



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101801209 B

(45) 授权公告日 2014.05.21

(21) 申请号 200880012256.7

(22) 申请日 2008.04.16

(30) 优先权数据

60/911,935 2007.04.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009.10.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2008/054608 2008.04.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/125685 EN 2008.10.23

(73) 专利权人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 吉特·B·林雷夫 珀·M·尼尔森

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C12N 9/58 (2006.01)

(56) 对比文件

EP 0335399 A1, 1989.07.19, 全文.

CN 1125466 A, 1996.06.26, 全文.

CN 1871344 A, 2006.11.29, 全文.

J. S. Madsen. Hydrolysis of

P-lactoglobulin by Four Different Proteinases Monitored by Capillary Electrophoresis and High Performance Liquid Chromatography. 《ht. Dairy Journal》. 1997, 第7卷 399-409.

Susumu Tsunasawa. The Primary Structure and Structural Characteristics of Achromobacter Zyticus Protease I, a Lysine-specific Serine Protease. 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 1989, 第264卷 (第7期), 3832-3839.

刘利军. 酶法水解乳清蛋白过程的优化. 《天津科技大学学报》. 2005, 第20卷 (第3期), 9-16.

审查员 李有朝

权利要求书1页 说明书11页

序列表9页

(54) 发明名称

乳清蛋白水解物

(57) 摘要

本发明涉及一种使用在精氨酸或赖氨酸的羧基端一侧特异性切割的微生物内肽酶来生成乳清蛋白水解物的方法。本发明还涉及此乳清蛋白水解物在运动饮料或临床营养中的用途。

1. 一种用于生成乳清蛋白水解物的方法,包括:
  - a) 提供包含  $\beta$ -乳球蛋白和  $\alpha$ -乳清蛋白的乳清蛋白的水性组合物;
  - b) 使所述组合物受到在精氨酸或赖氨酸的羧基端一侧进行特异性切割的微生物来源的胰蛋白酶样内肽酶的作用;
  - c) 使所述内肽酶失活。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述微生物来源的胰蛋白酶样内肽酶是真菌内肽酶。
3. 权利要求 2 的方法,其中所述真菌内肽酶源自镰孢属菌株。
4. 权利要求 3 的方法,其中所述真菌内肽酶源自尖镰孢菌株。
5. 上述权利要求任一项的方法,其中所述内肽酶在 pH8 至 10 具有最佳的蛋白水解活性。
6. 权利要求 1-4 任一项的方法,其中所述内肽酶在 45°C 至 60°C 的温度具有最佳的蛋白水解活性。
7. 权利要求 1-4 任一项的方法,其中所述内肽酶选自氨基酸序列是 SEQ ID NO :2、4、6 或 8 中任一的多肽。
8. 权利要求 1-4 任一项的方法,其中所述内肽酶的氨基酸序列是 SEQ ID NO :2 的氨基酸 25-248。
9. 权利要求 1-4 任一项的方法,其中所述乳清蛋白是乳清蛋白浓缩物或乳清蛋白分离物。
10. 权利要求 1-4 任一项的方法,其中所述乳清蛋白的水溶液包含占总干物质至少 5% 的  $\alpha$ -乳清蛋白。
11. 权利要求 1-4 任一项的方法,其中所述乳清蛋白水解物具有 0.1% 至 20% 的水解程度。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述乳清蛋白水解物具有 0.5% 至 8% 的水解程度。
13. 权利要求 1-4 任一项的方法,其中步骤 c) 包括加热至至少 70°C。
14. 权利要求 1-4 任一项的方法,其中所述内肽酶以每 kg 乳清蛋白 0.01-10g 酶蛋白的浓度添加。

## 乳清蛋白水解物

### 发明领域

[0001] 本发明涉及一种使用微生物内肽酶来生成乳清蛋白水解物的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 蛋白质补充物（诸如乳清蛋白粉末）普遍被健身者和其它运动员用于加速肌肉发育和帮助恢复。同样地，此类蛋白质补充物对于临床营养是有用的。一般而言，预先消化的、经过部分水解的乳清蛋白比未水解的蛋白质更容易吸收，这便是为何蛋白质水解物被认为具有营养益处。但是未水解的乳清蛋白在味道方面清淡略有奶味 (mild and slightly milky)，而经过水解的乳清蛋白趋于尝起来完全不同，通常在某种程度上是不受多数人欢迎的。因此，在此类水解物使用在例如饮料中时，该味道不得不通过例如添加人造香料来掩盖。

[0004] 使用特定内肽酶来水解蛋白质是本领域已知的，参见例如 W097/43910。对  $\beta$ -乳球蛋白（其是乳清蛋白中所存在的蛋白质之一）的水解已经在 Madsen 等 (1997), *Int. Dairy Journal*, 7, 399-409 页中进行了研究。还有，用不同蛋白酶水解  $\beta$ -乳球蛋白的表位记载于 *Food Proteins and Their Applications*; Ed. S. Damodaran 和 A. Paraf; Marcel Dekker, New York, 1997; 443-472 页。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明人令人惊讶地发现了一种用于生成乳清蛋白水解物的方法，其中用针对精氨酸和赖氨酸具有特异性的微生物内肽酶对所述乳清蛋白进行处理，接着使所述内肽酶失活，这产生具有可口味道的水解物。所述水解物可能甚至具有比未水解的乳清蛋白更好的味道。此外，通过本发明方法所获得的乳清蛋白水解物是稳定的，而且与用其它内肽酶获得的水解物相比在热处理时具有降低的胶化趋势。

[0007] 因此，本发明涉及一种用于生成乳清蛋白水解物的方法，包括：

[0008] a) 提供包含  $\beta$ -乳球蛋白和  $\alpha$ -乳清蛋白的乳清蛋白的水性组合物；

[0009] b) 使所述组合物受到在精氨酸或赖氨酸的羧基端一侧进行特异性切割的微生物内肽酶的作用；并

[0010] c) 使所述内肽酶失活。

[0011] 本发明还涉及通过上文方法所获得的乳清蛋白水解物在临床营养或能量饮料 (energy drink) 或运动饮料 (sports drink) 中的用途。

[0012] 发明详述

[0013] 如上文所提及的，本发明涉及一种用于生成乳清蛋白水解物的方法，包括：

[0014] a) 提供包含  $\beta$ -乳球蛋白和  $\alpha$ -乳清蛋白的乳清蛋白的水性组合物；

[0015] b) 使所述组合物受到在精氨酸或赖氨酸的羧基端一侧进行特异性切割的微生物内肽酶的作用；

[0016] c) 使所述内肽酶失活。

[0017] 要在本发明方法中使用的乳清蛋白要理解为可从乳清获得的蛋白质，诸如自乳清分离的蛋白质。乳清可定义为在乳因酸和 / 或粗制凝乳酶 (rennet) 凝结时分开的液体部

分。如此,乳清可以是来自干酪生产或来自酪蛋白生产的副产物。在本发明语境中的乳可以源自任何哺乳动物,诸如牛(cow)、山羊、绵羊、驴、骆驼、camelid、牦牛、或水牛。在一个优选的方面,所述乳是牛奶。

[0018] 要在本发明方法中使用的乳清蛋白包含 $\beta$ -乳球蛋白和 $\alpha$ -乳清蛋白。它还可以包含可从乳清获得的其它蛋白质,诸如血清清蛋白。步骤a)的水性组合物还可以包含不可从乳清获得的其它蛋白质。

[0019] 在一个优选的方面,步骤a)的水性组合物包含占总干物质至少15%,诸如至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%或至少60%的 $\beta$ -乳球蛋白。在另一个优选的方面,步骤a)的水性组合物包含占总干物质至少5%,诸如至少10%、至少15%或至少20%的 $\alpha$ -乳清蛋白。另一方面,步骤a)的水性组合物包含占总干物质至少1%、诸如至少2%、至少3%、至少4%或至少5%的血清清蛋白。

[0020] 在另一个优选的方面,步骤a)的水性组合物包含占总蛋白质至少15% (w/w(重量/重量)),诸如至少20% (w/w)、至少25% (w/w)、至少30% (w/w)、至少35% (w/w)、至少40% (w/w)、至少45% (w/w)、至少50% (w/w)、至少55% (w/w)或至少60% (w/w)的 $\beta$ -乳球蛋白。在另一个优选的方面,步骤a)的水性组合物包含占总蛋白质至少5% (w/w),诸如至少10% (w/w)、至少15% (w/w)或至少20% (w/w)的 $\alpha$ -乳清蛋白。另一方面,步骤a)的水性组合物包含占总蛋白质至少1% (w/w),诸如至少2% (w/w)、至少3% (w/w)、至少4% (w/w)或至少5% (w/w)的血清清蛋白。

[0021] 优选地,乳清蛋白已经从乳清中分离出来,且 $\beta$ -乳球蛋白和 $\alpha$ -乳清蛋白之间的比率大体上与从中分离乳清蛋白的乳清中的相同。

[0022] 在一个优选的实施方案中,该方法中所使用的乳清蛋白可以是乳清蛋白浓缩物,其具有约29%至小于约90%(以无水物为基础)的蛋白质含量。乳清蛋白浓缩物含有低水平的脂肪和胆固醇,但是一般具有较高水平的乳糖形式的碳水化合物。

[0023] 在另一个实施方案中,乳清蛋白可以是乳清蛋白分离物。一般而言,乳清蛋白分离物具有至少约90%乳清蛋白(以无水物为基础)的蛋白质含量。一般而言,此类分离物已经进行了加工以除去脂肪和乳糖。

[0024] 要在本发明方法中使用的乳清蛋白可以是乳清蛋白浓缩物和乳清蛋白分离物的混合物。

[0025] 乳清蛋白可以包含完整的乳清蛋白或其可以包含经过部分水解的乳清蛋白。

[0026] 在本发明的方法中,乳清蛋白材料通常混合或分散在水中以形成包含约1%至约20%蛋白质(按重量计)的浆料。在一个实施方案中,所述浆料可以包含约1%至约5%蛋白质(按重量计)。在另一个实施方案中,所述浆料可以包含约6%至约10%蛋白质(按重量计)。在一个进一步的实施方案中,所述浆料可以包含约11%至约15%蛋白质(按重量计)。在又一个实施方案中,所述浆料可以包含约16%至约20%蛋白质(按重量计)。

[0027] 在蛋白质材料在水中分散后,可以对蛋白质浆料的pH和温度进行调节以优化水解反应,具体地,以确保水解反应中所使用的内肽酶几乎以其最佳活性水平起作用。可以依照本领域普遍知道的方法对蛋白质浆料的pH进行调节和监测。可以对蛋白质浆料的pH进行调节,并维持在约5.0至约10.0。在一个实施方案中,可以对蛋白质浆料的pH进行调节,并维持在约6.5至约8.0。在一个优选的实施方案中,可以对蛋白质浆料的pH进行调节,并

维持在约 7.5。优选地,依照本领域中已知的方法在水解反应过程中对蛋白质浆料的温度进行调节,并维持在约 40°C 至约 70°C。在一个优选的实施方案中,可以在水解反应过程中对蛋白质浆料的温度进行调节,并维持在约 40°C 至约 60°C。一般而言,高于此范围的温度可能使内肽酶失活,而低于或高于此范围的温度趋于减缓内肽酶的活性。

[0028] 一般地,通过将内肽酶添加至蛋白质材料的浆料来启动水解反应。

[0029] 要在本发明方法中使用的内肽酶在精氨酸残基或赖氨酸残基中任一的羧基端一侧进行特异性切割。“特异性切割”意指内肽酶具有的在精氨酸或赖氨酸中任一的羧基端一侧进行切割的特异性高于在任何其它氨基酸的羧基端一侧进行切割的特异性。在一个实施方案中,所述内肽酶在精氨酸的羧基端一侧进行特异性切割,意味着所述内肽酶具有的在精氨酸的羧基端一侧进行切割的特异性高于在任何其它氨基酸的羧基端一侧进行切割的特异性。

[0030] 通常,内肽酶在 pH 约 6.0 至约 11.0,优选地,pH 约 8 至约 10,且在约 40°C 至约 70°C 的温度,优选地,在约 45°C 至约 60°C 或约 45°C 至约 55°C 的温度具有最佳的蛋白水解活性。

[0031] 要在本发明方法中使用的内肽酶是微生物来源的。微生物酶(而不是动物或植物酶)的使用是有利的,有利之处在于微生物酶展现出广谱的特征(最适 pH、温度等),而且可以相对大量地一致地获得。

[0032] 优选地,所述内肽酶是微生物来源的胰蛋白酶样内肽酶。在本发明的语境中,胰蛋白酶样内肽酶是具有与胰蛋白酶的特异性类似的特异性的内肽酶,例如具有大于 100 的胰蛋白酶比率(Trypsin ratio)的内肽酶,其中所述胰蛋白酶比率根据该酶在 Arg 或 Lys 后切割时的活性(取较大者)除以该酶在任何其它氨基酸之后切割时的活性来测定。应当在如下 pH 值进行用以测定胰蛋白酶比率的此类活性测量,内肽酶在所述 pH 值的活性至少是内肽酶在其最适 pH 的活性的一半。可以如本申请的实施例 3 中所描述的那样测定胰蛋白酶比率。

[0033] 在一个实施方案中,所述内肽酶是细菌内肽酶。

[0034] 在另一个实施方案中,所述内肽酶是真菌内肽酶。在一个优选的实施方案中,所述内肽酶来自镰孢属(*Fusarium*)菌株,优选地,来自尖镰孢(*Fusarium oxysporum*),例如具有如本申请的 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列(SWISSPROT No. P35049)。先前已经描述了来自尖镰孢的胰蛋白酶样内肽酶,其具有如 SEQ ID NO :2 的氨基酸 25-248 所示的氨基酸序列(US5, 288, 627 ;US5, 693, 520)。

[0035] 在一个实施方案中,所述内肽酶是来自水解无色杆菌(*Achromobacter lyticus*)的胰蛋白酶样内肽酶,例如具有如本申请的 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列(UNIPROT : P15636)。在另一个实施方案中,所述内肽酶是来自腐皮镰孢(*Fusarium solani*)的胰蛋白酶样内肽酶,例如具有如本申请的 SEQ ID NO :6 所示的氨基酸序列(GENESEQP : ADZ80577)的 AP977S。在另一个实施方案中,所述内肽酶是来自腐皮镰孢相似种(*Fusarium cf. solani*)的胰蛋白酶样内肽酶,例如具有如本申请的 SEQ ID NO :8 所示的氨基酸序列的 AP971。

[0036] 在本发明的一个实施方案中,所述内肽酶选自下组:

[0037] i) 多肽,其具有与如下的 (A) 或 (B) 至少 60%、70%、80%、85%、90%、95% 或 98% 相同的氨基酸序列:(A) SEQ ID NO :2、4、6 或 8 中任一,或 (B) 这些序列中任一的具有

蛋白酶活性的片段；

[0038] ii) 多肽,其由与 SEQ ID NO :1、3、5 或 7 中任一至少 60%、70%、80%、85%、90%、95% 或 98% 相同的多核苷酸编码；

[0039] iii) 多肽,其由如下多核苷酸编码,所述多核苷酸的补体在至少低严格性条件,优选至少中等严格性、至少高严格性或至少极高的严格性条件下,与 SEQ ID NO :1、3、5 或 7 中任一杂交；和

[0040] iv) 多肽,其具有通过在如下的 (A) 或 (B) 中取代、缺失、和 / 或插入一个或几个氨基酸而修饰的氨基酸序列:(A) SEQ ID NO :2、4、6 或 8 中任一,或 (B) 这些序列中任一具有蛋白酶活性的片段。

[0041] 氨基酸序列中具有蛋白酶活性的片段可以是活性酶的氨基酸序列,例如在加工后,诸如在切除任何信号肽和 / 或前肽后。优选的片段是 SEQ ID NO :2 的氨基酸 25-248、SEQ ID NO :4 的氨基酸 21-653、SEQ ID NO :6 的氨基酸 26-251、或 SEQ ID NO :8 的氨基酸 18-250。

[0042] 在本发明的一个优选实施方案中,所述内肽酶具有这样的氨基酸序列,其与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 25-248 至少 60%、70%、80%、85%、90%、95% 或 98% 相同。

[0043] 极低的至极高的严格性条件定义为于 42°C 在 5X SSPE、0.3% SDS、200  $\mu$ g/ml 经过剪切的且变性的鲑精 DNA、和或是用于极低的和低的严格性的 25% 甲酰胺、或是用于中等的和中-高的严格性的 35% 甲酰胺、或是用于高的和极高的严格性的 50% 甲酰胺中遵循标准的 Southern 印迹规程进行最佳 12 至 24 小时的预杂交和杂交。最后,使用 2X SSC、0.2% SDS,优选至少在 45°C (极低的严格性)、更优选至少在 50°C (低的严格性),更优选至少在 55°C (中等严格性),更优选至少在 60°C (中-高严格性),甚至更优选至少在 65°C (高严格性),和最优选至少在 70°C (极高的严格性) 清洗载体材料 3 次,每次 15 分钟。在一个具体的实施方案中,使用 0.2X SSC、0.2% SDS,优选至少在 45°C (极低的严格性)、更优选至少在 50°C (低的严格性),更优选至少在 55°C (中等严格性),更优选至少在 60°C (中-高严格性),甚至更优选至少在 65°C (高严格性),和最优选至少在 70°C (极高的严格性) 进行清洗。在另一个具体的实施方案中,使用 0.1X SSC、0.2% SDS,优选至少在 45°C (极低的严格性)、更优选至少在 50°C (低的严格性),更优选至少在 55°C (中等严格性),更优选至少在 60°C (中-高严格性),甚至更优选至少在 65°C (高严格性),和最优选至少在 70°C (极高的严格性) 进行清洗。

[0044] 就本发明而言,可以通过使用来自 EMBOSS 软件包 (Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000) EMBOSS: The European Molecular Biology OpenSoftware Suite. Trends in Genetics 16, (6) 276-277 页; <http://emboss.org>) 第 2.8.0 版的 Needle 程序来确定两个氨基酸序列的比对。Needle 程序执行 Needleman, S. B. 和 Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453 中所记载的全局比对算法。所使用的取代矩阵是 BLOSUM62, 缺口产生罚分是 10, 而缺口延伸罚分是 0.5。

[0045] 两个氨基酸序列之间的同一性程度以两个序列比对中的精确匹配的数目除以两个序列中最短序列的长度来计算。结果以百分比同一性表示。精确匹配在两个序列在重叠的同一位置中具有相同氨基酸残基时发生。序列的长度是该序列中氨基酸残基的数目 (例如 SEQ ID NO :2 的长度是 248 个氨基酸)。

[0046] 通过 Wilbur-Lipman 方法 (Wilbur 和 Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80 :726-730) 使用 LASERGENE™MEGALIGN™ 软件 (DNASTAR, Inc., Madison, WI) 用同一性表和以下多重比对参数来测定两个核苷酸序列之间的同一性程度: 缺口罚分为 10, 且缺口长度罚分为 10。成对比对参数是  $K_{tuple} = 3$ 、缺口罚分 = 3、和窗口 = 20。

[0047] 核苷酸序列之间的同一性程度以两个序列的比对中的精确匹配的数目除以两个序列中最短序列的长度来计算。结果以百分比同一性表示。精确匹配在两个序列在重叠的同一位置中具有相同核苷酸时发生。序列的长度是该序列中核苷酸的数目 (例如 SEQ ID NO :1 的长度是 744 个核苷酸)。

[0048] 优选地, 本发明的方法中所使用的微生物内肽酶量是每 kg 乳清蛋白约 0.01 至约 500AU (如下文所定义的), 优选每 kg 乳清蛋白约 0.1 至约 100AU, 更优选每 kg 乳清蛋白约 0.5 至约 50AU。

[0049] 一个安森单位 (Anson Unit, AU) 定义为在标准条件 (即 25°C, pH7.5 和 10 分钟反应时间) 下以如下的起始速率消化血红蛋白的酶量, 所述起始速率使得每分钟释放的 TCA 可溶性产物的量给出与一毫当量的酪氨酸相同的用酚试剂显现的颜色。

[0050] 根据蛋白质材料的来源、想要的水解程度、和水解反应的持续时间, 向蛋白质材料所添加的内肽酶量可以且会有所变化。内肽酶量可以在每 kg 蛋白质材料约 1mg 酶蛋白至约 5000mg 酶蛋白的范围。在另一个实施方案中, 所述量可以在每 kg 蛋白质材料 10mg 酶蛋白至约 2000mg 酶蛋白的范围。在又一个实施方案中, 所述量可以在每 kg 蛋白质材料约 50mg 的酶蛋白至约 1000mg 的酶蛋白的范围。

[0051] 如技术人员可领会的, 水解反应的持续时间可以且会有所变化。一般而言, 水解反应的持续时间可以在少许几分钟至许多个小时的范围, 诸如约 30 分钟至约 48 小时。

[0052] 优选地, 用微生物内肽酶进行的处理导致这样乳清蛋白水解物, 其具有约 0.1% 至约 20%, 更优选约 0.5% 至约 10% 或约 0.5% 至约 8%, 甚至更优选约 1% 至约 5% 的水解程度 (DH)。

[0053] 水解程度 (DH) 表示通过该方法所获得的蛋白质水解的程度。在本发明的语境中, 水解程度 (DH) 定义如下:

[0054]  $DH = (\text{所切割的肽键数} / \text{肽键总数}) \times 100\%$

[0055] 技术人员会知道如何测量 DH。

[0056] 在本发明方法的步骤 c) 中, 使内肽酶失活。可以通过本领域中已知的任何方法来实施这种失活, 例如通过加热至至少 70°C, 诸如至至少 75°C 或至少 80°C。

[0057] 通过本发明方法所获得的乳清蛋白水解物可以在食品中 (例如在饮料中) 使用。此类食品的非限制性例子包括运动饮料或能量饮料。通过本发明方法所获得的乳清蛋白水解物还可以在临床营养中使用, 例如在医院中使用。

## 实施例

[0058] 实施例 1

[0059] 使用 5 种不同的蛋白水解酶来水解来自 Arla Foods, Denmark 的乳清蛋白浓缩物 (Lacprodan 80) (包含占总干物质约 80% 的蛋白质)。酶和剂量是:

- [0060] 来自尖镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶, 剂量为 500mg 酶蛋白 /kg 原料。
- [0061] PTN 6.0 (Novozymes A/S), 剂量为原料的 0.5%。
- [0062] Alcalase 2.4L (Novozymes A/S), 剂量为原料的 0.2%。
- [0063] Neutrased 0.8L (Novozymes A/S), 剂量为原料的 1%。
- [0064] Protamex 1.5MG (Novozymes A/S), 剂量为原料的 0.5%。
- [0065] 添加酶之前将乳清蛋白浓缩物与水 (1 : 9) 混合。
- [0066] 水解在烧杯中于 50°C 发生, 所述烧杯安装有碱 (0.1N NaOH) 添加剂量系统以将 pH 保持在 pH 7.5 不变, 直至水解程度 (DH) = 4%。
- [0067] 将样品加热至 85°C 以使酶失活, 并在感觉小组中测试。
- [0068] 使用三个一组测试 (triangle test) 来比较用微生物胰蛋白酶样蛋白酶所获得水解物与用其它 4 种酶所获得的每一种水解物。6 位小组成员各接受 3 个编码的样品。他们被告知样品中的两个是相同的而一个是不同的。要求各位小组成员鉴别出单独的样品。下表中“正确答案”的数目指明能够鉴别出单独样品的小组成员数。各位小组成员还被要求选出每项三个一组测试中苦味最小的样品。
- [0069] 用 Alcalase、Neutrased 和 Protamex 制备的样品在巴斯德消毒法过程中均具有明显的凝胶化趋势。用 PTN 和微生物胰蛋白酶样蛋白酶制备的样品保持同质。
- [0070] 在味觉评估之前将样品稀释至 3% 蛋白质含量。
- [0071] 下文显示了来自三个一组味觉评估的结果。MTP 是来自尖镰孢的实验用微生物胰蛋白酶样蛋白酶。该评估中包括 6 位小组成员。如果给出至少 5 个正确答案 (第 2 列), 那么认为样品之间的差异是显著的。第 3 列和第 4 列是 (在第 2 列具有正确答案的小组成员中) 发现任一样品具有较小苦味的小组成员的数目:

	正确答案	苦味较小	
[0072] 试验 1, PTN	5	PTN	MTP
		2	3
	4	Alcalase	MTP
			2
[0073] 试验 3, Neutrased	2	Neutrased	MTP
		1	
	3	Protamex	MTP
		2	1

- [0074] 该结果显示了 MTP 和 PTN 生成的样品之间有显著性差异, 其中因为 MTP 生成的样品没有 PTN 生成的样品苦, 所以选择 MTP 生成的样品。MTP 生成的样品和用没有 Lys 和 Arg 特异性的酶 (Alcalase, Neutrased, Protamex) 生成的任何样品之间没有显示显著性差异。
- [0075] 实施例 2
- [0076] 使用 5 种不同的蛋白水解酶来水解来自 Leprino Foods, US 的乳清蛋白浓缩物 (包

含占总干物质约 80% 的蛋白质)。酶和剂量是：

[0077] 来自尖镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶，剂量为 500mg 酶蛋白 /kg 原料。

[0078] PTN 6.0 (Novozymes A/S)，剂量 0.5% 的原料。

[0079] Alcalase 2.4L (Novozymes A/S)，剂量为原料的 0.2%。

[0080] Neutrased 0.8L (Novozymes A/S)，剂量为原料的 1%。

[0081] Protamex 1.5MG (Novozymes A/S)，剂量为原料的 0.5%。

[0082] 添加酶之前将乳清蛋白浓缩物与水 (1 : 9) 混合。

[0083] 水解在烧杯中于 50℃ 发生，所述烧杯安装有碱 (0.1N NaOH) 添加剂量系统以将 pH 保持在 pH 7.5 不变，直至水解程度 (DH) = 4%。

[0084] 将样品加热至 85℃ 以使酶失活，并在感觉小组中测试。

[0085] 使用三个一组测试来比较用微生物胰蛋白酶样蛋白酶所获得水解物与用其它 4 种酶所获得的每一种水解物。7 位小组成员各接受 3 个编码的样品。他们被告知样品中的两个是相同的而一个是不同的。要求各位小组成员鉴别出单独的样品。下表中“正确答案”的数目指明能够鉴别出单独的样品的小组成员数。各位小组成员还被要求选出每项三个一组测试中苦味最小的样品。

[0086] 所有样品在巴斯德消毒法期间 / 之后均保持同质。

[0087] 在味觉评估之前将样品稀释至 3% 蛋白质含量。

[0088] 下文显示了来自三个一组味觉评估的结果。MTP 是来自尖镰孢的实验用微生物胰蛋白酶样蛋白酶。该评估中包括 7 位小组成员。如果给出至少 5 个正确答案 (第 2 列)，那么认为样品之间的差异是显著的。第 3 列和第 4 列是 (在第 2 列具有正确答案的小组成员中) 发现任一样品具有较小的苦味的小组成员数：

	正确答案	苦味较小	
[0089] 试验 1, PTN	5	PTN	MTP
			4
试验 2, Alcalase	6	Alcalase	MTP
			4
试验 3, Neutrased	2	Neutrased	MTP
			2
试验 4, Protamex	3	Protamex	MTP
		3	

[0090] 该结果显示了用 MTP 生成的样品和用 Alcalase 或 PTN 生成的样品之间有显著性差异，其中因为 MTP 生成的样品没有 Alcalase 和 PTN 生成的两种样品苦，所以选择 MTP 生成的样品。

[0091] 实施例 3

[0092] 胰蛋白酶比率的定义、测量和计算

**[0093] 原理**

**[0094]** 为了进行可测量的测定法以测定胰蛋白酶样内肽酶活性,我们使用了 10 种具有通式 Suc-AAPX-pNA 的不同显色底物,在所述通式 Suc-AAPX-pNA 中 X 是 20 种天然氨基酸残基之一的单字母缩写。该内肽酶会在 X 的羧基端一侧进行切割,并释放可以被测量的黄色(对硝基苯胺)。我们使用了可从 Bachem 获得的这 10 种不同 Suc-AAPX-pNA 底物(X = A、R、D、E、I、L、K、M、F 和 V)以进行我们所称的胰蛋白酶比率的测量和计算。

**[0095]** 胰蛋白酶样内肽酶在本发明的语境中可定义为具有大于 100 的胰蛋白酶比率的内肽酶。

**[0096]** 胰蛋白酶比率以对 Suc-AAPR-pNA 或 Suc-AAPK-pNA 的最大活性除以对 8 种其它 Suc-AAPX-pNA 底物之任一种的最大活性来计算:

**[0097]** 胰蛋白酶比率 = 对 Suc-AAP(R/K)-pNA 的最大活性 / 对 Suc-AAP(非 R/K)-pNA 的最大活性

**[0098]** 应当在如下 pH 值进行活性测量,其中在所述 pH 值的活性至少是在最适 pH 的活性的一半。

**[0099] 材料和方法**

**[0100]** Suc-AAPX-pNA 测定法:

**[0101]** 底物: Suc-AAPA-pNA (Bachem L-1775)

**[0102]** Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720)

**[0103]** Suc-AAPD-pNA (Bachem L-1835)

**[0104]** Suc-AAPE-pNA (Bachem L-1710)

**[0105]** Suc-AAPI-pNA (Bachem L-1790)

**[0106]** Suc-AAPL-pNA (Bachem L-1390)

**[0107]** Suc-AAPK-pNA (Bachem L-1725)

**[0108]** Suc-AAPM-pNA (Bachem L-1395)

**[0109]** Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400)

**[0110]** Suc-AAPV-pNA (Bachem L-1770)

**[0111]** 温度: 室温 (25°C)

**[0112]** 测定缓冲液: 100mM 琥珀酸、100mM HEPES、100mM CHES、100mM CABS、1mM CaCl<sub>2</sub>、150mM KCl、0.01% Triton X-100, pH 9.0。

**[0113]** 测定法: 将 20ul (微升) 肽酶稀释物 (在 0.01% Triton X-100 中稀释) 置于微量滴定板的孔中。通过添加 200ul pNA 底物 (50mg 在 1.0ml DMSO 中溶解, 并用测定缓冲液进一步稀释 90x) 来开始该测定法。监测 OD<sub>405</sub> 的起始增加, 作为对肽酶活性的测量。若在 4 分钟测量时间中没有实现线性 (或接近线性) 的曲线, 则进一步稀释肽酶, 并重复该测定法。

**[0114]** 肽酶: Alcalase (Novozymes A/S, Denmark)

**[0115]** 水解无色杆菌赖氨酰-内肽酶 (SEQ ID NO:4)

**[0116]** 来自尖镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶

**[0117]** 猪胰蛋白酶 (Novozymes A/S, Denmark)

**[0118]** 通过层析将所有的酶纯化至高纯度。在经考马斯染色的 SDS-PAGE 凝胶上针对每

种肽酶仅看到一条条带。

[0119] 肽酶的特征：

[0120] Alcalase :对 Suc-AAPF-pNA 的  $\text{pH}_{\text{最佳}} = \text{pH } 9$ 。

[0121] 水解无色杆菌蛋白酶 :对 Suc-AAPK-pNA 的  $\text{pH}_{\text{最佳}} = \text{pH } 10$ 。

[0122] 镰孢属胰蛋白酶样蛋白酶 :对 Boc-VLGR-pNA 的  $\text{pH}_{\text{最佳}} = \text{pH } 10$ 。

[0123] 猪胰蛋白酶 :对 Boc-VLGR-pNA 的  $\text{pH}_{\text{最佳}} = \text{pH } 10$ 。

[0124] 结果

[0125] 肽酶在 pH9 对 Suc-AAPX-pNA 底物的特异性和胰蛋白酶比率的计算：

[0126] 在 pH9 实施特异性实验。如在材料和方法段落中所看到的,3 种测试的肽酶具有  $\text{pH}_{\text{最佳}} > \text{pH } 9$ 。然而,对于这 3 种肽酶,在 pH 9 的活性大于在  $\text{pH}_{\text{最佳}}$  的活性的一半。在下表中显示了该结果：

[0127]

Suc-AAPX-pNA	Alcalase	水解无色杆菌蛋白酶	链孢属胰蛋白酶	猪胰蛋白酶
Suc-AAPA-pNA	0.02497	0.00001	0.00000	0.00001
Suc-AAPR-pNA	0.01182	0.00001	1.00000	1.00000
Suc-AAPD-pNA	0.00053	0.00000	0.00000	0.00000
Suc-AAPI-pNA	0.00026	0.00000	0.00000	0.00000
Suc-AAPM-pNA	0.37582	0.00023	0.00002	0.00031
Suc-AAPV-pNA	0.00033	0.00000	0.00000	0.00000
Suc-AAPL-pNA	0.86502	0.00001	0.00000	0.00002
Suc-AAPE-pNA	0.00289	0.00000	0.00000	0.00000
Suc-AAPK-pNA	0.01900	1.00000	0.53071	0.51396
Suc-AAPF-pNA	1.00000	0.00001	0.00003	0.00057
Suc-AAP(R/K)-pNA 的最大值	0.01900	1.00000	1.00000	1.00000
Suc-AAP(非R/K)-pNA	1.00000	0.00023	0.00003	0.00057

[0128]

的最大值				
------	--	--	--	--

胰蛋白酶比率	0.019	4300	33000	1750
--------	-------	------	-------	------

[0129] 该表中报道的关于每种内肽酶的活性数据是相对于针对最好的 Suc-AAPX-pNA 底物的活性而言的。

[0130] 可以看出,依照我们的定义,水解无色杆菌蛋白酶、镰孢属胰蛋白酶样蛋白酶和猪胰蛋白酶是胰蛋白酶样内肽酶。而 Alcalase 不是胰蛋白酶样内肽酶。

## 序列表

<110> 诺维信公司

<120> 乳清蛋白水解物

<130>11267

<160>8

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>744

<212>DNA

<213> 尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)

<400>1

atggtcaagt tegettccgt cgttgcactt gttgctcccc tggctgctgc cgtcctcag	60
gagateccca acattgttgg tggcacttct gccagcgcgtg gcgactttcc cttcctcgtg	120
agcattagcc gcaacgggtg cccctgggtg ggaggttctc tcctcaacgc caacaccgtc	180
ttgactgctg cccactgcgt ttccggatac gctcagagcg gtttccagat tegtgtggtg	240
agtctgtctc gcaacttctg tggattacc tcctcgcttt cctccgtcag agttaccct	300
agctacagcg gaaacaacaa cgatcttgcg attctgaagc tctctacttc catcccctcc	360
ggcgaaaca teggetatgc tcgctggct gcttccggct ctgaccctgt cgttggatct	420
tctgccactg ttgctggctg gggcgctacc tctgaggcg gcagctctac tcccgtcaac	480
cttctgaagg ttactgtccc tategtctct cgtgctacct gccagctca gtaaggcacc	540
tccgccatca ccaaccagat gttctgtgct ggtgtttctt ccggtggcaa ggactcttgc	600
cagggtgaca gcgcgcccc catcgctgac agctccaaca ctcttatcgg tgetgtctct	660
tggggtaacg gatgtgcccc acccaactac tctgggtgtct atgccagcgt tgggtgtctc	720
cgtcttttca ttgacaccta tget	744

<210>2

<211>248

<212>PRT

<213> 尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)

<400>2

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

<210>3

<211>1959

<212>DNA

<213> 水解无色杆菌 (Achromobacter lyticus)

<400>3

atgaaacgca tttgtggttc cctgctgttg ctcggtttgt cgatcagcgc cgcgctcgc 60

gccccggcct	cgcgccccgc	ggcgttcgat	tacgccaate	tttccagcgt	cgacaaggtc	120
gccttgcgca	ccatgceggc	ggtegacgtg	gccaaggcca	aggccgaaga	tttgcagcgc	180
gacaagecgc	gcgacatecc	gcgettegcc	ctggcgatcg	acgtggacat	gaccctcag	240
aattceggcg	cgtgggaata	caccgcegc	ggccagttcg	ccgtatggcg	ccagcgcgtt	300
cgttcggaga	aggcgctgtc	actgaacttc	ggtttcaccg	actactacat	gcccgccggc	360
ggccgcctgc	tggtatatec	ggcgactcag	gcgccggccg	gcgatcgccg	cttgatcagc	420
cagtacgacg	ccagcaacaa	caactcggcg	cgccaactgt	ggacggcggg	ggtgccgggc	480
gccgaagcgg	tgategaagc	ggtgateccg	cgcgacaagg	tcggcgagtt	caagctgcgc	540
ctgaccaagg	tcaaccacga	ctacgtcggt	ttcgccccgc	tcgcgcccg	cctggccgct	600
gcgtccggcg	agaaggcggt	gtcgggttcg	tgcaacatcg	acgtggtctg	ccccgaaggc	660
gacggccgcc	gcgacatcat	ccgcgcggtc	ggtgcgtact	cgaagagcgg	cacgctggcc	720
tgtaccggtt	cgctggtcaa	caacaccgcc	aacgaccgca	agatgtactt	cctgaccgcg	780
caccactgcg	gcatgggcac	ggcctcgacc	gccgcgtcga	tcgtggtgta	ctggaactat	840
cagaactcga	cctgcccgcg	gcccacacg	ccggccagcg	gcccacacgg	cgacggctcg	900
atgagccaga	cccagtcggg	ttcgacggtc	aaggcgacct	acgccacctc	cgacttcacc	960
ctgctcgagt	tgaacaatgc	ggccaacccc	gcgttcaacc	tgttctgggc	cggttgggac	1020
cgtcgcgacc	agaactatec	cggcgcgate	gcatccacc	atcccacgt	cgccgagaag	1080
cgcacagca	actccaccag	cccgacctcg	ttcgtggcct	ggggcggcgg	cgccggcacc	1140
acgcatttga	acgtgcagtg	gcagccctcg	ggcggcgtga	ccgagccggg	ttcgtcgggt	1200
tcgccgatct	acagcccgga	aaagcgcgtg	ctcgccagc	tgcacggcgg	cccgtcgagc	1260
tgcagcgcca	ccggcaccaa	ccgcagcgac	cagtacggcc	gcgtgttcac	ctcgtggacc	1320
ggcggcggcg	ccgcggcctc	gcgcctgagc	gattggctcg	atccggccag	caccggcgcg	1380
cagttcatcg	acggcctgga	ttcggggcgg	ggcacgccga	acactccgcc	ggtggcgaac	1440
ttcacctcca	ccaccagcgg	cctgaccgcg	accttcaccg	acagctccac	cgacagcgac	1500
ggttcgatcg	cctcgcgtag	ctggaacttc	ggcgacggca	gcacctcgac	cgcgaccaac	1560
ccgagcaaga	cctacgcgcg	ggcgggcacc	tacaccgtca	ccctgacggt	caccgacaac	1620
ggcggcgcca	ccaacaccaa	gaccggttcg	gtcaccgtgt	ccggcggccc	gggtgcgcag	1680
acctacacca	acgacaccga	tgtggcgatc	ccggacaacg	cgacggtcga	aagcccgatc	1740
accgtgtccg	gccgcaccgg	caacggctcg	gcgaccacgc	cgatccaggt	gacgatctac	1800
cacacctaca	agagcgatct	gaaggtggac	ctggtcgcgc	cggacggcac	cgctctaac	1860
ctgcacaacc	gcaccggcgg	cagcgcgcac	aacatcatcc	agaccttcac	caaggacctg	1920
tcgagcgaag	cggctcaacg	ggcacctgga	agctgcggg			1959

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;653

&lt;212&gt;PRT

<213> 水解无色杆菌 (*Achromobacter lyticus*)

&lt;400&gt;4



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





gtcgc ttttga ggaaggttac cattceccatt gtctctcgca ccaacttgccg atcccagtat 540  
 ggcactttctg ccatcaccac caacatgttc tgcgctggcc ttgctgaggg tggaaaggac 600  
 tcttgccagg gcgacagegg tggteccatt gtcgacacct ccaacactgt cattggcatt 660  
 gtttcttggg gtgagggttg tgctcagecc aacttctctg gtgtctatgc ccgcgttggc 720  
 agcctccgct cttacattga cggccagctg 750

<210>8

<211>250

<212>PRT

<213> 腐皮镰孢相似种 (*Fusarium cf. solani*)

<400>8

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  
 Ser Leu Asn Arg Asn Ser Gly Gly Val Thr Ser Ala Val Ser Ser Ile  
                   85                    90                    95  
 Arg Ile His Pro Ser Phe Ser Gly Ser Thr Leu Asn Asn Asp Val Ser  
                   100                    105                    110  
 Ile Leu Lys Leu Ser Thr Pro Ile Ser Thr Ser Ser Thr Ile Ser Tyr  
                   115                    120                    125  
 Gly Arg Leu Ala Ala Ser Gly Ser Asp Pro Ala Ala Gly Ser Asp Ala  
                   130                    135                    140  
 Thr Val Ala Gly Trp Gly Val Thr Ser Gln Gly Ser Ser Ser Ser Pro  
 145                    150                    155                    160  
 Val Ala Leu Arg Lys Val Thr Ile Pro Ile Val Ser Arg Thr Thr Cys  
                   165                    170                    175  
 Arg Ser Gln Tyr Gly Thr Ser Ala Ile Thr Thr Asn Met Phe Cys Ala  
                   180                    185                    190  
 Gly Leu Ala Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly  
                   195                    200                    205  
 Pro Ile Val Asp Thr Ser Asn Thr Val Ile Gly Ile Val Ser Trp Gly

