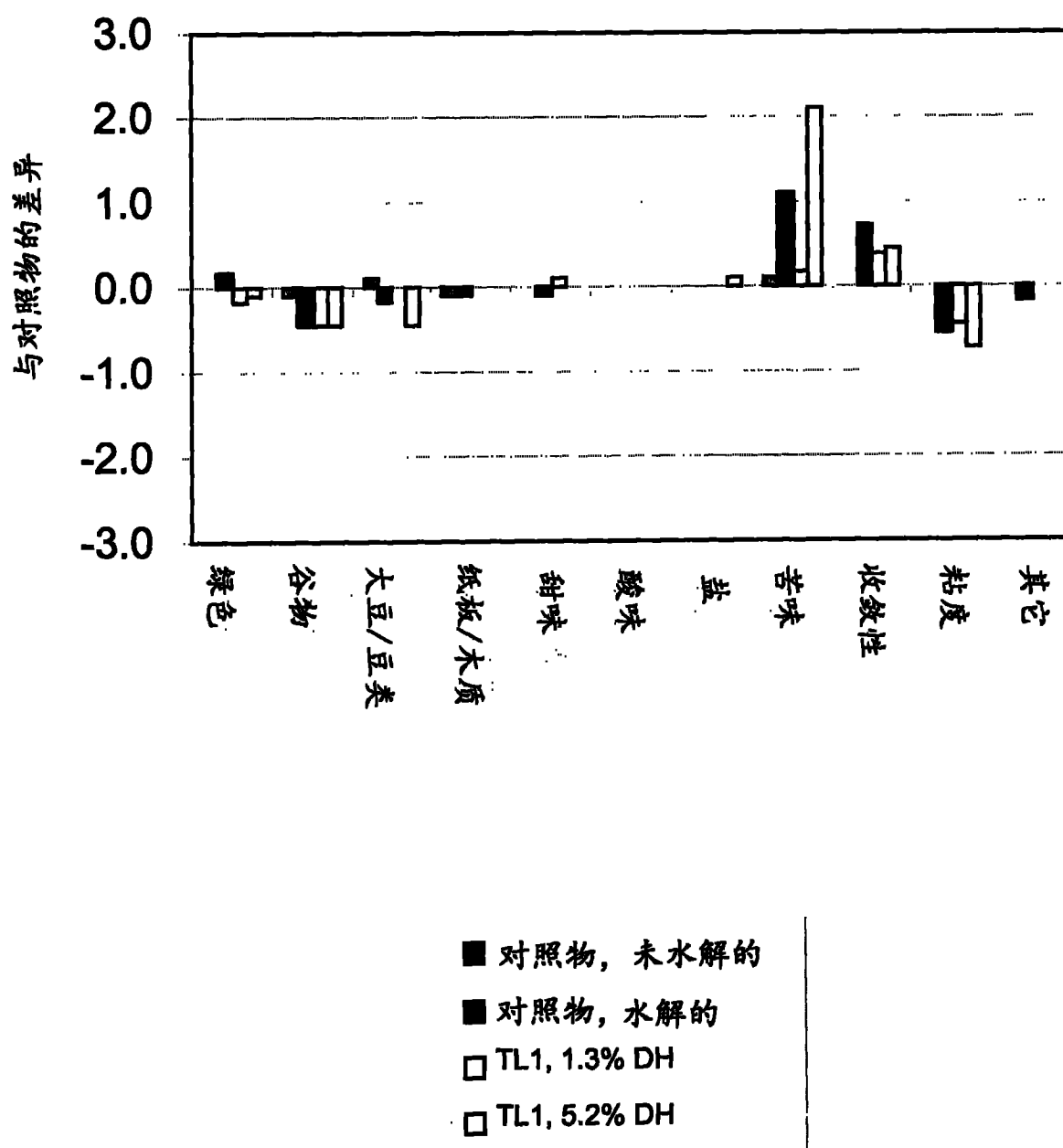


图 10B

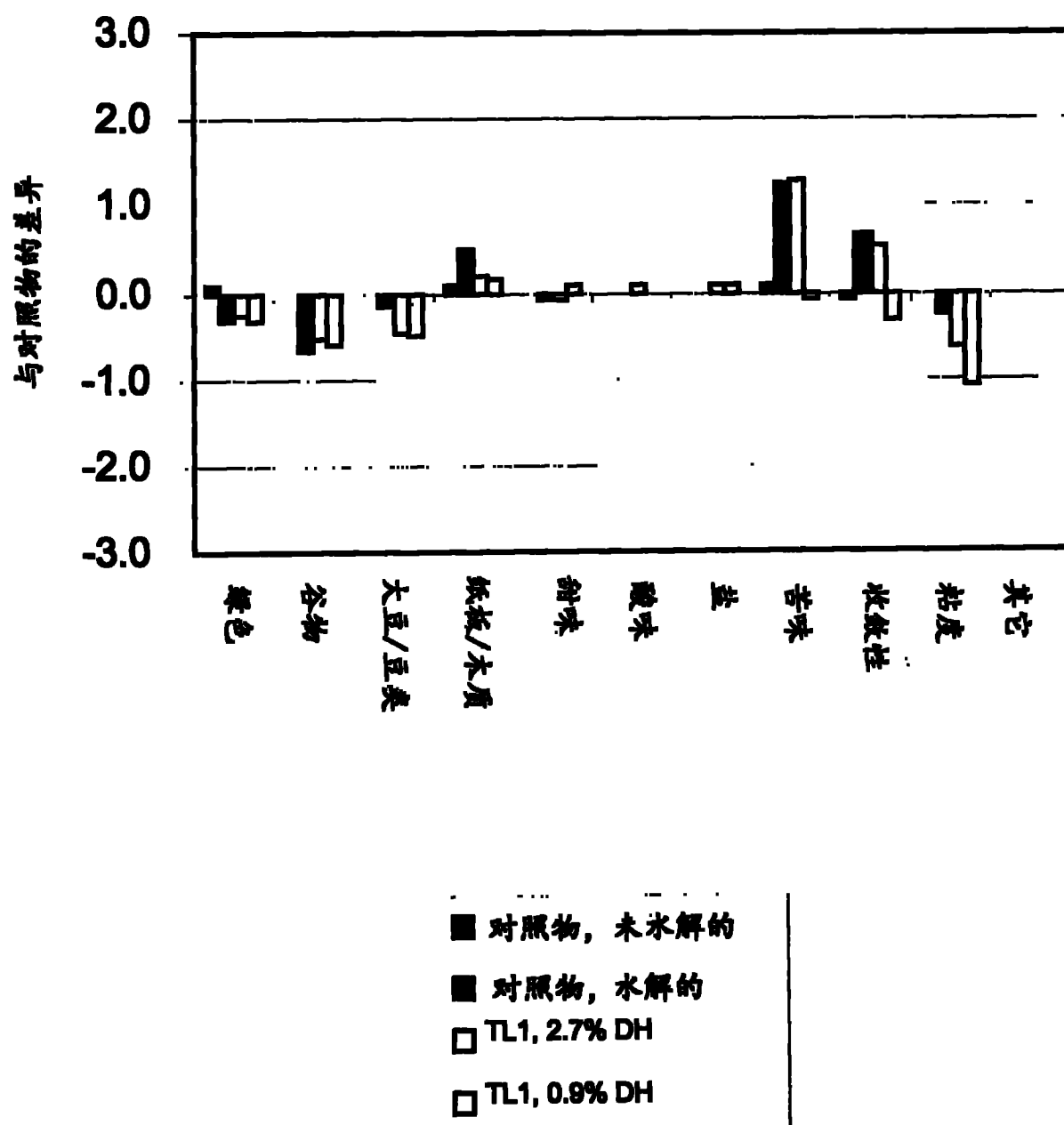


图 10C

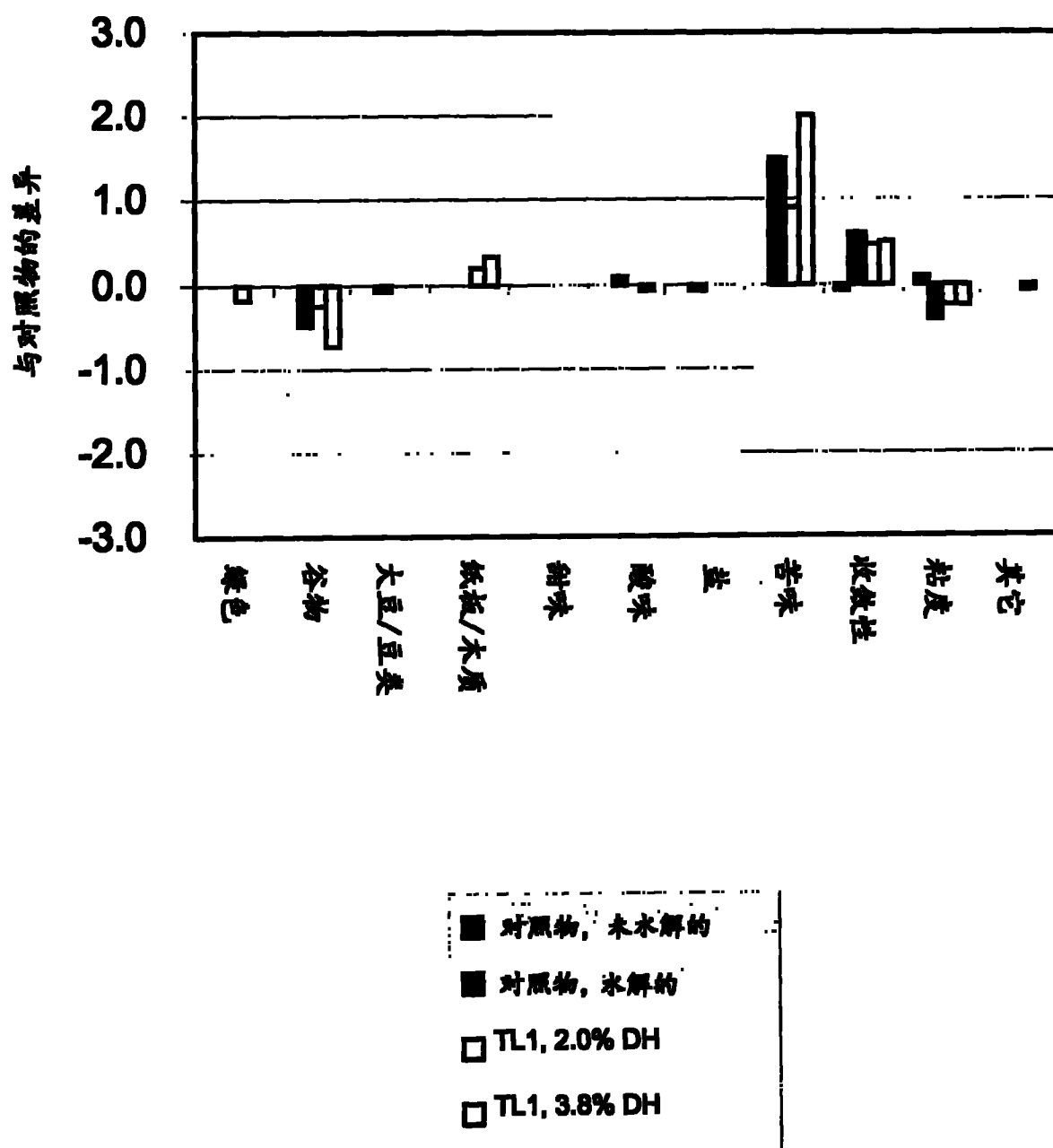


图 10D

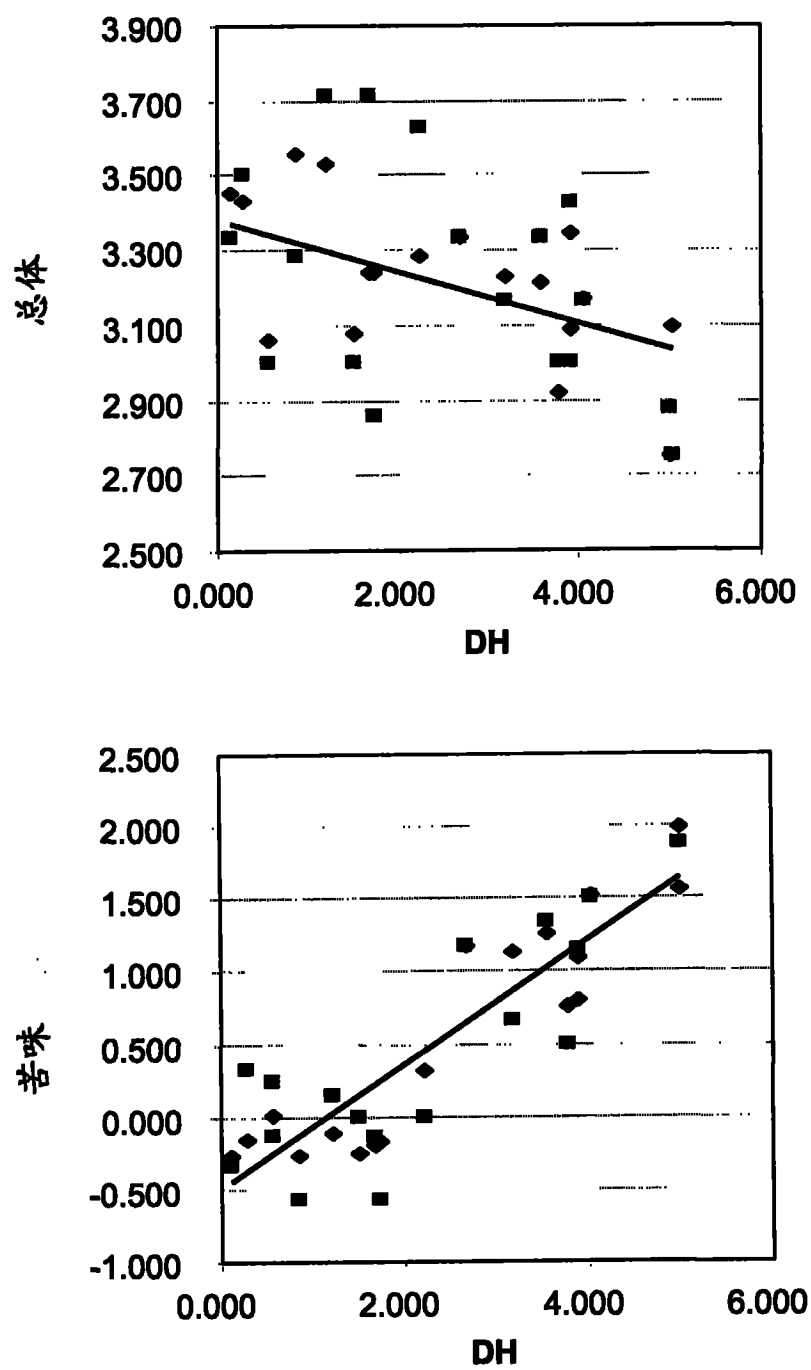


图 11

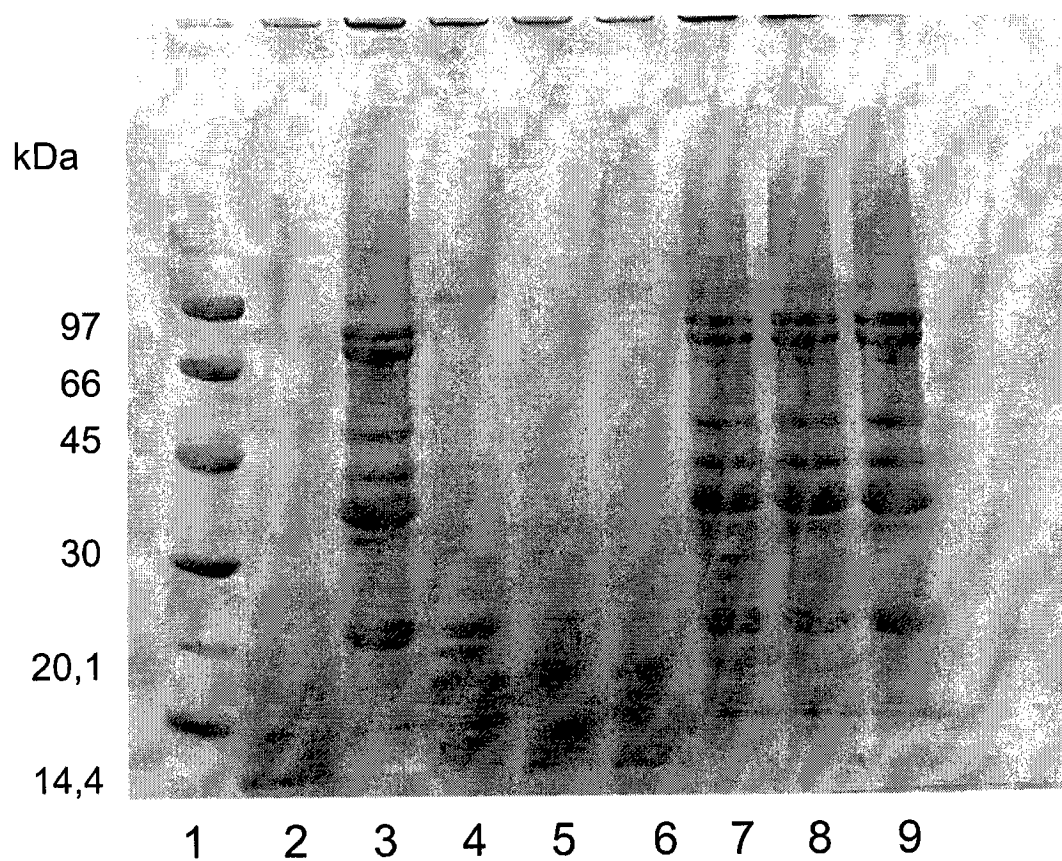


图 12

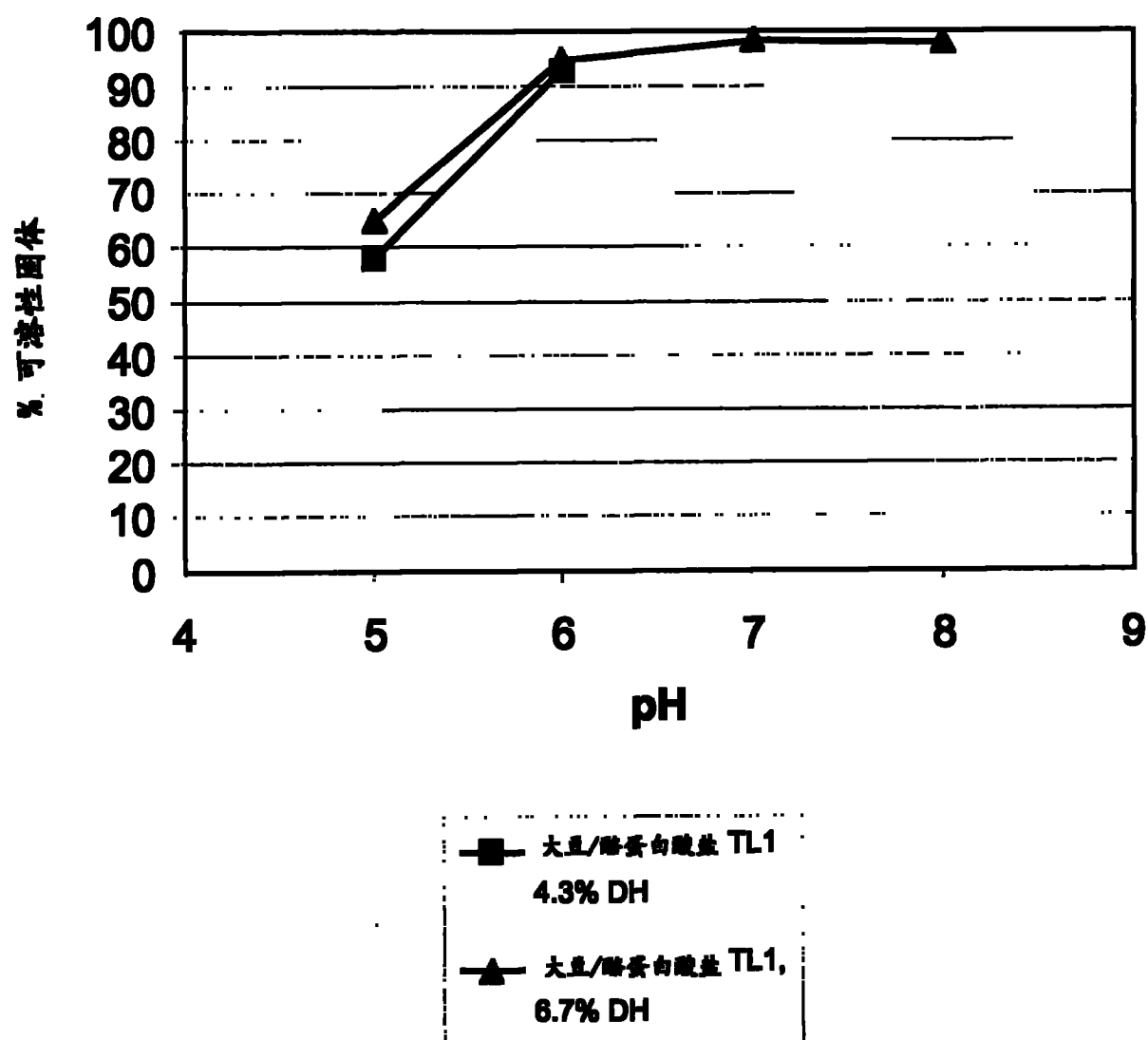


图 13

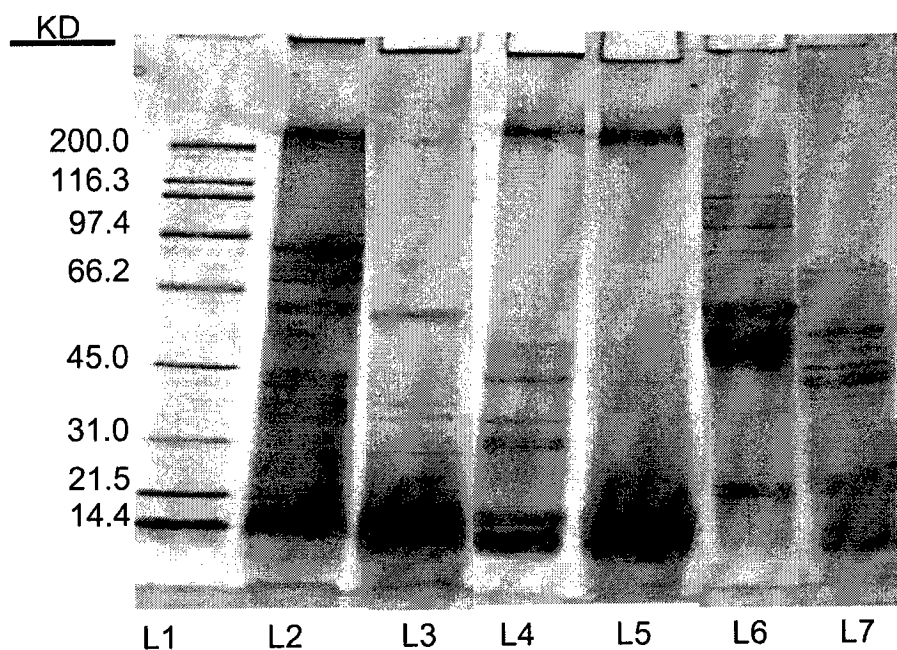


图 14

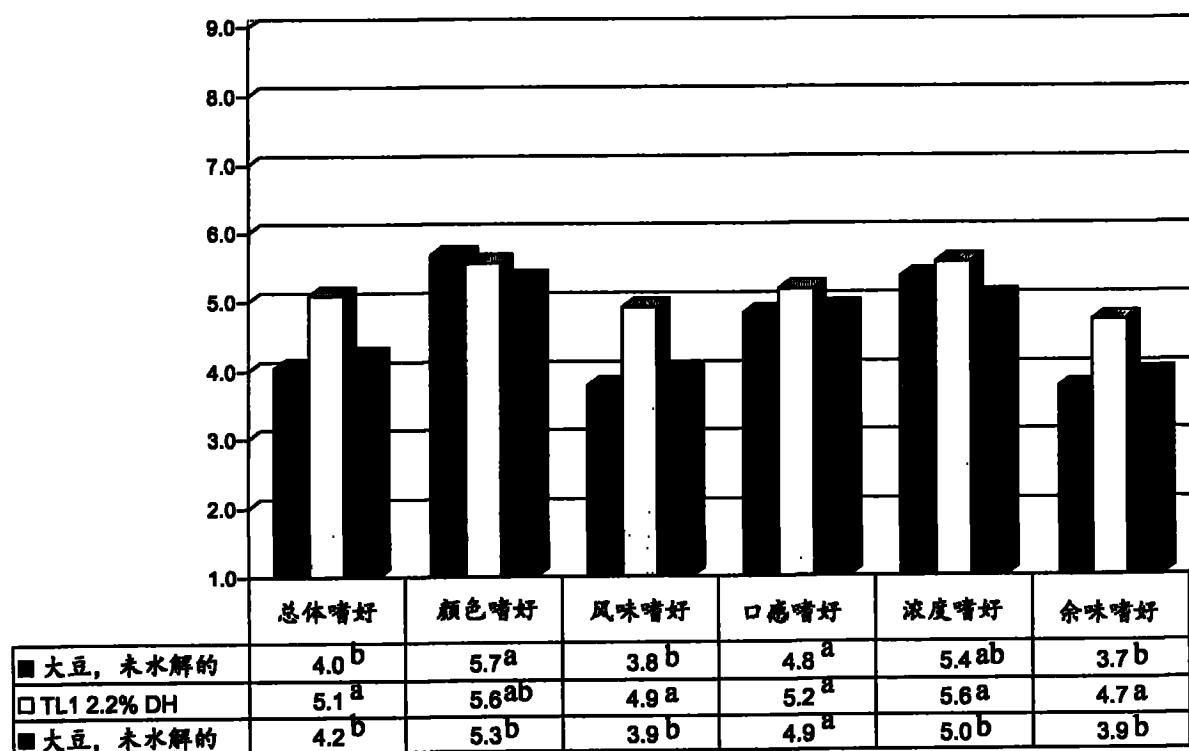


图 15

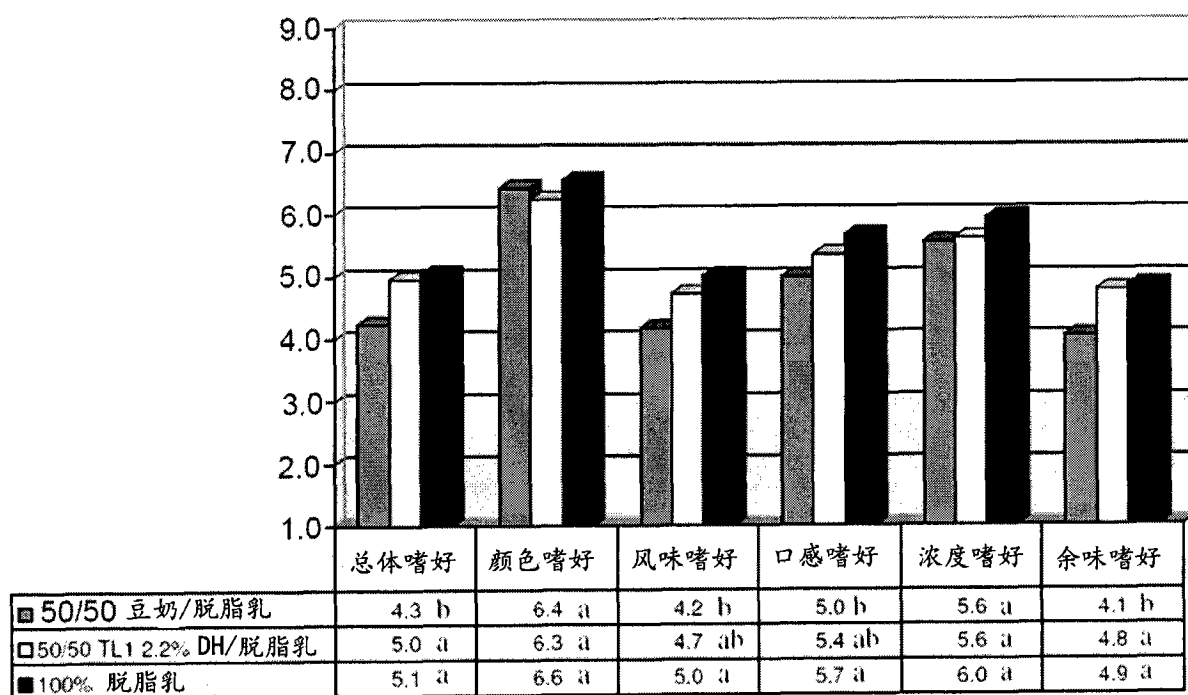


图 16