



(10) 申请公布号 CN 120091761 A

(43) 申请公布日 2025.06.03

(21) 申请号 202280101253.0

(22) 申请日 2022.11.30

(30) 优先权数据

22203319.3 2022.10.24 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.04.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/083877 2022.11.30

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2024/088550 EN 2024.05.02

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 H·伦德奎斯特 C·瓦尔明

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 邵红 罗琪

(51) Int.Cl.

A21D 8/04 (2006.01)

C12N 9/34 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

A21D 13/062 (2006.01)

A21D 2/26 (2006.01)

A21D 13/045 (2006.01)

A21D 13/064 (2006.01)

C12N 9/26 (2006.01)

权利要求书2页 说明书29页

序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

采用热稳定淀粉葡萄糖苷酶变体(EC 3.2.1.3)的豆类蛋白质强化面包的烘焙方法

(57) 摘要

披露了生产烘焙或部分烘焙产品的方法,这些方法包括提供面团,该面团包含添加的豆类和/或豆荚蛋白质以及与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10具有至少70%同一性的亲本葡萄糖淀粉酶的成熟热稳定变体;并且烘焙或部分烘焙该面团以产生该烘焙或部分烘焙产品。

1. 一种生产烘焙或部分烘焙产品的方法,所述方法包括:
 - a) 提供面团,所述面团包含添加的豆类和/或豆类蛋白质以及与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10具有至少70%同一性的亲本葡糖淀粉酶的成熟热稳定变体;并且
 - b) 烘焙或部分烘焙所述面团以产生所述烘焙或部分烘焙产品。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述亲本葡糖淀粉酶来自青霉属的物种,优选地来自草酸青霉、米克青霉、罗氏青霉或光孢青霉。
3. 根据权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述成熟变体在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、2、4、6、7、11、31、34、50、65、79、103、132、327、445、447、481、484、501、539、566、568、594和595的一个或多个或全部位置处包含至少一个氨基酸修饰。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、2、4、11、65、79和327的一个或多个或全部位置处包含取代,优选地,所述至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的R1A、P2N、P4S、P11F、T65A、K79V和Q327F的一个或多个或全部位置处包含取代。
5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、6、7、31、34、79、103、132、445、447、481、566、568、594和595的一个或多个或全部位置处包含取代,优选地,所述至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的R1A、G6S、G7T、R31F、K34Y、K79V、S103N、A132P、D445N、V447S、S481P、D566T、T568V、Q594R和F595S的一个或多个或全部位置处包含取代。
6. 根据权利要求3所述的方法,其中所述至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、6、7、31、34、50、103、132、445、447、481、501、539、566、568、594和595的一个或多个或全部位置处包含取代,优选地,所述至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的R1A、G6S、G7T、R31F、K34Y、E50R、S103N、A132P、D445N、V447S、S481P、E501A、N539P、D566T、T568V、Q594R和F595S的一个或多个或全部位置处包含取代。
7. 根据权利要求3所述的方法,其中所述至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、6、7、31、34、50、103、132、445、447、481、501、539、566、568、594和595的一个或多个或全部位置处包含取代,优选地,所述至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的R1A、G6S、G7T、R31F、K34Y、E50R、S103N、A132P、D445N、V447S、S481P、E501A、N539P、D566T、T568V、Q594R和F595S的一个或多个或全部位置处包含取代。
8. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、6、7、31、34、50、79、103、132、445、447、481、484、501、539、566、568、594和595的一个或多个或全部位置处包含取代,优选地,所述至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的R1A、G6S、G7T、R31F、K34Y、E50R、K79V、S103N、A132P、D445N、V447S、S481P、T484P、E501A、N539P、D566T、T568V、Q594R和F595S的一个或多个或全部位置处包含取代。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述成熟热稳定变体相对于其亲本具有至少5°C,优选地至少6°C、7°C或8°C的热稳定性改善(Td)。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述成熟热稳定变体与其亲本相比在91°C下具有至少150、优选地至少200、更优选地至少250、最优选地至少300的相对活性。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中总面粉含量的至少2% (w/w) 是添加

的豆类和/或豆类蛋白质,优选地总面粉含量的至少4% (w/w) 是添加的豆类和/或豆类蛋白质,优选地总面粉含量的至少6% (w/w) 是添加的豆类和/或豆类蛋白质,更优选地总面粉含量的至少8% (w/w) 是添加的豆类和/或豆类蛋白质,甚至更优选地总面粉含量的至少10% (w/w) 是添加的豆类和/或豆类蛋白质,最优选地总面粉含量的至少12% (w/w) 是添加的豆类和/或豆类蛋白质。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述面团还包含面筋。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述面团还包含至少一种添加的脂肪酶,优选地所述至少一种添加的脂肪酶包含脂肪酶和/或磷脂酶,优选地成熟脂肪酶和/或成熟磷脂酶,优选地其中所述至少一种添加的脂肪酶包含成熟脂肪酶,所述成熟脂肪酶具有与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21中所示的序列中的一个或多个具有至少70%同一性的氨基酸序列。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述至少一种添加的脂肪酶以以下的量添加:所述量在0至100mg酶蛋白/kg面粉的范围内;优选地在0至50mg酶蛋白/kg面粉的范围内;更优选地所述量在0至25mg酶蛋白/kg面粉的范围内;甚至更优选地所述量在0至10mg酶蛋白/kg面粉的范围内;还更优选地所述量在0至5mg酶蛋白/kg面粉的范围内;以及最优选地所述量在0至2.5mg酶蛋白/kg面粉的范围内。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中将所述面团按以下混合:

a) 在缓慢混合速度下,优选地在5-50rpm的范围内,更优选地在10-40rpm的范围内混合至少5分钟;更优选地在缓慢混合速度下混合至少10分钟,甚至更优选地在缓慢混合速度下混合至少15分钟;以及任选地

b) 随后在较快速度下混合所述面团。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法,所述方法包括还添加一种或多种另外的酶,所述另外的酶选自以下组成的组: α 淀粉酶、产麦芽糖淀粉酶、生淀粉降解 α 淀粉酶、 β 淀粉酶、氨肽酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、葡聚糖1,4- α -麦芽四糖水解酶、葡聚糖酶、 β 葡聚糖酶、半乳聚糖酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、卤素过氧化物酶、半纤维素分解酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露聚糖酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶、过氧化物酶、磷脂酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白酶、普鲁兰酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶和木聚糖酶。

采用热稳定淀粉葡糖苷酶变体 (EC 3.2.1.3) 的豆类蛋白质强化面包的烘焙方法

[0001] 序列表的引用

[0002] 本申请含有计算机可读形式的序列表,将其通过援引并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及生产烘焙或部分烘焙产品的方法,这些方法包括提供面团,该面团包含添加的豆类和/或豆类蛋白质以及与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10具有至少70%同一性的亲本葡糖淀粉酶的成熟热稳定变体;并且烘焙或部分烘焙该面团以产生该烘焙或部分烘焙产品。

背景技术

[0004] 由于全球范围内对健康食品日益增长的兴趣,对高蛋白质和/或纤维含量食品的商业兴趣正在增加,高蛋白烘焙产品也不例外。然而,简单地将来自高蛋白作物的面粉,如豆类面粉,即由豆科植物的可食用种子制成的面粉添加到面团中对所得烘焙产品的体积具有显著和有害的影响,如本文所示。非常需要一种克服对体积的负面影响的技术方案。

[0005] 部分烘焙(Par-baking)是将面包或另一种面团产品部分(即“par”)烘焙然后典型地进行冷却或冷冻以储存的技术。当需要最终烘焙产品时,将冷却或冷冻的部分烘焙产品在正常烘焙温度下烘焙典型地5至15分钟;所得类型的烘焙产品通常称为“全烘焙(bake-off)”。

[0006] WO 2021/239267披露了由包含添加的豆类和/或豆类蛋白质和至少一种添加的脂肪酶的面团生产烘焙或部分烘焙的可食用产品的方法,其中总面粉含量的至少2% (w/w) 是添加的豆类和/或豆类蛋白质。

发明内容

[0007] 诸位发明人发现,某些葡糖淀粉酶的热稳定变体在添加豆类和/或豆类蛋白质的烘焙中表现出改善的性能。这些热稳定变体的一种改善的性能是它们增加了产品的甜度或甜味,这允许减少传统配方中添加的糖的量,并且还在一定程度上能够掩盖来自添加的豆类和/或豆类蛋白质的另外苦味。

[0008] 因此,在第一方面,本发明涉及生产烘焙或部分烘焙产品的方法,这些方法包括提供面团,该面团包含添加的豆类和/或豆类蛋白质以及与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10具有至少70%同一性的亲本葡糖淀粉酶的成熟热稳定变体;并且烘焙或部分烘焙该面团以产生该烘焙或部分烘焙产品。

[0009] 优选地,本发明的亲本葡糖淀粉酶的成熟热稳定变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10具有至少71%同一性,与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10具有例如至少72%、例如至少73%、例如至少74%、例如至少75%、例如至少76%、例如至少77%、例如至少78%、例如至少79%、

例如至少80%、例如至少81%、例如至少82%、例如至少83%、例如至少84%、例如至少85%、例如至少86%、例如至少87%、例如至少88%、例如至少89%、例如至少90%、例如至少91%、例如至少92%、例如至少93%、例如至少94%、例如至少95%、例如至少96%、例如至少97%、例如至少98%、例如至少99%同一性。

附图说明

- [0010] 图1示出了以下的成熟蛋白质的氨基酸序列的多重比对：
- [0011] -SEQ ID NO:1的来自草酸青霉 (*Penicillium oxalicum*) 的野生型AMG (PoAMG)
- [0012] -SEQ ID NO:2的表示为“AMG NL”的PoAMG变体
- [0013] -SEQ ID NO:3的表示为“AMG anPAV498”的PoAMG变体
- [0014] -SEQ ID NO:4的表示为“AMG JP0001”的PoAMG变体
- [0015] -SEQ ID NO:5的表示为“AMG JP0124”的PoAMG变体
- [0016] -SEQ ID NO:6的表示为“AMG JP0172”的PoAMG变体
- [0017] -SEQ ID NO:7的来自米克青霉 (*Penicillium miczynskii*) 的野生型AMG (PoAMG)
- [0018] -SEQ ID NO:8的来自罗氏青霉 (*Penicillium russellii*) 的野生型AMG (PoAMG)
- [0019] -SEQ ID NO:9的来自光孢青霉 (*Penicillium glabrum*) 的野生型AMG (PoAMG)

具体实施方式

[0020] 定义

[0021] 豆荚：豆荚是豆科 (*Fabaceae* family) (或豆科 (*Leguminosae*)) 植物，或这种植物的果实或种子 (也称为豆类，特别是在成熟，干燥的条件下)。众所周知的豆荚包括苜蓿、三叶草、菜豆、豌豆、鹰嘴豆、小扁豆、羽扇豆、牧豆、角豆、大豆、花生和罗望子。豆荚产生植物学上独特类型的果实-从简单的心皮发育并通常在两侧裂开 (沿接缝打开) 的简单干果。

[0022] 豆类：联合国粮食和农业组织 (FAO) 承认11种类型的豆类：干菜豆、干蚕豆、干豌豆、鹰嘴豆、豇豆、木豆、小扁豆、班巴拉豆、豌豆、羽扇豆和豆类NES (即小豆类，包括：扁豆、鹊豆 (*hyacinth bean*) (鹊豆 (*Lablab purpureus*))、洋刀豆 (Jack bean) (洋刀豆 (*Canavalia ensiformis*))、刀豆 (sword bean) (刀豆 (*Canavalia gladiata*))、四棱豆 (Winged bean) (四棱豆 (*Psophocarpus tetragonolobus*))、黎豆、豆科攀缘植物 (cowitch) (*Mucuna pruriens* var. *utilis* (*Mucuna pruriens* var. *utilis*))、豆薯 (Yam bean) (豆薯 (*Pachyrhizus erosus*)))。

[0023] 豆类和/或豆荚蛋白质：术语“豆类和/或豆荚蛋白质”意指豆类蛋白质和/或豆荚蛋白质，豆类面粉和/或豆荚面粉的期望成分；该术语还包括经加工和/或经脱味的豆类和/或豆荚面粉，其中经加工的面粉比未经加工的面粉具有更高的蛋白质含量。经加工或经脱味的豆类和/或豆荚面粉也可分别称为豆类和/或豆荚蛋白质浓缩物和/或分离物。

[0024] 经脱味的豆类和/或豆荚面粉或蛋白质：在本发明的上下文中，术语“经脱味”意指面粉或蛋白质组分已经被加工以减少异味，例如苦味。

[0025] 脂肪酶活性：三酰基甘油脂肪酶活性 (EC 3.1.1.3)，即对甘油三酯 (例如三丁酸甘油酯) 中羧酸酯键的水解活性。

[0026] 磷脂酶活性：磷脂酶活性 (A1或A2, EC 3.1.1.32或3.1.1.4)，即对磷脂 (如卵磷脂)

中的一个或两个羧酸酯键的水解活性。

[0027] 半乳糖脂酶活性:半乳糖脂酶活性 (EC 3.1.1.26), 即对半乳糖脂(如DGDG(双半乳糖甘油二酯))中的羧酸酯键的水解活性。

[0028] 成熟多肽:术语“成熟多肽”意指在翻译和任何翻译后修饰(如N末端加工、C末端截短、糖基化、磷酸化等)之后呈其最终形式的多肽。

[0029] 序列同一性:两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的关联度通过参数“序列同一性”来描述。

[0030] 出于本发明的目的,使用尼德勒曼-翁施算法 (Needleman-Wunsch algorithm) (Needleman和Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 48: 443-453) 来确定两个氨基酸序列之间的序列同一性, 该算法如EMBOSS软件包 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite [欧洲分子生物学开放软件套件], Rice等人, 2000, Trends Genet. [遗传学趋势] 16: 276-277, 优选5.0.0版本或更新版本) 的Needle程序所实施的。使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EBL0SUM62 (BLOSUM62的EMBOSS版本) 取代矩阵。使用Needle标记的“最长同一性”的输出(使用非简化(-no brief)选项获得)作为同一性百分比并且如下计算:

[0031] $(\text{相同的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0032] 变体:术语“变体”意指在一个或多个(例如,几个)位置处包含改变(即,取代、插入和/或缺失)的多肽。取代意指用不同的氨基酸替代占据某一位置的氨基酸;缺失意指去除占据某一位置的氨基酸;并且插入意指邻近于并且紧跟着占据某一位置的氨基酸之后添加一个或多个氨基酸。氨基酸改变可以具有微小性质,即,不会显著地影响蛋白质的折叠和/或活性的保守氨基酸取代或插入;典型地为1-30个氨基酸的小缺失;小的氨基末端或羧基末端延伸,如氨基末端的甲硫氨酸残基;多达20-25个残基的小接头肽;或小的延伸,其通过改变净电荷或另一官能(如聚组氨酸段、抗原表位或结合结构域)来促进纯化。保守取代的实例在下组之内:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)、以及小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)。一般不会改变比活性的氨基酸取代是本领域已知的并且例如由H. Neurath和R.L. Hill, 1979, The Proteins [蛋白质], Academic Press [学术出版社], 纽约描述。常见取代表为Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、和Asp/Gly。

[0033] 热稳定性改善:以 $^{\circ}\text{C}$ 为单位的热稳定性改善(Td)是在相同条件下变体相对于其亲本葡萄糖淀粉酶在热稳定性方面改善了多少的量度,如本文例示的那样所测定的。

[0034] 烘焙产品的改善的瓢硬度:术语“改善的瓢硬度”在本文中定义为与其中不将本发明的酶溶液添加到面团中的烘焙产品相比更容易压缩的烘焙产品的性质。

[0035] 瓢硬度由熟练的测试面包师/感官小组凭经验评估或通过使用本领域已知的质地分析仪(例如,来自英国萨里(Surrey)稳定微系统有限公司(Stable Micro Systems)的TAXT2或TA-XT Plus)测量。

[0036] 烘焙产品的改善的风味:术语“烘焙产品的改善的风味”由受过训练的测试小组和/或化学分析(例如,顶空GC-MS分析)评估。烘焙产品的改善的风味包括减少烘焙产品的

一种或多种异味。

[0037] 烘焙产品的改善的抗老化:术语“烘焙产品的改善的抗老化”在本文中定义为如下烘焙产品的特性,其在储存期间具有质量参数(例如柔软度和/或弹性)的降低的劣化率。

[0038] 烘焙产品的体积:术语“烘焙产品的体积”在本文中定义为给定面包条的体积的度量。可以通过油菜种子置换法确定体积。

[0039] 面包颜色:使用用于收集图像的标准方法和用于数据分析的标准C-孔室软件,将烘焙或部分烘焙产品的颜色或白度在C-孔室(精密仪器有限公司(Caliber Instruments Ltd),沃灵顿(Warrington),英国)中测量为“颜色L*”值。

[0040] 根据本发明的面团

[0041] 本发明涉及用于烘焙或部分烘焙产品的面团,所述面团包含添加的豆类和/或豆类蛋白质。

[0042] 术语“添加”在本文中定义为将根据本发明的蛋白质和/或酶添加到面团中、添加到待制作面团的任何成分中、和/或添加到待制作面团中面团成分的任何混合物中。

[0043] 换言之,这些蛋白质和/或酶可以在面团制作的任何步骤中添加,并且可以在一个、两个、或更多个步骤中添加。可以将它们添加到面团成分中,该面团可以如本领域已知的用于烘焙和/或部分烘焙产品的那样进行揉捏和加工。

[0044] 术语“有效量”在本文中定义为如下根据本发明的酶组合物的量,其足以对面团和/或烘焙产品的至少一种感兴趣的特性提供可测量的影响。

[0045] 术语“面团”在本文中定义为面粉和其他烘焙成分的混合物,其足够硬以揉捏或滚动。在本发明的上下文中,面糊涵盖在术语“面团”中;优选地,本发明的面团包含小麦粉。

[0046] 在优选的实施例中,面团成分包含小麦粉;优选地,总面粉含量的2% (w/w) 或更多是小麦粉;优选地,总面粉含量的4% (w/w) 或更多是小麦粉,优选地,面粉的至少6%、至少8%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、或优选至少95% (w/w) 是小麦粉。

[0047] 本发明的面团可以包含衍生自任何谷粒或其他来源的面粉,包括小麦、二粒小麦、斯卑尔脱小麦、单粒小麦、大麦、黑麦、燕麦、玉米、高粱、稻、粟、苋菜、奎奴亚藜、木薯和其任何组合。

[0048] 在本发明的优选实施例中,将豆类和/或豆类蛋白质以豆类和/或豆类面粉、经加工的豆类和/或豆类面粉、经脱味的豆类和/或豆类面粉、或基本上由豆类和/或豆类面粉制成的蛋白质浓缩物和/或分离物的形式添加到面团中;优选地,该添加的豆类和/或豆类蛋白质包括小扁豆蛋白质、鹰嘴豆蛋白质、豌豆蛋白质和/或蚕豆蛋白质、或其蛋白质浓缩物和/或分离物。

[0049] 优选的实施例涉及根据第一方面的面团,其中总面粉含量的至少4% (w/w) 是添加的豆类和/或豆类蛋白质,优选地总面粉含量的至少6% (w/w) 是添加的豆类和/或豆类蛋白质,更优选地总面粉含量的至少8% (w/w) 是添加的豆类和/或豆类蛋白质,甚至更优选地总面粉含量的至少10% (w/w) 是添加的豆类和/或豆类蛋白质,最优选地,总面粉含量的至少12% (w/w) 是添加的豆类和/或豆类蛋白质。

[0050] 优选地,本发明的面团还包含面筋。

[0051] 面团还可包含其他常规面团成分,例如蛋白质,如奶粉、面筋、膳食纤维来源(如小麦、燕麦麸、 β -葡聚糖和/或菊粉)和蛋(全蛋、蛋黄或蛋清);氧化剂,如抗坏血酸、溴酸钾、碘酸钾、偶氮二甲酰胺(ADA)或过硫酸铵;氨基酸,如L-半胱氨酸;糖;盐,如氯化钠、乙酸钙、硫酸钠、或硫酸钙、和/或乳化剂。

[0052] 在本发明的优选实施例中,本发明的面团还包含面筋。

[0053] 面团可以包含脂肪(甘油三酯),例如颗粒状的脂肪或油。

[0054] 本发明的面团通常是经发酵的面团或将要经受发酵的面团。

[0055] 该面团可以各种方式来发酵,例如通过添加化学发酵剂(例如焙粉、碳酸氢钠)或通过添加发酵剂(发酵面团),但优选的是通过添加适合的酵母培养物如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*,面包酵母)的培养物(例如可商购的酿酒酵母菌株)来发酵该面团。

[0056] 本发明的面团可以包含至少一种添加的脂肪酶,优选地脂肪酶和/或磷脂酶,优选地成熟脂肪酶和/或成熟磷脂酶。优选地,该至少一种添加的脂肪酶包含成熟脂肪酶,该成熟脂肪酶具有氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21中所示的序列中的一个或多个具有至少70%同一性;优选地与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21中所示的序列中的一个或多个具有至少75%同一性,至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或优选地至少99%同一性。

[0057] 优选地该至少一种添加的脂肪酶以以下的量添加:该量在0至100mg酶蛋白/kg面粉的范围内;优选地在0至50mg酶蛋白/kg面粉的范围内;更优选地量在0至25mg酶蛋白/kg面粉的范围内;甚至更优选地量在0至10mg酶蛋白/kg面粉的范围内;还更优选地量在0至5mg酶蛋白/kg面粉的范围内;以及最优选地量在0至2.5mg酶蛋白/kg面粉的范围内。

[0058] 优选地,第一方面的面团还包含至少一种另外添加的酶,优选地至少一种成熟 α -淀粉酶,更优选地成熟产麦芽糖 α -淀粉酶;优选地来自嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)的成熟产麦芽糖 α -淀粉酶;更优选地具有与SEQ ID NO:6的序列具有至少70%同一性,优选地与SEQ ID NO:11的序列具有至少75%同一性,至少80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%或优选地至少99%同一性的氨基酸序列的成熟产麦芽糖 α -淀粉酶。优选该成熟产麦芽糖 α -淀粉酶以以下的量添加:该量在0至10.000MANU/kg面粉的范围内;优选地在0至7.500MANU/kg面粉的范围内;优选地在0至5.000MANU/kg面粉的范围内。

[0059] 优选地,该至少一种另外添加的酶包含成熟 α -淀粉酶;优选地成熟真菌 α -淀粉酶;更优选地来自米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的成熟 α -淀粉酶;优选地,该另外的成熟 α -淀粉酶以以下的量添加,该量在0至1.000FAU/kg面粉的范围内;优选地在0至500FAU/kg面粉的范围内;更优选地在0至100FAU/kg面粉的范围内;甚至更优选地在0至50FAU/kg面粉的范围内;以及最优选地在0至25FAU/kg面粉的范围内。

[0060] 优选地,第一方面的面团还包含至少一种另外的添加的酶,该至少一种另外添加的酶包含至少一种成熟木聚糖酶,优选地GH5、GH8和/或GH11木聚糖酶。

[0061] 本发明特别有用于在工业化工艺中制备酵母发酵的面团、烘焙或部分烘焙产品,其中用来制备烘焙或部分烘焙产品的面团是使用自动化或半自动化的设备以机械方式制备的。

[0062] 制备面包的工艺通常涉及以下顺序步骤:制作面团(与任选的醒发(proofing)步骤),对该面团进行压片(sheeting)或分割、成形或滚压(rolling)、以及醒发,这些步骤在本领域中是熟知的。如果使用任选的醒发步骤,优选地添加更多面粉并且可以添加碱来中和产生的或将要在第二醒发步骤期间产生的酸。在根据本发明的工业烘焙生产工艺中,使用以下自动化或半自动化的设备来进行这些步骤中的一个或多个,例如:

[0063] 卧式混合器:配备有旋转臂的辊棒式混合器,其在旧型号中具有两种速度设置,典型地在35rpm下缓慢混合以及在70rpm下快速混合,而新型型号更经常地具有在15-120rpm范围内的变速设置。

[0064] 立式混合器:螺旋混合器典型地是具有旋转碗和抵消旋转的螺旋的混合器。一些螺旋混合器可以是双向的以提供更好的成分分布。

[0065] 混合的目的是干材料的均匀混合和水合,揉捏面团以形成面筋网络并将空气引入面团中。两种类型的混合器通常采用两种速度混合:慢速以收集面团而不将面团推到碗侧面,以及快速以帮助面筋网络的形成。

[0066] 在优选的实施例中,将面团按以下混合:

[0067] a) 在缓慢混合速度下,优选地在5-50rpm的范围内,更优选地在10-40rpm的范围内混合至少5分钟;更优选地在缓慢混合速度下混合至少10分钟,甚至更优选地在缓慢混合速度下混合至少15分钟;以及任选地

[0068] b) 随后在较快速度下混合该面团。

[0069] 部分烘焙产品

[0070] 部分烘焙是将面包或面团产品部分烘焙然后典型地进行快速冷却/冷冻以储存的技术。

[0071] 将生面团正常烘焙,但在正常烹饪时间的约80%停止,然后迅速冷却。

[0072] 部分烘焙的面团产品面包可以容易地运输,并储存直到需要。将部分烘焙的面团产品保存在防止水分损失的密封容器中。它们可以储存在室温下;或储存在冰箱中,或储存在冷冻机中。

[0073] 冷冻步骤可导致冰晶形成并且随后造成对淀粉颗粒的损害和直链淀粉泄漏。因此,在第二次全烘焙之前,泄漏的直链淀粉和未结合的水的量可能比没有冷冻步骤进行烘焙的面包中更高。这些是已知增加瓢坚实率的两个参数。

[0074] 当需要最终的面团产品时,通过在正常温度下再烘焙一段时间(典型地为5至15分钟)来“完成”部分烘焙的产品。必须通过测试确定确切时间,因为时间根据产品而变化。

[0075] 因此,部分烘焙的产品通过以下步骤制造:

[0076] a) 将面团制成产品,

[0077] b) 烘焙该产品,

[0078] c) 储存该产品,以及

[0079] d) 将该产品再烘焙成部分烘焙产品。

[0080] 产品可以在环境温度/室温下储存,或者产品可以在低温下储存,这意指其通常将在低于5摄氏度的温度下储存。在一个实施例中,产品将储存在冷冻机中。

[0081] 本发明的工艺可用于任何种类的从面团制备的部分烘焙产品,特别是软性的,无论是白色、浅色或深色类型。

[0082] 实例是面包(特别地是白色的、全麦或黑麦面包),典型地处于面包或面包卷、面包、平面包、皮塔饼、墨西哥玉米粉圆饼(tortillas)、蛋糕、薄煎饼、饼干、薄饼、曲奇、馅饼皮、比萨等的形式。

[0083] 葡糖淀粉酶

[0084] 葡糖淀粉酶也称为淀粉葡糖苷酶和葡聚糖1,4- α -葡糖苷酶(EC 3.2.1.3),更通常它们被称为AMG。

[0085] 根据本发明,不同类型的淀粉葡糖苷酶可以用作产生热稳定淀粉葡糖苷酶变体的亲本,例如,淀粉葡糖苷酶可以是由以下编码的多肽:在曲霉属(*Aspergillus*)、根霉属(*Rhizopus*)、篮状菌属(*Talaromyces*) (罗萨氏菌属(*Rasamsonia*))或青霉属(*Penicillium*)的真菌菌株中发现的DNA序列;优选地在青霉属的真菌菌株中发现的DNA序列,甚至更优选地在尖孢青霉(*Penicillium oxysporum*)、草酸青霉、米克青霉、罗氏青霉或光孢青霉的真菌菌株中发现的DNA序列。优选地,亲本葡糖淀粉酶来自青霉属的物种,优选地来自草酸青霉、米克青霉、罗氏青霉或光孢青霉。

[0086] 其他适合的真菌的实例包括黑曲霉(*Aspergillus niger*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)、米曲霉、戴尔根霉(*Rhizopus delemar*)、雪白根霉(*Rhizopus niveus*)、米根霉(*Rhizopus oryzae*)和埃默森篮状菌(*Talaromyces emersonii*) (埃默森罗萨氏菌(*Rasamsonia emersonii*))。

[0087] 以下示出了图1中比对的AMG氨基酸序列之间的同一性%,并且也在序列表中提供:

	草酸青霉	100.	99.8	98.9	98.8	96.6	95.9	77.0	77.1	74.3
[0088]		00	3	9	2	4	7	7	2	2
	AMG_NL	99.8	100.	99.1	98.9	96.8	96.1	77.0	77.1	74.3

	3	00	6	9	1	3	7	2	2
AMG_anPA	98.9	99.1	100.	99.8	97.6	96.9	76.7	76.9	73.8
V498	9	6	00	3	5	7	3	5	2
AMG_JPO0	98.8	98.9	99.8	100.	97.8	97.1	76.7	76.9	73.8
01	2	9	3	00	2	4	3	5	2
AMG_JPO1	96.6	96.8	97.6	97.8	100.	99.3	77.0	77.1	74.3
24	4	1	5	2	00	3	7	2	2
[0089] AMG_JPO1	95.9	96.1	96.9	97.1	99.3	100.	76.7	76.7	73.9
72	7	3	7	4	3	00	3	8	9
米克青霉	77.0	77.0	76.7	76.7	77.0	76.7	100.	94.7	80.5
	7	7	3	3	7	3	00	5	1
罗氏青霉	77.1	77.1	76.9	76.9	77.1	76.7	94.7	100.	79.6
	2	2	5	5	2	8	5	00	6
光孢青霉	74.3	74.3	73.8	73.8	74.3	73.9	80.5	79.6	100.
	2	2	2	2	2	9	1	6	00

[0090] 已经产生了PoAMG的热稳定变体(参见下表2)。在优选的实施例中,本发明的成熟热稳定葡糖淀粉酶变体包含下表2中列出的氨基酸取代的一个或多个或全部组合。

[0091] 在优选的实施例中,本发明的成熟变体在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、2、4、6、7、11、31、34、50、65、79、103、132、327、445、447、481、484、501、539、566、568、594和595的一个或多个或全部位置处包含至少一个氨基酸修饰;优选地,该至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、2、4、11、65、79和327的一个或多个或全部位置处包含取代,优选地,该至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的R1A、P2N、P4S、P11F、T65A、K79V和Q327F的一个或多个或全部位置处包含取代;或优选地,该至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、6、7、31、34、79、103、132、445、447、481、566、568、594和595的一个或多个或全部位置处包含取代,优选地,该至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ IDNO:1中的R1A、G6S、G7T、R31F、K34Y、K79V、S103N、A132P、D445N、V447S、S481P、D566T、T568V、Q594R和F595S的一个或多个或全部位置处包含取代;或优选地,该至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、6、7、31、34、50、79、103、132、445、447、481、484、501、539、566、568、594和595的一个或多个或全部位置处包含取代,优选地,该至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的R1A、G6S、G7T、R31F、K34Y、E50R、K79V、S103N、A132P、D445N、V447S、S481P、T484P、E501A、N539P、D566T、T568V、Q594R和F595S的一个或多个或全部位置处包含取代;或优选地,该至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、6、7、31、34、50、79、103、132、445、447、481、484、501、539、566、568、594和595的一个或多个或全部位置处包含取代,优选地,该至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的R1A、G6S、G7T、R31F、K34Y、E50R、K79V、S103N、A132P、D445N、V447S、S481P、T484P、E501A、N539P、D566T、T568V、Q594R和F595S的一个或多个或全部位置处包含取代;或优选地,该至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID

NO:1中的位置1、6、7、31、34、50、79、103、132、445、447、481、484、501、539、566、568、594和595的一个或多个或全部位置处包含取代,优选地,该至少一个氨基酸修饰在对应于SEQ ID NO:1中的R1A、G6S、G7T、R31F、K34Y、E50R、K79V、S103N、A132P、D445N、V447S、S481P、T484P、E501A、N539P、D566T、T568V、Q594R和F595S的一个或多个或全部位置处包含取代。

[0092] 表2中变体的热稳定性改善(Td)列于表3中,其中表示为“anPAV498”(亲本)的PoAMG变体的Td设置为零。在优选的实施例中,本发明的成熟热稳定变体相对于其亲本具有至少5°C,优选地至少6°C、7°C或8°C的热稳定性改善(Td),优选地如本文例示的那样所测定的。

[0093] 在另一个优选的实施例中,本发明的成熟热稳定变体与其亲本相比在91°C下具有至少150、优选地至少200、更优选地至少250、最优选地至少300的相对活性。

[0094] 磷脂酶的来源

[0095] 磷脂酶可以是原核的,特别是细菌的,或真核的,例如来自真菌或动物来源。

[0096] 磷脂酶可以衍生自例如以下属或物种:嗜热丝孢菌属(*Thermomyces*),疏棉状嗜热丝孢菌(*T.lanuginosus*) (也称为疏棉状腐质霉(*Humicola lanuginosa*));腐质霉属(*Humicola*),特异腐质霉(*H.insolens*);镰孢属(*Fusarium*),尖孢镰孢(*F.oxysporum*),茄病镰刀菌(*F.solani*),异孢镰孢(*F.heterosporum*);曲霉属(*Aspergillus*),塔宾曲霉(*A.tubigenis*)、黑曲霉(*A.niger*)、米曲霉(*A.Oryzae*);根毛霉属;假丝酵母属(*Candida*),南极假丝酵母(*C.antarctica*)、皱褶假丝酵母(*C.rugosa*);青霉属(*Penicillium*),卡门柏青霉(*P.camembertii*);根霉属(*Rhizopus*),米根霉(*Rhizopus oryzae*);犁头霉属(*Absidia*);网柄菌属(*Dictyostelium*);毛霉属(*Mucor*);链孢霉属(*Neurospora*);根霉属(*Rhizopus*),少根根霉(*R.arrhizus*)、日本根霉(*R.japonicus*);核盘霉属(*Sclerotinia*);发癣菌属(*Trichophyton*),维氏核盘菌属(*Whetzelinia*);芽孢杆菌属(*Bacillus*);柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*);肠杆菌属(*Enterobacter*);爱德华菌属(*Edwardsiella*);欧文氏菌属(*Erwinia*);埃希氏菌属(*Escherichia*),大肠杆菌;克雷伯菌属(*Klebsiella*);变形杆菌属(*Proteus*),普鲁威登菌属(*Providencia*);沙门菌属(*Salmonella*)、沙雷菌属(*Serratia*)、志贺菌属(*Shigella*);链霉菌属(*Streptomyces*);耶尔森菌属(*Yersinia*);假单胞菌属(*Pseudomonas*),或洋葱假单胞菌(*P.cepacia*)。

[0097] 磷脂酶可以在如本领域已知的合适的宿主细胞中产生。

[0098] 磷脂酶也可以从蜜蜂或蛇毒或从哺乳动物胰腺例如猪胰腺获得。

[0099] WO 98/26057披露了来自尖孢镰孢的脂肪酶/磷脂酶及其在烘焙中的用途。

[0100] WO 2004/099400披露了各种磷脂酶及其在烘焙中用于降低面团粘性的用途。

[0101] 合适的商业磷脂酶制剂是Lipopan FTM、Lipopan XtraTM和Lipopan PrimeTM(可从诺维信公司(Novozymes A/S)获得)。

[0102] 其他可用的磷脂酶是例如可从DSM获得的PanamoreTM。

[0103] 商业脂肪酶制剂是例如可从诺维信公司(Novozymes A/S)获得的Lipopan FTM和Lipopan 50BGTM。

[0104] α -淀粉酶

[0105] α -淀粉酶(α -1,4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶,EC.3.2.1.1)构成一组酶,这些酶催化淀粉以及其他直链和支链1,4-糖苷寡糖和多糖的水解。

[0106] α -淀粉酶中的多种被称为TermamylTM、Termamyl[®] SC和“TermamylTM-样 α -淀粉酶”,并可从例如WO 90/11352、WO 95/10603、WO 95/26397、WO 96/23873和WO 96/23874中了解。

[0107] 另一组 α -淀粉酶被称为FungamylTM和“FungamylTM-样 α -淀粉酶”,它们是与衍生自WO 01/34784中披露的米曲霉的 α -淀粉酶有关的 α -淀粉酶。

[0108] 一组优选的 α -淀粉酶被称为产麦芽糖 α -淀粉酶(EC 3.2.1.133),典型地衍生自嗜热脂肪芽孢杆菌。优选的产麦芽糖 α -淀粉酶具有与本文的SEQ ID NO:11具有至少70%同一性的氨基酸序列,与本文的SEQ ID NO:11具有例如至少71%、例如至少72%、例如至少73%、例如至少74%、例如至少75%、例如至少76%、例如至少77%、例如至少78%、例如至少79%、例如至少80%、例如至少81%、例如至少82%、例如至少83%、例如至少84%、例如至少85%、例如至少86%、例如至少87%、例如至少88%、例如至少89%、例如至少90%、例如至少91%、例如至少92%、例如至少93%、例如至少94%、例如至少95%、例如至少96%、例如至少97%、例如至少98%、例如至少99%同一性。

[0109] 还优选的是耐糖产麦芽糖 α -淀粉酶变体的组,例如WO 2006/032281(诺维信公司(Novozymes A/S)中披露的那些,其中提供了许多耐糖变体,这些变体各自包含氨基酸改变,该改变是邻近于I15、R18、K44、N86、T87、G88、Y89、H90、Y92、W93、F188、T189、O190、P191、A192、F194、L196、O329、N371、O372、P373、N375或R376的取代或缺失或插入。在本文,我们将一种这样优选的变体称为耐糖产麦芽糖 α -淀粉酶1(ST-MAA1),并且其具有以下三个取代:F188L、D261G和T288P。WO 2008/148845还披露了许多优选的耐糖产麦芽糖 α -淀粉酶变体,这些变体各自包含两个取代D261G和T288P以及至少一个另外的氨基酸改变,该改变是邻近于Y89、W93、P191、F194、Y360或N375的取代或缺失或插入。我们将一种这样优选的变体称为耐糖产麦芽糖 α -淀粉酶2(ST-MAA2),并且其具有以下三个取代:F194Y、D261G、T288P和N375S。

[0110] 又另一组优选的成熟 α -淀粉酶是成熟非产麦芽糖的麦芽四糖水解酶外淀粉酶。WO 2004/111217(丹尼斯克公司(Danisco A/S))披露了许多优选的具有SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的嗜糖假单胞菌(*Pseudomonas saccharophilia*)外淀粉酶或麦芽四糖水解酶的非产麦芽糖热稳定变体,这些变体各自包含以下取代中的一个或多个:G69P、A141P、G223A、A268P、G313P、S399P和G400P。

[0111] WO 2007/148224(丹尼斯克公司(Danisco A/S))披露了更优选的具有SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的嗜糖假单胞菌外淀粉酶的成熟非产麦芽糖抗老化变体,这些变体各自在位置307处包含赖氨酸(K)或精氨酸(R)的氨基酸取代。

[0112] WO 2010/133644披露了其他优选的具有SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的嗜糖假单胞菌外淀粉酶的成熟非产麦芽糖变体,这些变体各自在包括位置42、88、205、223、235、240、311、392和409的位置处包含一个或多个取代。嗜糖假单胞菌外淀粉酶的一种这样的优选变体披露于WO 2010/133644的SEQ ID NO:31中,其氨基酸序列也示于本文的SEQ ID NO:13中,并且我们将其表示为:HPL G+。

[0113] 嗜糖假单胞菌外淀粉酶的另一优选变体披露于WO 2007/148224的SEQ ID NO:21中,其氨基酸序列也示于本文的SEQ IDNO:14中,并且我们将其表示为:HPL G4。

[0114] 其他优选的非产麦芽糖 α -淀粉酶披露于WO 2005003339(丹尼斯克公司(Danisco

A/S)、WO 2005007818(丹尼斯克公司(Danisco A/S))和WO 2022/216801(杜邦营养生物科学公司(DuPont Nutrition Biosciences ApS))中。

[0115] 优选的成熟非产麦芽糖 α -淀粉酶具有与本文的SEQ ID NO:12、13或14具有至少70%同一性的氨基酸序列,与本文的SEQ ID NO:12、13或14具有例如至少71%、例如至少72%、例如至少73%、例如至少74%、例如至少75%、例如至少76%、例如至少77%、例如至少78%、例如至少79%、例如至少80%、例如至少81%、例如至少82%、例如至少83%、例如至少84%、例如至少85%、例如至少86%、例如至少87%、例如至少88%、例如至少89%、例如至少90%、例如至少91%、例如至少92%、例如至少93%、例如至少94%、例如至少95%、例如至少96%、例如至少97%、例如至少98%、例如至少99%同一性;此外,优选的成熟非产麦芽糖 α -淀粉酶具有以上段落中列出的取代中的一个或多个。

[0116] 仍另一组优选的成熟 α -淀粉酶是生淀粉降解 α -淀粉酶。如本文所用,“生淀粉降解 α -淀粉酶”是指可以在淀粉糊化温度以下直接降解生淀粉颗粒的酶。

[0117] 生淀粉降解 α -淀粉酶的实例包括在WO 2005/003311、美国专利公开号2005/0054071和美国专利号7,326,548中披露的那些。实例还包括在美国专利号7,326,548中的实例的表1至5中、在美国专利公开号2005/0054071(第15页表3)中披露的那些酶,连同在WO 2004/020499和WO 2006/06929和WO 2006/066579中披露的酶以及在WO 2006/069290(诺维信公司(Novozymes A/S)中或在WO 2013/006756(诺维信公司(Novozymes A/S)中的序列表和说明书中披露的那些酶,这两者均以其全文并入本文。

[0118] 在一个实施例中,生淀粉降解 α -淀粉酶是GH13_1淀粉酶。

[0119] 在一个实施例中,生淀粉降解 α -淀粉酶具有如下氨基酸序列,该氨基酸序列与欧洲专利号2981170(诺维信公司(Novozymes A/S)中或本文SEQ ID NO:15或16中所示的生淀粉降解 α -淀粉酶具有至少70%,例如至少71%、例如至少72%、例如至少73%、例如至少74%、例如至少75%、例如至少76%、例如至少77%、例如至少78%、例如至少79%、例如至少80%、例如至少81%、例如至少82%、例如至少83%、例如至少84%、例如至少85%、例如至少86%、例如至少87%、例如至少88%、例如至少89%、例如至少90%、例如至少91%、例如至少92%、例如至少93%、例如至少94%、例如至少95%、例如至少96%、例如至少97%、例如至少98%、例如至少99%同一性。

[0120] 另外的酶

[0121] 在第一方面的优选的实施例中,向面团中添加一种或多种另外的酶,所述另外的酶可以选自由以下组成的组: α -淀粉酶、产麦芽糖淀粉酶、生淀粉降解 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、氨肽酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、葡聚糖1,4- α -麦芽四糖水解酶、葡聚糖酶、 β 葡聚糖酶、半乳聚糖酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、卤素过氧化物酶、半纤维素分解酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露聚糖酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶、过氧化物酶、磷脂酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白酶、普鲁兰酶、生淀粉降解 α -淀粉酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶和木聚糖酶。

[0122] 酶组合物

[0123] 本发明的成熟热稳定变体葡糖淀粉酶以及任何一种或多种另外的酶能以任何适合的形式,例如以液体(特别是稳定化液体)形式添加,或可以作为基本上干的粉末或颗粒

被添加。

[0124] 例如,颗粒可以如在美国专利号4,106,991和美国专利号4,661,452中所披露的来生产。液体酶制剂可以例如根据已确立的程序通过添加糖或糖醇或乳酸来稳定化。其他酶稳定剂在本领域中是熟知的。

[0125] 一种或多种酶能以任何适合的方式添加,如以单独组分(分别或顺序地添加酶),或在一步或一种组合物中将这此酶一起添加。

[0126] 颗粒和团聚粉末可以通过常规方法制备,例如在流化床造粒机中将酶喷雾于载体上来制备。载体可以由具有适合的粒径的微粒核组成。载体可以是可溶的或不溶的,例如盐(如NaCl或硫酸钠)、糖(如蔗糖或乳糖)、糖醇(如山梨醇)、淀粉、水稻、玉米渣、或大豆。

[0127] 实例

[0128] 实例1:PoAMG文库的构建

[0129] 如下构建PoAMG文库:

[0130] 设计在一个或多个靶位点处具有NNK或一个或多个所希望的突变的正向或反向引物,这些靶位点彼此具有15bp的重叠。通过以下条件使用适当的模板质粒DNA(例如,含有JPO-0001基因的质粒DNA)进行反向PCR,即通过反向定向引物来扩增整个质粒DNA序列。通过QIAquick凝胶提取试剂盒[凯杰公司(QIAGEN)]来纯化所得PCR片段,然后将其引入大肠杆菌ECOS感受态大肠杆菌DH5 α [日本基因株式会社(NIPPON GENE CO.,LTD.)]。通过MagExtractor质粒提取试剂盒[东洋公司(TOYOB0)]从大肠杆菌转化体中提取质粒DNA,然后将其引入黑曲霉感受态细胞中。

[0131] PCR反应混合物:

[0132] PrimeSTAR Max DNA聚合酶[宝生物公司(TaKaRa)]

[0133] 总计25 μ l

[0134] 1.0 μ l模板DNA(1ng/ μ l)

[0135] 9.5 μ l H₂O

[0136] 12.5 μ l 2x PrimeSTAR Max预混物

[0137] 1.0 μ l正向引物(5 μ M)

[0138] 1.0 μ l反向引物(5 μ M)

[0139] PCR程序:

[0140] 98°C/2min

[0141] 25x(98°C/10sec,60°C/15sec,72°C/2min)

[0142] 10°C/保持

[0143] 实例2:筛选更好的热稳定性

[0144] 将如实例1中构建的枯草芽孢杆菌文库在含有COVE液体培养基(2.0g/L蔗糖、2.0g/L异麦芽糖、2.0g/L麦芽糖、4.9mg/L、0.2ml/L5N NaOH、10ml/L COVE盐、10ml/L 1M乙酰胺)的96孔或24孔MTP中在32°C发酵3天。然后,在几种温度下通过如下所述的pNPG测定来测量培养物上清液中的AMG活性。

[0145] pNPG热稳定性测定:

[0146] 将含有所希望的酶的培养物上清液与相同体积的pH 5.0 200mM NaOAc缓冲液混合。将二十微升该混合物分配于96孔板或8联PCR管中,然后在多种温度下通过热循环仪加

热30min。将那些样品与含有0.1% (w/v) pNPG[和光株式会社(wako)]的10 μ l底物溶液于pH 5.0 200mM NaOAc缓冲液中混合,并且在70 $^{\circ}$ C下孵育20min以进行酶反应。反应后,添加60 μ l的0.1M Borax缓冲液以停止反应。取出80微升的反应上清液并且通过光度计读取其OD₄₀₅值以评估酶活性。

[0147] 表1a.PoAMG变体与其亲本anPAV498或JPO-0001 (anPAV498带前导肽/前肽) 相比的相对活性的列表

[0148]

名称	80 $^{\circ}$ C/75 $^{\circ}$ C下的相对活性(%)
anPAV498	17%
JPO-004	32%
JPO-005	15%
JPO-006	16%
JPO-007	3%

[0149]

名称	80 $^{\circ}$ C/75 $^{\circ}$ C下的相对活性(%)
AnPav498	13%
JPO-009	16%

[0150]

JPO-011	15%
JPO-012	15%
JPO-013	17%
JPO-020	20%

[0151]

名称	80 $^{\circ}$ C/70 $^{\circ}$ C下的相对活性(%)
JPO-001	10%
JPO-004	29%
JPO-009	13%
JPO-014	21%
JPO-020	16%
JPO-021	30%
JPO-052	33%

[0152]

名称	79 $^{\circ}$ C/70 $^{\circ}$ C下的相对活性(%)
JPO-001	23%
JPO-021	46%
JPO-022	39%
JPO-023	44%
JPO-025	51%
JPO-027	49%
JPO-029	37%

名称	77°C/70°C 下的相对活性 (%)
JPO-001	72%
JPO-029	82%
JPO-047	80%
JPO-048	90%

JPO-049	84%
JPO-050	86%
JPO-064	87%

名称	79°C/77°C 下的相对活性 (%)
JPO-001	36%
JPO-029	51%
JPO-047	45%
JPO-048	81%
JPO-049	53%
JPO-050	58%
JPO-064	65%

名称	79°C/77°C 下的相对活性 (%)
JPO-001	41%
JPO-021	60%
JPO-022	48%
JPO-023	57%
JPO-025	56%
JPO-027	64%
JPO-029	66%
JPO-047	50%
JPO-048	72%
JPO-051	82%
JPO-058	73%
JPO-062	72%
JPO-063	85%
JPO-064	83%

[0157] 表1b. PoAMG变体与其亲本JPO-022相比的相对活性的列表

名称	77°C/70°C 下的相对活性 (%)
----	----------------------

	JPO-022	60%
	JPO-027	67%
	JPO-042	8%
	JPO-044	86%
	JPO-045	67%
	JPO-046	48%

[0159]	名称	77°C/70°C下的相对活性(%)
	JPO-022	76%
	JPO-023	75%
	JPO-025	80%
	JPO-027	84%
	JPO-058	92%
	JPO-059	88%
	JPO-060	86%
	JPO-061	83%
	JPO-062	87%

	名称	79°C/77°C下的相对活性(%)
	JPO-022	49%
	JPO-023	51%
[0160]	JPO-025	52%
	JPO-027	58%
	JPO-058	69%
	JPO-059	36%
	JPO-060	41%

[0161]	JPO-061	44%
	JPO-062	57%

[0162] 表1c. 在不同温度下PoAMG变体与其亲本JPO-063相比的相对活性的列表

[0163]	名称	79°C/77°C下的相对活性(%)
	JPO-063	91%
	JPO-066	96%
	JPO-071	89%
	JPO-072	84%
	JPO-074	103%

	JP0-075	86%
	JP0-076	92%
	JP0-077	95%
	JP0-078	88%
	JP0-079	100%
[0164]	名称	84°C/80°C下的相对活性(%)
	JP0-063	16%
	JP0-065	26%
	JP0-067	21%
	JP0-070	12%
	JP0-071	13%
	JP0-074	32%
	JP0-081	17%
	JP0-082	24%
	JP0-083	46%
	JP0-084	26%
	JP0-044	37%
[0165]	名称	82°C/70°C下的相对活性(%)
	JP0-063	21%
	JP0-093	43%
	JP0-081	25%
	JP0-088	39%
	JP0-094	38%
	JP0-096	38%
	JP0-106	53%
[0166]	名称	83°C/80°C下的相对活性(%)
	JP0-063	46%
	JP0-051	44%
	JP0-096	64%
	JP0-106	88%
	JP0-110	81%
	JP0-111	100%
	JP0-112	86%
	JP0-113	83%
	JP0-114	47%
	JP0-115	90%

[0167] 表1d.PoAMG变体与其亲本JP0-096相比的相对活性的列表

[0168]

名称	83°C/70°C 下的相对活性 (%)
JPO-082	53%
JPO-088	70%
JPO-091	69%
JPO-092	65%
JPO-093	62%
JPO-094	74%

[0169]

JPO-095	69%
JPO-096	67%
JPO-097	65%
JPO-098	65%

[0170]

名称	83°C/80°C 下的相对活性 (%)
JPO-051	20%
JPO-096	43%
JPO-109	51%
JPO-126	33%
JPO-129	48%
JPO-130	18%
JPO-131	51%
JPO-132	34%

[0171]

表1e. PoAMG变体与其亲本JPO-129相比的相对活性的列表

[0172]

名称	84°C/80°C 下的相对活性 (%)
JPO-129	62%
JPO-156	51%
JPO-160	34%
JPO-161	41%
JPO-162	49%
JPO-163	21%
JPO-164	57%
JPO-165	77%

[0173]

表1f. PoAMG变体与其亲本JPO-166相比的相对活性的列表

名称	84°C/75°C 下的相对活性 (%)
[0174] JPO-166	19%
JPO-167	66%
JPO-168	58%

[0175] JPO-169	53%
JPO-171	47%
JPO-172	98%

[0176] 表2. PoAMG成熟序列的变体中的氨基酸取代

名称	氨基酸取代
PoAMG	来自青霉属的野生型成熟 AMG (SEQ ID NO:1)
AMG NL	K79V
anPAV498	P2N P4S P11F T65A K79V Q327F
JPO-001	R1A P2N P4S P11F T65A K79V Q327F
JPO-018	D75N R77D A78Q
JPO-019	D75S R77G A78W V79D F80Y
JPO-023	R1A K34Y S103N
JPO-024	R1A K34Y D445N V447S
JPO-025	R1A K34Y Y504T
JPO-026	R1A S103N D445N V447S
JPO-027	R1A S103N Y504T
[0177] JPO-028	R1A D445N V447S Y504T
JPO-029	R1A K34Y S103N D445N V447S
JPO-044	R1A K34Y S103N D445N V447S E501V Y504T
JPO-047	R1A K34Y S103N Y504T
JPO-048	R1A K34Y S103N D445N V447S D566T
JPO-049	R1A K34Y S103N Q594R F595S
JPO-050	R1A K34Y S103N Y504T Q594R F595S
JPO-051	R1A K34Y S103N D445N V447S Y504T Q594R F595S
JPO-052	R1A S105L
JPO-053	R1A S105E
JPO-055	R1A A132R
JPO-058	R1A K34Y S105L Y504T Q594R F595S

[0178]

JPO-059	R1A K34Y S103N S105L Y504T Q594R F595S
JPO-060	R1A K34Y S103N S105L Y504T Q594R F595S
JPO-061	R1A K34Y S103N S105L Y504T D566T Q594R F595S
JPO-062	R1A K34Y S103N S105L D445N V447S Y504T D566T Q594R F595S
JPO-063	R1A K34Y S103N S105L A132R D445N V447S Y504T D566T Q594R F595S
JPO-064	R1A K34Y S103N S105L D445N V447S D566T Q594R F595S
JPO-065	R1A K34Y S103N S105L A132R D445N V447S E501V Y504T D566T Q594R R1A F595S
JPO-066	R1A K34Y S103N A132R D445N V447S Y504T D566T Q594R F595S
JPO-069	R1A K34Y S103N S105L A132R D445N V447S Y504T D566T V592T
JPO-071	R1A G6S G7T K34Y S103N S105L A132R D445N V447S Y504T D566T Q594R R1A F595S
JPO-074	R1A K34Y S103N P107L A132R D445N V447S Y504T D566T Q594R F595S
JPO-083	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132R D445N V447S Y504T D566T Q594R R1A F595S
JPO-084	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132R D445N V447S Y504T D566T V592T R1A Q594R F595S
JPO-091	R1A G6S R7T K34Y S103N P107L A132P D445N V447S Y504T D566T Q594R F595S
JPO-092	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132R D445N V447S Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-093	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132P D445N V447S Y504T D566T T568V Q594R F595S

[0179]

JPO-094	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132R D445N V447S S481P Y504T D566T Q594R F595S
JPO-095	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132R D445N V447S S481P Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-096	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132P D445N V447S D566T T568V Q594R F595S
JPO-097	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L T110W A132P D445N V447S Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-098	R1A G6S G7T K34Y E50R S103N P107L A132P D445N V447S Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-105	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132P D445N V447S E501V Y504T
JPO-106	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N P107L A132P D445N V447S Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-108	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N P107L A132P D445N V447S S481P Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-109	R1A G6S G7T K34Y E50R S103N P107L A132P D445N V447S S481P Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-111	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N P107L A132P D445N V447S S481P E501V Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-112	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N P107L A132P D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
JPO-114	R1A K34Y D75N R77D A78Q S103N R138L D445N V447S Y504T Q594R F595S
JPO-115	R1A G6S G7T R31F K34Y D75N R77D A78Q S103N P107L A132P D445N V447S S481P Y504T D566T

[0180]

	T568V Q594R F595S
JPO-124	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N A132P D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
JPO-125	R1A G6S G7T K34Y E50R S103N A132P D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
JPO-126	R1A R31F K34Y D75N R77D A78Q S103N R138L D445N V447S Y504T Q594R F595S
JPO-127	R1A K34Y D75N R77D A78Q S103N R138L D445N V447S Q594R F595S
JPO-128	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N A132P D445N V447S
JPO-129	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
JPO-130	R1A K34Y E50R D75N R77D A78Q S103N R138L D445N V447S Q594R F595S
JPO-131	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R D75N R77D A78Q S103N A132P D445N V447S S481P D566T Q594R F595S
JPO-132	R1A R31F K34Y E50R D75N R77D A78Q S103N R138L D445N V447S Q594R F595S
JPO-133	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R D75N R77D A78Q S103N A132P R138L D445N V447S S481P D566T Q594R F595S
JPO-138	R1A R135S
JPO-143	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P D445N V447S S481P E501L D566T T568V Q594R F595S
JPO-154	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N A132P R138G D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S

[0181]	JPO-155	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N A132P R138L D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
	JPO-156	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N A132P R138P D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
	JPO-167	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P S379P D445N V447S S481P E501A D566T T568V Q594R F595S
	JPO-168	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P D445N V447S S481P T484P E501A D566T T568V Q594R F595S
	JPO-169	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P D445N V447S S481P E501A N539P D566T T568V Q594R F595S
	JPO-171	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P S379P D445N V447S S481P T484P E501A D566T T568V Q594R F595S
	JPO-172	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P D445N V447S S481P T484P E501A N539P D566T T568V Q594R F595S

[0182] 实例3:黑曲霉的发酵

[0183] 将黑曲霉菌株在220rpm、30℃下于回转式摇床上的500ml带挡板烧瓶中发酵,这些烧瓶含有100ml MU1以及4ml 50%尿素。将培养液离心(10,000x g,20min)并且将上清液小心地与沉淀物倾析分开。

[0184] 实例4:PoAMG(JPO-001)变体的纯化

[0185] 通过阳离子交换色谱法纯化PoAMG变体。将各自的峰级分单独合并,并用20mM乙酸钠缓冲液(pH 5.0)透析,然后使用离心过滤装置(Vivaspin Turbo 15,赛多利斯公司(Sartorius))浓缩样品。通过A280值确定酶浓度。

[0186] 实例5:热稳定性测定(TSA)

[0187] 将纯化的酶用50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.0)稀释至0.5mg/ml并与等体积的用Milli-Q水稀释的SYPRO Orange(英杰公司(Invitrogen))混合。将18μl的混合物溶液转移至LightCycler 480多孔板384(罗氏诊断公司(Roche Diagnostics))中并将板密封。

[0188] TSA的设备参数:

[0189] 仪器:LightCycler 480实时PCR系统(罗氏应用科学部(Roche Applied Science))

[0190] 扫描速率:0.02℃/sec

- [0191] 扫描范围:37°C-96°C
- [0192] 积分时间:1.0秒
- [0193] 激发波长465nm
- [0194] 发射波长580nm
- [0195] 将获得的荧光信号归一化到0和1的范围内。将Td定义为信号强度是0.5时的温度。热稳定性改善列于表3中,其中表示为anPAV498的PoAMG变体的Td为0。
- [0196] 实例6:PoAMG活性测定
- [0197] 通过GOD-POD方法进行的麦芽糖糊精 (DE11) 测定
- [0198] 底物溶液
- [0199] 30g麦芽糖糊精 (来自松谷化学工业公司 (MATSUTANI chemical industry Co., Ltd.) 的pindex#2)
- [0200] 100ml 120mM乙酸钠缓冲液,pH 5.0
- [0201] 葡萄糖CII测试试剂盒 (日本和光纯药工业株式会社 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.))
- [0202] 将20 μ l的酶样品与100 μ l的底物溶液混合,并且在设定温度下孵育2小时。将样品在铝块上冷却3min,然后将10ul的反应溶液与590ul的1M Tris-HCl (pH 8.0) 混合以停止反应。将10 μ l的溶液与200 μ l的测试试剂盒的工作溶液混合,然后在室温下静置15min。在A505处读取吸光度。活性作为表示为anPAV498的PoAMG变体的相对活性列于表3中。
- [0203] 表3.

[0204]

变体	Td 改善[°C] (pH5.0, anPAV498 为 0)	在 91°C 下的活性 (anPAV498 为 100)
anPAV498	-	100
JPO-001	1.0	94
JPO-004	2.2	-
JPO-009	0.7	-
JPO-013	1.5	-
JPO-014	2.3	-
JPO-020	1.4	74
JPO-021	2.5	113
JPO-052	2.6	85
JPO-053	0.2	71
JPO-055	1.6	85
JPO-023	3.6	-
JPO-024	2.5	-
JPO-025	3.4	-
JPO-027	2.9	-
JPO-029	3.7	191
JPO-048	4.3	163
JPO-051	5.7	222
JPO-058	4.2	157
JPO-062	4.2	159
JPO-063	5.4	107
JPO-064	4.9	178
JPO-065	7.0	127
JPO-066	6.5	178

[0205]

JPO-069	4.8	95
JPO-071	6.1	128
JPO-074	6.3	108
JPO-081	5.5	213
JPO-082	5.6	215
JPO-089	6.0	171
JPO-090	5.5	155
JPO-018	0.6	84
JPO-019	0.5	86
JPO-044	6.3	225
JPO-083	6.1	103
JPO-084	4.4	66
JPO-099	6.8	156
JPO-091	6.6	130
JPO-092	6.7	113
JPO-093	6.8	132
JPO-094	6.6	126
JPO-095	6.9	-
JPO-096	5.9	-
JPO-097	5.2	-
JPO-098	5.6	-
JPO-112	8.2	-
JPO-114	5.2	218
JPO-115	8.0	-
JPO-108	8.5	-
JPO-109	7.2	-
JPO-111	8.4	-
JPO-124	8.0	385
JPO-125	6.8	324

	JPO-126	6.6	268
	JPO-127	4.9	246
	JPO-129	8.2	399
	JPO-130	5.3	278
	JPO-131	7.9	367
	JPO-132	6.6	336
	JPO-138	6.4	125
	JPO-133	6.1	143
	JPO-143	8.8	280
	JPO-154	7.6	252
	JPO-155	8.3	282
	JPO-156	8.3	290
[0206]	JPO-145	8.2	-
	JPO-147	8.2	-
	JPO-150	8.2	-
	JPO-152	8.4	-
	JPO-153	9.0	399
	JPO-161	6.0	200
	JPO-165	8.9	403
	JPO-166	7.0	237
	JPO-167	9.1	387
	JPO-168	9.3	332
	JPO-169	9.6	269
	JPO-171	9.4	255
	JPO-172	9.9	432

[0207] 实例7:豆类面包中的JP0172

[0208] 用根据表4的配方以直接发酵烘焙工艺烘焙面包。根据表5进行不同的处理。将面包在敞口盘中烘焙。将成分在螺旋混合器中以17rpm持续3min和35rpm持续7min混合成面团。将面团静置10分钟,并且分为320g面团块。将面团块弄圆、压片并放入烘焙烤盘中。将装有面团的烤盘在32℃和86%相对湿度下醒发60min。将醒发的面团在箱式烤炉中在180℃下烘焙20min。

[0209] 将面包在烘焙后2小时包装在密封塑料袋中,并且在室温下储存直至分析。

[0210] 表4配方

	烘焙物%
面粉 (Kolibri, Meneba 公司, 荷兰)	75
鹰嘴豆粉	25
水	变量
[0211] 酵母	4
蔗糖	1.5
盐	1.5
抗坏血酸	0.01
丙酸钙	0.3
活性小麦面筋	变量
Fungamyl® G	10 ppm

[0212] 表5处理

	1	2	3	4	5	6	7	8
活性小麦面筋, %						6	6	6
水, %	55	55	55	55	55	64	64	64
[0213] JPO172, mgEP/kg 面粉		33		33		33		33
Lipopan Xtra, ppm			40	40	40		40	40
Novamyl G,			100				100	

[0214]

ppm								
-----	--	--	--	--	--	--	--	--

[0215] 用质地分析仪 (TA-XT plus, 稳定微系统公司, 戈德尔明, 英国) 评估面包的质地。面包瓤质地特性是通过烘焙产品的硬度 (与“硬度”相同并与“柔软度”相对) 和弹性来表征的。用于测量硬度和弹性的标准方法是基于烘焙产品的力-变形。烘焙产品的力-变形可以用40mm直径的圆柱形探头来进行。当以1mm/秒的变形速度将圆柱形探头在25mm厚面包切片上下压40%应力时, 记录该圆柱形探头上的力。然后, 将该探头在此位置保持30秒同时记录该力, 然后探头返回到其初始位置。

[0216] 硬度 (以克计) 被定义为将探头压缩至25%应力 (对应于压缩6.25mm到具有25mm厚

度的面包瓢切片中)所需的力。

[0217] 弹性(以%计)被定义为在40%应力下压缩30秒后记录的力(对应于具有25mm厚度的面包切片在时间=40s处的力)除以将探头压入瓢中10mm所需的力(对应于具有25mm厚度的面包切片在时间=10s处的力)乘以100。

[0218] 质地分析的结果可见于表6(坚度)和表7(弹性)中。使用33mgEP/kg面粉JP0172和40ppm Lipopan Xtra的面包比使用100ppm Novamyl G和40ppm Lipopan Xtra的面包更有弹性。与此同时,面包具有相同的坚度。

[0219] 当向两种处理中加入另外的活性小麦面筋时,与使用100ppm Novamyl G、40ppm Lipopan Xtra和6%活性小麦面筋相比,使用33mgEP/kg面粉、40ppm Lipopan Xtra和6%活性小麦面筋的面包总体上更有弹性,并且在所研究的整个时间段内具有相同的坚度。

[0220] 单独添加33mgEP/kg面粉JP0172也能够改善弹性。然而,该面包比使用mgEP/kg面粉JP0172和40ppm Lipopan Xtra的组的面包硬得多。

[0221] 结论:在所研究的整个时间段内,JP0172和Lipopan Xtra的组合能够产生具有低坚度和高弹性的组合的面包。

[0222] 表6不同时间点的面包瓢的坚度。数字后面的字母表示使用学生t检验的显著性水平,其中显著性水平为0.05。

处理	第 1 天	第 7 天	第 14 天
对照	633 A	1006 A	1380 A
40 ppm Lipopan Xtra	434 C	648 B	904 B
33 mgEP/kg JPO172	547 B	608 B	744 C
100 ppm Novamyl G +40 ppm Lipopan Xtra	298 D	400 CD	582 D
33 mgEP/kg JPO172+40 ppm Lipopan Xtra	318 D	444 C	573 D
33 mgEP/kg JPO172+6%面筋	308 D	356 DE	475 E
33 mgEP/kg JPO172+40 ppm Lipopan Xtra + 6%面筋	220 E	310 EF	360 F
100 ppm Novamyl G +40 ppm Lipopan Xtra + 6%面筋	227 E	300 F	392 EF

[0224] 表7不同时间点的面包瓢的弹性。数字后面的字母表示使用学生t检验的显著性水平,其中显著性水平为0.05。

处理	第 1 天	第 7 天	第 14 天
[0225] 对照	59.5 F	51.0 G	49.5 F
40 ppm Lipopan Xtra	59.2 F	54.2 F	51.1 E
33 mgEP/kg JPO172	64.3 B	62.1 B	61.9 BC
[0225] 100 ppm Novamyl G +40 ppm Lipopan Xtra	61.7 E	58.7 E	59.1 D
33 mgEP/kg JPO172+40 ppm Lipopan Xtra	63.5 C	59.6 D	59.8 D
33 mgEP/kg JPO172+6%面筋	65.6 A	64.3 A	65.1 A
[0226] 33 mgEP/kg JPO172+40 ppm Lipopan Xtra + 6%面筋	64.1 B	61.8 B	62.5 B
100 ppm Novamyl G +40 ppm Lipopan Xtra + 6%面筋	62.7 D	60.4 C	61.3 C

