



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112218544 A

(43) 申请公布日 2021.01.12

(21) 申请号 201980037313.5

(22) 申请日 2019.06.03

(30) 优先权数据

18176428.3 2018.06.07 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/064278 2019.06.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/233923 EN 2019.12.12

(71) 申请人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司

地址 荷兰海尔伦

(72) 发明人 莫妮卡·戴安娜·弗拉西

马可·亚历山大·范登博格

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 肖善强

(51) Int.Cl.

A23L 27/30 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

肽酰基精氨酸脱亚氨酶用于获得改良的甜
蛋白的用途

(57) 摘要

本发明描述了一种用于修饰甜蛋白或味道
改良蛋白的方法,所述方法包括将甜蛋白溶液或
味道改良蛋白溶液与肽酰精氨酸脱亚氨酶(PAD)
一起孵育。

1. 一种用于修饰甜蛋白或味道改良蛋白的方法,所述方法包括将甜蛋白溶液或味道改良蛋白溶液与肽酰精氨酸脱亚氨酶(PAD)一起孵育。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法是用于减少所述甜蛋白的余味的方法。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法是用于缩短感知到所述甜蛋白的甜味的用的方法。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法是用于缩短感知到所述甜味开始的时间的方法。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述甜蛋白或所述味道改良蛋白为奇异果甜蛋白、油菜籽蛋白、应乐果甜蛋白、布拉奇因/培它丁、马槟榔甜蛋白、卵清溶菌酶、神秘果蛋白或neocurlin/仙茅甜蛋白。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述油菜籽蛋白是芸苔籽蛋白。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述PAD是微生物PAD。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述肽酰精氨酸脱亚氨酶(PAD)与SEQ ID NO:1具有至少80%的同一性,或与SEQ ID NO:1的成熟氨基酸序列具有至少80%的同一性。

9. 一种经修饰的甜蛋白,所述经修饰的甜蛋白

-可通过根据权利要求1至8中任一项所述的方法获得,或者

-其中至少1个精氨酸被转换为瓜氨酸。

10. 一种经修饰的味道改良蛋白,所述经修饰的味道改良蛋白

-可通过根据权利要求1至8中任一项所述的方法获得,或者

-其中至少1个精氨酸被转换为瓜氨酸。

11. 肽酰精氨酸脱亚氨酶(PAD)用于减少甜蛋白的余味的用途或用于缩短感知到甜蛋白的甜味的用的用途或用于缩短感知到甜味开始的时间的用的用途。

12. 一种组合物,所述组合物包含甜蛋白或味道改良蛋白和肽酰精氨酸脱亚氨酶(PAD)。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述PAD被灭活。

14. 一种食物或饮料,所述食物或饮料包含根据权利要求12或13所述的组合物。

15. 一种用于生产食物或饮料的方法,所述方法包括

-将根据权利要求12或13所述的组合物添加到食物或饮料或其中间体中,或者

-将甜蛋白或味道改良蛋白和PAD添加到食物或饮料或其中间体中,或者

-添加通过根据权利要求1至8中任一项所述的方法获得的经修饰的甜蛋白,或者

-添加通过根据权利要求1至8中任一项所述的方法获得的经修饰的味道改良蛋白。

肽酰基精氨酸脱亚氨酶用于获得改良的甜蛋白的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及食品领域。

背景技术

[0002] 奇异果甜蛋白 (thaumatin) 是一种低热量的甜味剂和风味改良剂。该蛋白质往往主要是因其具有风味改良特性而被使用, 而非仅用作甜味剂。甜味剂的奇异果甜蛋白家族中的一些蛋白质的效力是糖的约2000倍。尽管非常甜, 但是奇异果甜蛋白的味道却与糖明显不同。奇异果甜蛋白的甜味非常缓慢地建立。感知长时间持续, 在高使用水平时会留下甘草样余味。能够感知到甜蛋白的甜味以及余味的相对较晚的时间点阻碍了甜蛋白作为甜味剂的用途。

[0003] 本发明的目的是改善甜蛋白的特性。

[0004] 令人惊讶地, 可以通过将甜蛋白与肽酰精氨酸脱亚氨酶 (PAD) 一起孵育来实现该目的。

附图说明

[0005] 图1: 使用或不使用PAD处理的2%油菜籽蛋白分离物溶液的感官属性。■: 未用PAD处理的油菜籽蛋白分离物溶液的感官属性; ◆: 用2U PAD/L处理的油菜籽蛋白分离物溶液的感官属性; ▲: 用20U PAD/L处理的油菜籽蛋白分离物溶液的感官属性; ●: 用60U PAD/L处理的油菜籽蛋白分离物溶液的感官属性。感官属性是涩味口感 (I)、风味强度 (II)、甜味 (III)、苦味 (IV)、甘草味 (V)、苦余味 (VI), 余味持续时长 (VII) 和涩余味 (VIII)。

[0006] 图2: 在使用和不使用PAD的情况下, 油菜籽蛋白质溶液的甜味强度随着时间推移的发展。■: 2%的油菜籽蛋白分离物溶液, 未添加PAD; ◆: 2%的油菜籽蛋白分离物溶液, 添加了2U PAD/L; ▲: 2%的油菜籽蛋白分离物溶液, 添加了20U PAD/L; x: 2%的油菜籽蛋白分离物溶液, 添加了60U PAD/L。X轴: 时间 (秒), Y轴: 相对甜度 (%), 其中将每个样品的甜度归一化为在吞咽后5秒为100%。-5秒处的箭头指示吞咽前在口中直接感知到的甜味, 而0秒表示紧接在吞咽样品后的甜味。

[0007] 序列表

[0008] SEQ ID NO:1为来自禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 的肽酰精氨酸脱亚氨酶

发明内容

[0009] 本发明涉及一种用于修饰甜蛋白或味道改良蛋白的方法, 所述方法包括将甜蛋白溶液或味道改良蛋白溶液与肽酰精氨酸脱亚氨酶 (PAD) 一起孵育。

[0010] 在另一个方面中, 本发明提供了一种经修饰的甜蛋白或经修饰味道改良蛋白。

[0011] 在又一个方面中, 本发明提供了PAD用于改善味道改良蛋白或味道改良蛋白的多种味道特性的用途。

[0012] 在又一个方面中, 本发明提供了一种包含甜蛋白或味道改良蛋白和PAD的组合物,

以及一种包含此类组合物的食物或饮料。

[0013] 本发明还提供了一种用于生产食物或饮料的方法。

具体实施方式

[0014] 甜蛋白 (sweet protein) 发现于主要是热带来源的植物中, 并且可为非常甜的, 比蔗糖甜几个数量级 (例如奇异果甜蛋白、应乐果甜蛋白、布拉奇因 (brazzein)), 或者具有与糖类似的甜度, 例如卵溶菌酶。除了都是甜的之外, 到目前为止, 在这些蛋白质之间还没有识别出序列或结构同源性。然而, 它们被提出与同小甜味分子一样的相同甜味受体相互作用, 尽管是以与小甜味分子不同的相互作用模式。某些特征被认为对于这些甜蛋白与甜味受体相互作用而言是重要的。一种此类特征是在结合界面处存在带正电的残基 (Keisuke Ohta等人, The FEBS Journal 2008, 第275卷, 第3644-3652页)。已经表明, 其中精氨酸残基被交换为丙氨酸或赖氨酸的奇异果甜蛋白突变体改变该蛋白质的甜度阈值。然而, 在一个突变体 (单突变体) 中, 并非所有的精氨酸残基都被修饰并且一次突变不超过一个残基。另外, 尽我们所知, 迄今为止, 没有人描述甜蛋白中有从精氨酸残基到瓜氨酸残基的变化。

[0015] 令人惊讶地, 本发明的发明人在此表明, 通过添加精氨酸修饰酶PAD将精氨酸改变为瓜氨酸, 改变了甜蛋白的甜味感知。因此, 本发明提供了一种用于修饰蛋白质的至少一个感官方面的方法, 所述方法包括将所述蛋白质与PAD一起孵育。

[0016] 甜蛋白和味道改良蛋白已在现有技术中描述。然而, 由于事实上这些蛋白质也具有一些缺点, 因此几乎不使用它们。

[0017] 令人惊讶地, 本发明的发明人在本文中表明, 可以通过用肽酰精氨酸脱亚氨酶处理甜蛋白或通过用肽酰精氨酸脱亚氨酶处理味道改良蛋白来克服这些缺点中的一些缺点。

[0018] 本发明提供了一种用于修饰甜蛋白或味道改良蛋白的方法, 所述方法包括将甜蛋白溶液或味道改良蛋白溶液与肽酰精氨酸脱亚氨酶 (PAD) 一起孵育。

[0019] PAD可用于改良甜蛋白的特性, 因此本发明提供了一种用于修饰甜蛋白的方法, 所述方法包括将甜蛋白溶液与肽酰精氨酸脱亚氨酶 (PAD) 一起孵育。可以改良甜蛋白的不同特性, 例如但不限于余味、感知到甜味的时间段或甜味的发生。因此, 本发明提供了

[0020] 一种用于减少所述甜蛋白的余味的方法, 所述方法包括将甜蛋白溶液与肽酰精氨酸脱亚氨酶 (PAD) 一起孵育,

[0021] 一种用于缩短感知到所述甜蛋白的甜味的时间的方法, 所述方法包括将甜蛋白溶液与肽酰精氨酸脱亚氨酶 (PAD) 一起孵育, 或者

[0022] 一种用于缩短感知到甜味发生的时间的方法, 所述方法包括将甜蛋白溶液与肽酰精氨酸脱亚氨酶 (PAD) 一起孵育。

[0023] PAD还可以用于改良味道改良蛋白的特性, 因此本发明提供了一种用于修饰味道改良蛋白的方法, 所述方法包括将味道改良蛋白溶液与肽酰精氨酸脱亚氨酶 (PAD) 一起孵育。

[0024] 如本文所用的术语甜蛋白是指经由一个或多个精氨酸 (Arg) 残基与人甜味受体 (T1R2-T1R3受体, 位于舌头上的专门细胞上的异二聚G蛋白偶联受体) 结合并在人中引起甜味感觉的蛋白。优选地, 如本文所用的术语甜蛋白是指具有甜味 (即, 当食用富含糖的食物时最常感知到的基本味道) 的蛋白质。甜蛋白通常发现于热带植物中。甜蛋白的示例是奇异

果甜蛋白、应乐果甜蛋白 (monellin)、布拉奇因 (或培它丁 (pentadin) 或布拉奇因/培它丁, 这些术语在本文中可互换使用)、或马槟榔甜蛋白 (mabinlin)。然而, 甜蛋白也可从除热带植物以外的其他来源获得。后一种甜蛋白的示例是卵清溶菌酶或油菜籽蛋白。优选地, 所述溶菌酶来源于母鸡、火鸡、鹌鹑、珍珠鸡或甲鱼。卵清溶菌酶更优选为鸡蛋清溶菌酶或火鸡蛋清溶菌酶。油菜籽蛋白分离物可包含不同的蛋白质, 例如十字花科蛋白 (cruciferin) 和芸苔籽蛋白 (napin)。优选地, 油菜籽蛋白是芸苔籽蛋白。优选地, 甜蛋白是奇异果甜蛋白、应乐果甜蛋白、布拉奇因、马槟榔甜蛋白、卵清溶菌酶或油菜籽蛋白。如本文所用的术语味道改良蛋白是指经由一个或多个精氨酸 (Arg) 残基与人甜味受体 (T1R2-T1R3受体, 位于舌头上的专门细胞上的异二聚G蛋白偶联受体) 结合并且 (i) 可将感知从酸味改变成甜味而无需品尝甜味本身, 或者 (ii) 可将感知从酸味改变成甜味并在人中引发甜味感觉的蛋白质。如本文所用的术语“味道改良蛋白”是指没有甜味或几乎没有甜味但具有将酸味改变成甜味的特性的蛋白质。味道改良蛋白的示例是神秘果蛋白 (miraculin) 或仙茅甜蛋白 (curculin) (或neoculin或仙茅甜蛋白/neoculin, 这些术语在本文中可互换使用)。

[0025] 在一个优选的实施方式中, 甜蛋白或味道改良蛋白是奇异果甜蛋白、应乐果甜蛋白、布拉奇因/培它丁、马槟榔甜蛋白、卵清溶菌酶、油菜籽蛋白、神秘果蛋白或neocurlin/仙茅甜蛋白。

[0026] 术语“改良”或“修饰”是指增加或减少 (或缩短), 但是如上所述, 其优选是指减少 (或缩短)。

[0027] 通过与已经在相同但不存在PAD的条件下孵育的甜蛋白进行比较, 确定了上述特性 (例如余味) 是增加还是减少。

[0028] 术语“甜蛋白溶液”是指甜蛋白的液体溶液。如果起始点是甜蛋白粉末 (即, 包含甜蛋白的粉末), 则本发明的方法包括附加步骤, 在所述附加步骤中通过以下方式来使甜蛋白粉末至少部分地溶于水或缓冲溶液中: 将甜蛋白粉末添加到水或缓冲溶液中, 并使所述粉末至少部分地溶于所述液体中。取决于甜蛋白粉末的特性, 可能需要任选地使用一些热量将所述粉末与液体混合一定量的时间以改良/加速溶解过程。或者, 在水或合适的缓冲液中制备悬浮液。即, 本发明方法的任选附加步骤是: 包括溶解甜蛋白粉末以获得甜蛋白溶液或获得甜蛋白悬浮液。

[0029] 术语“味道改良蛋白溶液”是指味道改良蛋白的液体溶液。如果起始点是味道改良蛋白粉末 (即, 包含味道改良蛋白的粉末), 则本发明的方法包括附加步骤, 在所述附加步骤中通过以下方式来使味道改良蛋白粉末至少部分地溶于水或缓冲溶液中: 将味道改良蛋白粉末添加到水或缓冲溶液中, 并使所述粉末至少部分地溶于所述液体中。取决于味道改良蛋白粉末的特性, 可能需要任选地使用一些热量将所述粉末与液体混合一定量的时间以改良/加速溶解过程。或者, 在水或合适的缓冲液中制备悬浮液。即, 本发明方法的任选附加步骤是: 包括溶解味道改良蛋白粉末以获得甜蛋白溶液或获得甜蛋白悬浮液。

[0030] “将甜蛋白溶液或味道改良蛋白溶液与肽酰精氨酸脱亚氨酶 (PAD) 一起孵育”的步骤可以在任何合适的pH下以任何合适的时间和任何合适的酶浓度执行。技术人员将能够确定合适的酶量或合适的孵育温度或合适的孵育pH或合适的孵育时间, 例如将蛋白质与肽酰精氨酸脱亚氨酶一起在介于4与9之间的pH, 例如介于5与8.5之间的pH, 例如介于5.5与8之间的pH, 例如介于6与7之间的pH, 或介于6.2与6.8之间的pH, 例如约6.5的pH下孵育。蛋白质

与PAD一起孵育的合适温度可介于20摄氏度与60摄氏度之间,例如介于30摄氏度与50摄氏度之间,或介于35摄氏度与45摄氏度之间。

[0031] 术语蛋白质精氨酸脱亚氨酶和肽酰精氨酸脱亚氨酶(PAD)在本文中可互换使用。蛋白质精氨酸脱亚氨酶或肽酰精氨酸脱亚氨酶属于将结合肽或蛋白质的精氨酸转化为结合肽或蛋白的瓜氨酸的酶(EC 3.5.3.15)的家族。该过程被称为脱氨基或瓜氨酸化。在从精氨酸到瓜氨酸的反应中,精氨酸侧链的末端氮原子中的一个末端氮原子被氧取代。该反应使用一个水分子,并且产生氨作为副产物(<http://en.wikipedia.org/wiki/Citrullination>)。精氨酸在中性pH下带正电,然而瓜氨酸不带电。令人惊讶地,发现其中至少一部分精氨酸已被转化为瓜氨酸并由此产生了带较少电荷的蛋白质显示出改良的甜度、甘草味、涩味、粉状/粉化(powdery/chalk)、饱满度、稠度和/或可消化性。

[0032] 肽酰精氨酸脱亚氨酶(PAD)可以来源于任何合适的来源,例如来源于哺乳动物或微生物来源。本发明中使用的PAD有利地来源于微生物来源,即,在本发明的方法中使用的PAD是微生物PAD。例如,PAD可以来源于真菌来源,例如来源于镰刀菌属(*Fusarium* sp.),例如禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)、颖枯壳针孢(*Phaesphaeria nodorum*);或来源于细菌来源,例如来源于细菌链霉菌属(*Streptomyces*),例如疮痂病链霉菌(*Streptomyces scabies*)、棒状链霉菌(*Streptomyces clavuligeres*)。关于如本文所公开的多肽的来源的字词“来源于……的”或“可来源于……的”是指当用如本文所公开的多肽进行BLAST搜索时,所述多肽可以来源于天然来源,例如微生物细胞,所述天然来源的内源多肽显示出与如本文所公开的多肽的最高同源性或同一性百分比。

[0033] 肽酰精氨酸脱亚氨酶是已知的,例如从W02008/000714已知。W02008/000714公开了一种用蛋白质精氨酸脱亚氨酶来酶促处理蛋白质的方法,其中至少30%的精氨酸被转化为瓜氨酸。

[0034] 肽酰精氨酸脱亚氨酶可以是纯的或经纯化的肽酰精氨酸脱亚氨酶。纯的或经纯化的肽酰精氨酸脱亚氨酶可以是可为至少50%纯,例如至少60%纯、至少70%纯、至少75%纯、至少80%纯、至少85%纯、至少80%纯、至少90%纯,或至少95%纯、96%纯、97%纯、98%纯、99%纯、99.5%纯、99.9%纯的酶,所述纯度例如可通过SDS-PAGE或任何其他适用于此目的并且为本领域技术人员所已知的分析方法来测定。

[0035] 优选地,所使用的肽酰精氨酸脱亚氨酶是非Ca²⁺依赖性的。更优选地,所使用的肽酰精氨酸脱亚氨酶是微生物PAD,并且是非Ca²⁺依赖性的。

[0036] 有利地,在本发明的方法中使用的肽酰精氨酸脱亚氨酶是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的成熟氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的多肽,其中所述多肽具有肽酰精氨酸脱亚氨酶活性。

[0037] 出于本发明的目的,在此限定,为了确定两个氨基酸序列的序列同一性百分比,对序列进行比对以实现最佳比较目的。为了优化两个序列之间的比对,可以在进行比较的两个序列中的任一序列中引入空位。此类比对可以在被比较的序列的全长上进行。或者,可以在较短的长度上进行比对,例如在约20个、约50个、约100个或更多个氨基酸上进行比对。序列同一性是两个序列之间在所报告的比对区域上相同匹配的百分比。两个氨基酸序列之间的序列同一性百分比可以使用用于比对两个序列的Needleman和Wunsch算法来确定。(Needleman, S.B. 和 Wunsch, C.D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453)。该氨基酸序列和核苷酸

序列都可以通过算法来进行比对。已在计算机程序NEEDLE中实现了Needleman-Wunsch算法。出于本发明的目的,使用来自EMBOSS程序包的NEEDLE程序(2.8.0版或更高版本,EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite(2000)Rice, P.Longden,I.和Bleasby,A.Trends in Genetics 16,(6),第276-277页,<http://emboss.bioinformatics.nl/>)。对于蛋白质序列,使用EBL0SUM62来用于取代矩阵。所使用的任选参数是为10的空位开放罚分和为0.5的空位延伸罚分。技术人员将理解,当使用不同的算法时,所有这些不同的参数将产生略微不同的结果,但是两个序列的总体同一性百分比不会显著改变。

[0038] “成熟多肽”在本文中定义为这样的多肽,所述多肽处于其最终形式下并且是在将mRNA翻译成多肽并对所述多肽进行翻译后修饰后获得的。翻译后修饰包括N-末端加工、C-末端截短、糖基化、磷酸化(pohosphorylation),以及通过切割去除前导序列(例如信号肽、前肽和/或前原肽)。

[0039] SEQ ID NO:1的成熟多肽序列可包含或含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸19、20、21、22、23、24至640,有利地,SEQ ID NO:1的成熟多肽序列包含或含有SEQ ID NO:1的氨基酸22至640,其中在SEQ ID NO:1中的位置1处的甲硫氨酸被计数为序数1。

[0040] 术语“多肽”是指包含通过肽键连接的氨基酸残基并含有多于五个氨基酸残基的分子。如本文所用的术语“蛋白质”与术语“多肽”同义,并且还可以指两种或更多种多肽。因此,术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用。可任选地修饰(例如,糖基化、磷酸化、酰化、法尼基化、异戊烯基化、磺化等)多肽以增加官能性。在某些条件下在特定底物存在下表现出活性的多肽可称为酶。

[0041] 肽酰精氨酸脱亚氨酶或具有肽酰精氨酸脱亚氨酶活性的多肽可以通过本领域中已知的方法在任何合适的宿主生物中产生,例如在真菌曲霉属(*Aspergilli*) (例如黑曲霉(*Aspergillus niger*)或米曲霉(*Aspergillus oryzae*))、木霉属(*Trichoderma*)或酵母酵母属(*Saccharomyces*)和克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)中或在链霉菌属(*Streptomyces*)或杆菌属(*Bacilli*)的细菌中产生。一种在黑曲霉中表达具有肽酰精氨酸脱亚氨酶活性的多肽的合适方法例如在W02008/000714的实施例3和4中公开,所述专利文献以引用方式包括在本文中。

[0042] 在又一个方面中,本发明提供了一种经修饰的甜蛋白,所述经修饰的甜蛋白

[0043] -可通过本发明的方法(如上所述)获得,或者

[0044] -其中至少1个精氨酸被转化为瓜氨酸。

[0045] 在又一个方面中,本发明提供了一种经修饰的味道改良蛋白,所述经修饰的味道改良蛋白

[0046] -可通过本发明的方法(如上所述)获得,或者

[0047] -其中至少1个精氨酸被转换为瓜氨酸。

[0048] PAD将结合肽或蛋白质的精氨酸转换为结合肽或蛋白质的瓜氨酸,因此可以容易地确定甜蛋白或味道改良蛋白是否被瓜氨酸化/脱酰氨基。甜蛋白或味道改良蛋白中瓜氨酸的存在可以例如经由本领域技术人员众所周知的氨基酸分析来确定。

[0049] 本发明还提供了肽酰精氨酸脱亚氨酶(PAD)用于减少甜蛋白的余味或缩短感知到甜蛋白的甜味的时间的用途,或用于缩短感知到甜味发生的时间的方法。

[0050] 本发明还提供了一种组合物,所述组合物包含甜蛋白或味道改良蛋白和肽酰精氨酸脱亚氨酶(PAD)。优选地,所述PAD被灭活。PAD的灭活可以例如通过在将所述甜蛋白或味道改良蛋白与所述PAD一起孵育之后进行热处理来获得。

[0051] 本发明还提供了一种食物或饮料,所述食物或饮料包含

[0052] -包含甜蛋白或味道改良蛋白和肽酰精氨酸脱亚氨酶(PAD)的组合物,或者

[0053] -经修饰的甜蛋白,其中至少1个精氨酸被转化为瓜氨酸,或者

[0054] -经修饰的味道改良蛋白,其中至少1个精氨酸被转化为瓜氨酸。

[0055] 甜蛋白和味道改良蛋白通常用于提供具有甜味或具有减少的酸味的食物或饮料。

本发明还提供了一种用于生产食物或饮料的方法,所述方法包括

[0056] -将如本文所述的组合物添加到食物或饮料或其中间体中,或者

[0057] -将甜蛋白或味道改良蛋白和PAD添加到食物或饮料或其中间体中,或者

[0058] -添加通过如本文所述的方法获得的经修饰的甜蛋白,或者

[0059] -添加通过如本文所述的方法获得的经修饰的味道改良蛋白。

[0060] 本发明将在下面的实施例中更详细地解释,所述实施例不限制本发明。

[0061] 实施例1

[0062] 对用PAD酶处理过的油菜籽蛋白分离物(RPI)的感官评定

[0063] 将每个样品在自来水中制成1000ml 2% RPI蛋白粉悬浮液(校正了蛋白质含量的植物蛋白粉),并用4M H_2SO_4 将pH调节至pH6.5。

[0064] 如专利申请W0 2018/007492中所述,从冷榨油菜籽油籽粕制备油菜籽蛋白分离物。

[0065] 在使用和不使用以不同酶剂量添加的PAD酶的情况下,将悬浮液在45℃下孵育2小时。通过将材料在65℃加热达5分钟的保持时间,来使酶失活。由感官小组(n=13)借助于描述性分析(QDA)对样品的与测试产品相关的属性进行评估。在测试期间,样品是根据最佳平衡的设计提供的,并一式两份地在EyeQuestion中以0-100非结构化线标度进行评分。使用方差分析(ANOVA)分析数据,以发现各个样品之间的显著差异。 $p < 0.05$ 的差异被认为是显著的(图1)。通过用PAD酶处理RPI,所测试的所有感官属性(例如甜味、甘草味、涩味、苦味、余味持续时长(如附图图例中所描述的))都随着PAD添加量的增加而降低。

[0066] 实施例2

[0067] 对用PAD处理过的油菜籽蛋白分离物的甜味时间强度评定

[0068] 在自来水中制备油菜籽蛋白粉末的水性悬浮液(1000mL, 2% w/w),并用4M H_2SO_4 将pH调节至6.5。在不使用PAD和使用以不同酶剂量添加的PAD的情况下,将悬浮液在45℃下孵育2小时。通过将材料在65℃加热达5分钟的保持时间,来进一步使酶失活。训练有素的专家组(n=12)在以下几个时间点对样品的甜味强度进行评定:紧接在进食后;在吞咽样品三秒后再次对强度进行评分,以及在吞咽后5秒、10秒、20秒、30秒、60秒和120秒进行进一步评分。在EyeQuestion中以非结构化的0-100线标度给出强度得分。将样品一式两份进行评估,并根据最佳平衡的设计提供。使用方差分析分析数据,以发现各个样品之间的显著差异; $p < 0.05$ 的差异被认为是显著的。时间甜味特性如图2所示。将每个样品的甜味归一化为吞咽后5秒时的100%。用PAD酶处理过的蛋白质样品显示出更快的甜味发生(在口中以及紧接在吞咽后感知到甜味),同时在经酶处理的样品中甜味强度在吞咽后5秒钟更迅速地降低。甜

味感知的变化被视为如实施例1中一样为PAD酶剂量依赖性的。

[0069] 实施例3

[0070] 用PAD处理过的奇异果甜蛋白的甜度特性

[0071] 将从Naturex (Talin T-0004) 获得的奇异果甜蛋白在水中以50百万分率 (ppm) 的浓度制备。向该溶液中添加50mU PAD/L, 并在45℃下孵育2小时。然后通过将溶液在65℃加热达5分钟的保持时间, 来使酶失活。由10人组成的经验丰富小组品尝使用和不使用PAD酶处理的奇异果甜蛋白溶液。使用PAD酶处理的甜味强度变化和使用酶添加的甜味时间特性与关于油菜籽蛋白质所描述的 (分别为实施例1和实施例2) 相似。PAD酶降低了奇异果甜蛋白的甜味强度, 同时甜味的发生更快并且甜味感觉的持续时间缩短。

序列表

<110> 帝斯曼知识产权资产管理有限公司
 <120> 肽酰基精氨酸脱亚氨酶用于获得改良的甜蛋白的用途
 <130> 32965-W0-PCT
 <160> 1
 <170> SIP0SequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> 禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)
 <400> 1
 Met His Leu Leu Asn Gly Lys Thr Ala Ala Val Ala Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Asn Ser Cys Asn Ala Leu Lys Val Thr Ile Leu Ala Asp Thr Asn Arg
 20 25 30
 Asp Gly Lys Val Asp Asn Asn Asp Ile Asn Gly Lys Ser Thr Trp Thr
 35 40 45
 Asn Asn Arg Gly Ala Leu Ile Leu Pro Asn Ile Gly Asp Thr Gly Ser
 50 55 60
 Arg Cys Ala Lys Gln Trp Gly Pro Ser Val Asp Ile Gln Gly Asp Glu
 65 70 75 80
 Ser Tyr Leu Asp Lys Cys Asn Asp Ala Ser Asp Asn Val Gln Arg Asn
 85 90 95
 Pro Lys Tyr Leu Ala Ser Leu Lys Thr Leu Pro Leu Thr Thr Leu Ser
 100 105 110
 Ala Thr Ala Lys Gly Ser Ile Ile Ile Ala Asp Lys Thr Gly Ala Ser
 115 120 125
 Lys Val Arg Ile Phe Val Lys Gln Ser Gly Lys Trp Asn Tyr Val Ala
 130 135 140
 Ala Asp His Val Phe Thr Ala Lys Glu Leu Lys Ser Gly Leu Glu Leu
 145 150 155 160
 Gly Val Asp Ala Arg Asp Val Arg Arg Pro Gln Asp Trp Asn Gly Tyr
 165 170 175
 Ala Lys Ile Gln Phe Thr Val Thr Asp Gly Lys Thr Lys Ala Thr Asp
 180 185 190
 Ala Val Ala Val Arg Val Ala Pro Val Leu Thr His His His Gly Gln
 195 200 205
 His Ala Gln Arg Ile Phe Thr Thr Gly Val Asn Glu Ala Gly Val Asn

210	215	220
Lys Val Gln Glu Thr Phe	Ile Ala Asp Ile Leu Arg Asn Val Ala Gly	
225	230	235
Ala Gly Ile Lys Glu Pro Val Phe Gln Phe His Asn Gln Asp Ile Trp		240
245	250	255
Thr Gln Asp Phe Phe Glu Pro Gly Tyr Ala Ser Ile Pro Gly Pro Asn		
260	265	270
Gly Pro Val Ser Ile Arg Ile Met Ile Arg Ser Ala Gln Ser Ser Arg		
275	280	285
Arg Ser Gly Arg Asp Ala Phe His Asp Leu Arg Asn Asp Gln Val Gly		
290	295	300
Ala Val Gln His Pro Gly Asp Gly Asp Ser Ile Asp Ser Thr Gly Asn		
305	310	315
Leu Glu Thr Ile Pro Pro Tyr Ser His Asn Gly Lys Ser Phe Pro Val		
325	330	335
Gly Arg Thr Ile Met Gly Ala Trp Asp Gly Arg Ala Pro Leu Met Val		
340	345	350
Glu Phe Leu Lys Ala Gln Gln Val Gln Glu Pro Leu Ile Leu Asp Thr		
355	360	365
Ser Trp Leu Tyr Val Gly His Val Asp Glu Phe Ile Gln Phe Leu Pro		
370	375	380
Ser Asn Asn Lys Leu Gly Trp Val Ile Met Val Ala Asp Pro Met Lys		
385	390	395
Gly Val Asp Leu Leu Lys Lys Ala Val Lys Thr Gly His Gly Lys Val		
405	410	415
Lys Ala Val Ser Arg Pro Leu Ser Ala Asp Glu Lys Lys Glu Gln Leu		
420	425	430
Cys Leu Pro Arg Gln Thr Ile Ala Glu Ala Leu Lys Phe Lys Ser Phe		
435	440	445
Asp Ala Ile Asn Lys His Ser Ala Glu Arg Ile Gln Ala Asn Leu Asp		
450	455	460
Ile Ile Lys Arg Glu Thr Gly Ile Thr Asp Glu Asp Ile His Arg Val		
465	470	475
Pro Ala Leu Phe Tyr Tyr Thr Gln Ser Asn Ser Trp Leu Cys Pro Gly		
485	490	495
Glu Thr Ala Glu Asp Asp Ser Ala Gln Pro Gln Lys Ala Ala Ser Asn		
500	505	510
Ser Gly Ile Thr Met Lys Thr Ser Gln Gly Gly Pro Gly Phe Lys Ala		
515	520	525

Lys	Ser	Ile	Val	Glu	Ala	Ala	Thr	Pro	Gly	Lys	Ser	Ile	Gln	Arg	Arg
530															
Val	Ile	Asp	Pro	Ala	Thr	Gln	Val	Thr	Ala	Leu	Tyr	Pro	Gly	Ser	Val
545															
Asn	Gly	Leu	Val	Met	Thr	Asp	Thr	Lys	Ile	Leu	Ala	Pro	Ser	Pro	Trp
Gly	Pro	Val	Ile	Asn	Lys	Gln	Asp	Ile	Phe	Ala	Ala	Ala	Val	Ser	Gln
Val	Tyr	Thr	Asn	Ala	Gly	Tyr	Asn	Val	Thr	Tyr	Gln	Asp	Asp	Trp	Phe
Ser	His	Phe	Lys	Leu	Gln	Gly	Asp	Val	His	Cys	Gly	Ser	Asn	Ser	Trp
610															
Arg	Glu	Ile	Pro	Lys	Lys	Trp	Trp	Asp	Ser	Leu	Arg	Val	Asn	Asn	Tyr
625															

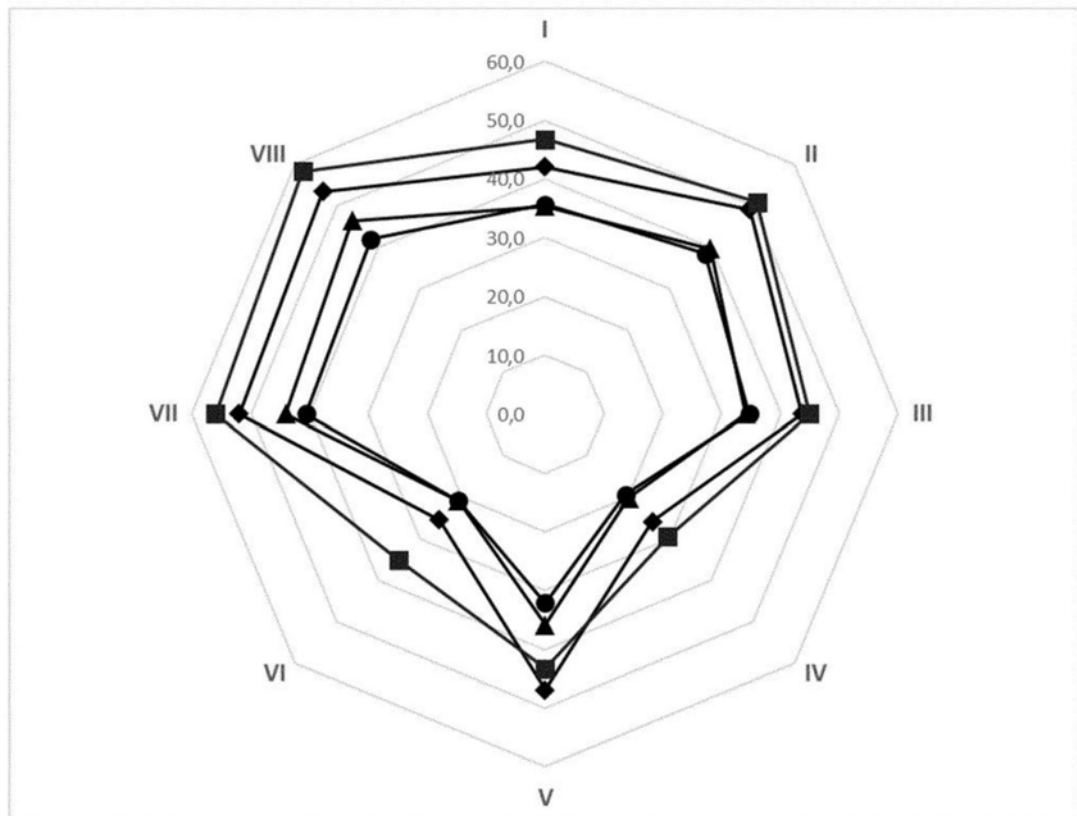


图1

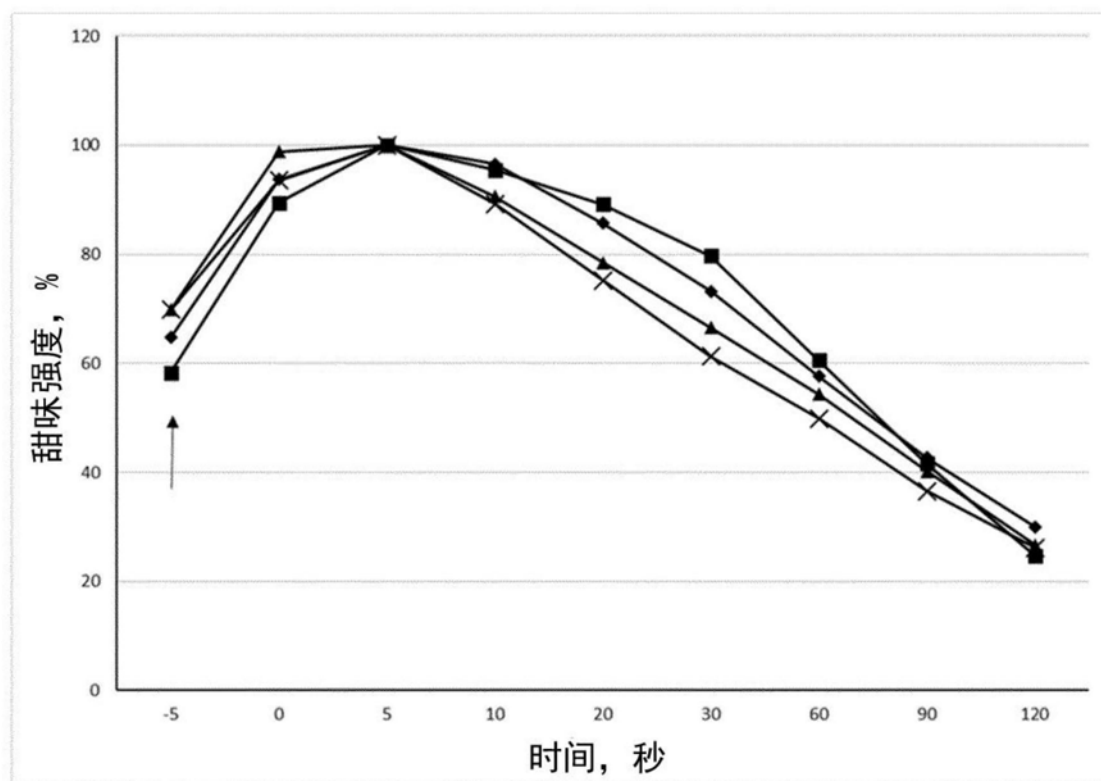


图2