



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119072237 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 03

(21) 申请号 202280095192.1

(22) 申请日 2022.11.30

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2022/088680 2022.04.24 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/083874 2022.11.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/208403 EN 2023.11.02

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 徐清 王雅珍 黄丽燕

(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 张蕊蕊

(51) Int.Cl.

A21D 8/04 (2006.01)

A21D 13/062 (2006.01)

C12N 9/34 (2006.01)

权利要求书2页 说明书30页

序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

使用热稳定葡糖淀粉酶制备蒸制的面粉制品的方法

(57) 摘要

本发明涉及生产蒸制的面粉制品的方法,所述方法包括:提供面团或面糊,该面团或面糊包含面粉和与SEQ ID NO:1、SEQ ID 1X10:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少70%同一性的热稳定葡糖淀粉酶;和汽蒸该面团或该面糊以生产蒸制的面粉制品,以及包含所述热稳定葡糖淀粉酶的组合物。

1. 一种生产蒸制的面粉制品的方法,所述方法包括:
 - a) 提供面团或面糊,该面团或面糊包含面粉和与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少70%同一性的葡糖淀粉酶;以及
 - b) 汽蒸该面团以生产蒸制的面粉制品。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中该葡糖淀粉酶是葡糖淀粉酶变体或亲本葡糖淀粉酶的成熟热稳定变体。
3. 根据权利要求1-2中任一项所述的方法,其中该蒸制的面粉制品选自:馒头、蒸制包子(包子)、蒸制花卷(花卷)、蒸制卷子(卷子)、蒸制饺子、蒸面(焖面)、蒸制发糕(发糕)、蒸制米发糕(米发糕)、蒸年糕(年糕)。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中该面团或该面糊由含有面粉的材料制成,优选地所述面粉选自由以下组成的组:小麦面粉、玉米面粉、黑麦面粉、大麦面粉、燕麦面粉、大米面粉、或高粱面粉、马铃薯面粉以及其组合。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中该亲本葡糖淀粉酶从青霉属的物种中获得,优选地从草酸青霉、米克青霉、罗氏青霉或光孢青霉中获得。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中该成熟变体在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、2、4、6、7、11、31、34、65、79、103、132、327、445、447、481、566、568、594和595的一个或多个(几个)或全部位置处包含至少一个氨基酸修饰。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中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。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中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 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。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中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。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中该成熟热稳定变体相对于其亲本具有至少3°C,优选地至少4°C、5°C、6°C、7°C或8°C的热稳定性改善(Td)。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中该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。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中该葡糖淀粉酶,优选地亲本葡糖淀粉酶的该成熟热稳定变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少71%同一性,与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8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%、例如至少100%同一性。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法, 其中, 与其他条件相同但不向该面团/该面糊中添加该酶的条件相比, 在室温或4℃的低温下储存0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6或7天后, 该蒸制的面粉制品具有降低的硬度和/或改善的弹性。

14. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法, 其中, 与其他条件相同但不向该面团/该面糊中添加该酶的条件相比, 在室温或4℃的低温下储存0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6或7天后, 该蒸制的面粉制品具有改善的感官评价。

15. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法, 其中, 与其他条件相同但不向该面团/该面糊中添加该酶的条件相比, 在室温或4℃的低温下储存0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6或7天后, 对该蒸制的面粉制品进行复蒸, 复蒸后的蒸制的面粉制品具有改善感官评价。

16. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法, 其中, 该感官评价是对该蒸制的面粉制品或复蒸后的蒸制产品的柔软度、弹性、外观白度、瓤结构、湿润度、粘聚性、咀嚼性和/或甜度、优选平均值的综合评价。

17. 一种面粉组合物、一种面团预混物、或一种面糊预混物, 该面粉组合物、面团预混物、或面糊预混物包含面粉和热稳定葡萄糖淀粉酶, 优选地如权利要求1-12中任一项所定义的亲本葡萄糖淀粉酶的成熟热稳定变体。

18. 一种面团, 该面团包含面粉和热稳定葡萄糖淀粉酶, 优选地如权利要求1-12中任一项所定义的亲本葡萄糖淀粉酶的成熟热稳定变体。

使用热稳定葡萄糖淀粉酶制备蒸制的面粉制品的方法

[0001] 序列表的引用

[0002] 本申请含有计算机可读形式的序列表,将其通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于制备蒸制的面粉制品(fLOUR-based product)的酶法,特别是用热稳定葡萄糖淀粉酶制备蒸制的面粉制品(例如馒头)的方法。

背景技术

[0004] 馒头等蒸制的面粉制品是中国人特别是中国北方的传统主食之一。近年来,随着食品行业工业化的发展,蒸制的面粉制品的工业化生产逐渐增多。

[0005] WO 2011/039324披露了一种用于制备馒头的方法,该方法包括用一种或多种产麦芽糖 α -淀粉酶、一种或多种生淀粉降解酶和至少一种脂肪分解酶制备用于制备馒头的面团的步骤,其中酶法延迟了馒头产品的老化。

[0006] 在日常生活中,人们经常一次购买/制作多个馒头,并且分几次食用。制成的馒头在室温、低温或冷冻下储存一段时间后,再次食用前往往需要将馒头复蒸,以恢复其柔软度和口感。然而,复蒸对蒸制的面粉制品的瓤结构、外观颜色、咀嚼性和/或弹性有负面影响。

[0007] 因此,虽然使用酶处理在延长馒头的保质期方面取得了一些进展,但是仍然需要提供新的酶解决方案以改善蒸制的面粉制品的保鲜或抗老化性能,即使这样的蒸制的面粉制品需要复蒸。

发明内容

[0008] 诸位发明人发现,本发明的热稳定葡萄糖淀粉酶在通过汽蒸面团的步骤制备的蒸制的面粉制品(例如馒头)的保鲜或抗老化方面表现出显著改善的性能。

[0009] 本发明的热稳定葡萄糖淀粉酶的另一个改善性能是它们出人意料地明显改善了蒸制的面粉制品在复蒸之后的品质,例如改善了复蒸后的产品的外观白度、柔软度、弹性、瓤结构、和/或粘聚性。

[0010] 本发明的热稳定葡萄糖淀粉酶的另一个改善性能是它们增加了产品的甜度或甜味,天然甜味是优选的味道,从而也减少了传统配方中的糖添加量。

[0011] 相应地,在第一方面,一种生产蒸制的面粉制品的方法,该方法包括:

[0012] a) 提供面团或面糊,该面团或面糊包含面粉和与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少70%同一性的葡萄糖淀粉酶;以及

[0013] b) 汽蒸该面团或该面糊以制作蒸制的面粉制品。

[0014] 在本发明的优选实施例中,所述葡萄糖淀粉酶是亲本葡萄糖淀粉酶的成熟热稳定变体。

[0015] 本发明的第二方面涉及面团预混物或面糊预混物,该面团预混物或面糊预混物包含如本发明中所定义的面团或面糊、以及亲本葡萄糖淀粉酶的成熟热稳定变体。

[0016] 在本发明的优选实施例中,与其他条件相同但不向面团/面糊中添加酶的条件相比,本发明的蒸制的面粉制品具有降低的硬度和/或改善的弹性,并且因此具有改善的储存稳定性。

[0017] 在本发明的优选实施例中,与其他条件相同但不向面团/面糊中添加酶的条件相比,在室温下或低温下储存(优选地储存一段时间)后,本发明的蒸制的面粉制品具有改善的感官评价。

[0018] 在本发明的优选实施例中,与其他条件相同但不向面团/面糊中添加酶的条件相比,复蒸后的蒸制的面粉制品具有改善的感官评价。

[0019] 在本发明的优选实施例中,感官评价是对蒸制的面粉制品的柔软度、弹性、表面白度、瓢结构、湿润度、粘聚性、咀嚼性和/或甜度、优选平均值的综合评价。

[0020] 优选地,本发明的葡糖淀粉酶与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少71%同一性,与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8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,更优选地,该葡糖淀粉酶是亲本葡糖淀粉酶的成熟热稳定变体。

附图说明

[0021] 图1示出了以下的成熟蛋白质的氨基酸序列的多重比对:

[0022] -SEQ ID NO:1的来自草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)的野生型AMG(PoAMG)

[0023] -SEQ ID NO:2的表示为“AMG NL”的PoAMG变体

[0024] -SEQ ID NO:3的表示为“AMG anPAV498”的PoAMG变体

[0025] -SEQ ID NO:4的表示为“AMG JP0001”的PoAMG变体

[0026] -SEQ ID NO:5的表示为“AMG JP0124”的PoAMG变体

[0027] -SEQ ID NO:6的表示为“AMG JP0172”的PoAMG变体

[0028] -SEQ ID NO:7的来自米克青霉(*Penicillium miczynskii*)的野生型AMG(PoAMG)

[0029] -SEQ ID NO:8的来自罗氏青霉(*Penicillium russellii*)的野生型AMG(PoAMG)

[0030] -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

[0031] 定义

[0032] 根据此详细描述,以下定义适用。注意,单数形式“一种/个(a/an)”以及“该/这些(the)”包括复数个指示物,除非上下文中另外明确指明。

[0033] 在整个本文件中,以范围形式表达的值应以灵活的方式解释为不仅包括明确列举为范围界限的数值,而且还包括涵盖在该范围内的所有单独数值或子范围,如同明确列举每个数值和子范围。例如,“约0.1%至约5%”或“约0.1%至5%”的范围应解释为不仅包括约0.1%至约5%,而且还包括在所示范范围内的单独值(例如1%、2%、3%和4%)和子范围

(例如0.1%至0.5%、1.1%至2.2%、3.3%至4.4%)。除非另有说明,否则陈述“约X至Y”具有与“约X至约Y”相同的含义。同样,陈述“约X、Y或约Z”具有与“约X、约Y或约Z”相同的含义,除非另有说明。

[0034] 除非另外定义或由上下文明确指示,否则本文所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0035] 葡糖淀粉酶:术语葡糖淀粉酶(1,4- α -D-葡聚糖葡聚糖水解酶,EC 3.2.1.3)被定义为催化D-葡萄糖从淀粉或相关寡糖和多糖分子的非还原端释放的酶。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。葡糖淀粉酶单位(AGU)被定义为在以下标准条件下每分钟水解1微摩尔麦芽糖的酶量:37°C、pH 4.3、底物:麦芽糖23.2mM,缓冲液:乙酸盐0.1M,反应时间5分钟。

[0036] 亲本或亲本葡糖淀粉酶:如本文所用的术语“亲本”葡糖淀粉酶意指进行修饰以产生本发明的变体葡糖淀粉酶的葡糖淀粉酶。该术语还指本发明的变体与之进行比较的多肽。亲本可以是天然存在(野生型)多肽,或者它可以甚至是通过任何适合的手段制备的其变体。例如,亲本蛋白质可以是在氨基酸序列方面已经进行过修饰或改变的天然存在多肽的变体。因此,亲本葡糖淀粉酶可具有一个或多个(或一个或几个)氨基酸取代、缺失和/或插入。因此,亲本葡糖淀粉酶可以是亲本葡糖淀粉酶的变体。亲本也可以是等位基因变体,其是由占据相同染色体基因座的基因的两种或更多种可替代形式中的任一种编码的多肽。

[0037] 成熟多肽:术语“成熟多肽”在本文中定义为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)之后处于其最终形式的具有生物活性的多肽。成熟多肽序列缺乏信号序列,该信号序列可以使用本领域已知的技术来确定(参见,例如,Zhang和Henzel,2004,Protein Science[蛋白质科学]13:2819-2824)。术语“成熟多肽编码序列”意指编码成熟多肽的多核苷酸。

[0038] 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。

[0039] 出于本发明的目的,使用尼德曼-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程序中所实施的。所使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5、和EBL0SUM62(BL0SUM62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(-nobrief)选项获得)作为同一性百分比并且如下计算:

[0040] (相同的残基x100)/(比对长度-比对中的空位总数)

[0041] 变体:术语“变体”意指具有葡糖淀粉酶活性的、包含一个改变(即在一个或多个(例如,几个)位置处的一个取代、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;而插入意指在邻接并且紧随占据某一位置的氨基酸之后添加氨基酸。本发明的变体具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的多肽的至少20%,例如至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少100%的葡糖淀粉酶活性。

[0042] 感官评价:为了进行感官评价,由小组(例如,至少3名训练有素的人员)评估蒸制产品的品质。

[0043] 蒸制产品的改善的柔软度:术语“蒸制产品的改善的柔软度”与“坚度(firmness)/硬度(hardness)”相反,并且在本文中定义为蒸制产品与对照相比更容易被压缩的特性,并且由训练有素的人员用手或嘴依靠经验评估或例如通过本领域已知的质地分析器(例如,来自英国萨里的稳定微系统公司(Stable Micro Systems Ltd)的TAXT2或TA-XT Plus)来测量。

[0044] 蒸制产品的改善的弹性:术语“蒸制产品的改善的弹性”在本文中定义为蒸制产品与对照相比在受压后更容易恢复到初始状态的特性,并且由训练有素的人员用手或嘴依靠经验评估或例如通过本领域已知的质地分析器(例如,来自英国萨里的稳定微系统公司(Stable Micro Systems Ltd)的TAXT2或TA-XT Plus)来测量。

[0045] 蒸制产品的改善的外观白度:术语“蒸制产品的改善的外观白度”在本文中定义为蒸制产品与对照相比表面外观更白的特性,并且通常由训练有素的人员进行视觉评估。

[0046] 蒸制产品的改善的瓢结构:术语“蒸制产品的改善的瓢结构”在本文中定义为蒸制产品与对照相比瓢中具有更精细的孔室和/或更薄的孔室壁、和/或瓢中有更均匀/均一的孔室分布的特性,并且通常由训练有素的人员进行视觉评估。

[0047] 蒸制产品的改善的湿润度:术语“蒸制产品的改善的湿润度”在本文中定义为蒸制产品与对照相比具有凉爽触感或凉爽口感的特性,并且通常由训练有素的人员依靠经验评估。

[0048] 蒸制产品的改善的粘聚性:术语“蒸制产品的改善的粘聚性”在本文中定义为蒸制产品与对照相比具有更少的瓢掉落的特性,并且通常由训练有素的人员依靠经验评估。

[0049] 蒸制产品的改善的咀嚼性:术语“蒸制产品的改善的咀嚼性”在本文中定义为蒸制产品与对照相比在吞咽前需要更多咀嚼的特性,并且通常由熟练的面包师依靠经验评估。

[0050] 蒸制产品的改善的甜度:术语“蒸制产品的改善的甜度”在本文中定义为蒸制产品与对照相比味道更甜的特性,并且通常由训练有素的人员评估。

[0051] 热稳定性改善:以℃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。

[0052] 命名法

[0053] 出于本发明的目的,命名[Y/F]意指在此位置的氨基酸可以是酪氨酸(Trp,Y)或苯丙氨酸(Phe,F)。同样,命名法[V/G/A/I]意指在此位置的氨基酸可以是缬氨酸(Val,V)、甘氨酸(Gly,G)、丙氨酸(Ala,A)或异亮氨酸(Ile,I),对于如本文所述的其他组合,依次类推。除非另外指出,否则氨基酸X被这样定义,使得它可以是20种天然氨基酸中的任一种。

[0054] 变体命名惯例

[0055] 出于本发明的目的,在SEQ ID NO:1中披露的多肽用于确定另一种葡萄糖淀粉酶中对应的氨基酸残基。因此,所有提及的位置和特定取代均指SEQ ID NO:1中使用的编号。然而,本领域技术人员将认识到,也可以使用在本文披露的任何其他序列的序列来确定另一种葡萄糖淀粉酶多肽中的相应氨基酸残基。另一种葡萄糖淀粉酶的氨基酸序列与在SEQ ID NO:1中披露的多肽进行比对,并且基于该比对,使用尼德曼-翁施算法(Needleman和Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 48:443-453)来确定对应于在SEQ ID No:1中披露的

多肽中的任何氨基酸残基的氨基酸位置编号,该算法如EMBOSS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程序中所实施的。所使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5、和EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。

[0056] 对于已知结构的蛋白质,有几种工具和资源可用于检索并产生结构比对。例如,蛋白质的SCOP超家族已经在结构上进行比对,并且那些比对是可访问且可下载的。可以使用多种算法如距离比对矩阵(Holm和Sander,1998,Proteins[蛋白质]33:88-96)或组合延伸(Shindyalov和Bourne,1998,Protein Engineering[蛋白质工程]11:739-747)比对两种或更多种蛋白质结构,并且这些算法的实施可以另外用于查询具有目的结构的结构数据库,以便发现可能的结构同源物(例如,Holm和Park,2000,Bioinformatics[生物信息学]16:566-567)。

[0057] 在描述本发明的变体时,为了便于参考,以下描述的命名法经过了调整。采用了已接受的IUPAC单字母或三字母的氨基酸缩写。

[0058] 取代.对于氨基酸取代,使用以下命名法:原始氨基酸、位置、取代的氨基酸。相应地,将在位置226处的苏氨酸被丙氨酸取代表示为“Thr226Ala”或“T226A”。多个突变通过加号(“+”)分开,例如,“Gly205Arg+Ser411Phe”或“G205R+S411F”代表在位置205和位置411处的甘氨酸(G)和丝氨酸(S)分别被精氨酸(R)和苯丙氨酸(F)取代。

[0059] 缺失.对于氨基酸缺失,使用以下命名法:原始氨基酸、位置、*。相应地,将在位置195处的甘氨酸的缺失表示为“Gly195*”或“G195*”。多个缺失通过加号(“+”)分开,例如,“Gly195*+Ser411*”或“G195*+S411*”。

[0060] 插入.对于氨基酸插入,使用以下命名法:原始氨基酸、位置、原始氨基酸、插入的氨基酸。相应地,将在位置195处的甘氨酸之后插入赖氨酸表示为“Gly195GlyLys”或“G195GK”。多个氨基酸的插入被表示为[原始氨基酸、位置、原始氨基酸、插入的氨基酸#1、插入的氨基酸#2;等]。例如,将在位置195处的甘氨酸之后插入赖氨酸和丙氨酸表示为“Gly195GlyLysAla”或“G195GKA”。

[0061] 在这样的情况下,通过将小写字母添加至在所插入的一个或多个氨基酸残基之前的氨基酸残基的位置编号而对所插入的一个或多个氨基酸残基进行编号。在以上实例中,序列因此会是:

[0062]	<u>亲本:</u>	<u>变体:</u>
	195	195 195a 195b
	G	G-K-A

[0063] 多个改变.包含多个改变的变体通过加号(“+”)分开,例如,“Arg170Tyr+Gly195Glu”或“R170Y+G195E”代表在位置170处和位置195处的精氨酸和甘氨酸分别被酪氨酸和谷氨酸取代。

[0064] 不同改变.在可于一个位置处引入不同改变的情况下,不同改变通过逗号分开,例如,“Arg170Tyr,Glu”代表在位置170处的精氨酸被酪氨酸或谷氨酸取代。因此,“Tyr167Gly,Ala+Arg170Gly,Ala”表示以下变体:

[0065] “Tyr167Gly+Arg170Gly”、“Tyr167Gly+Arg170Ala”、“Tyr167Ala+Arg170Gly”、和

“Tyr167Ala+Arg170Ala”。

具体实施方式

[0067] 第一方面涉及一种生产蒸制的面粉制品的方法,该方法包括:

[0068] a) 提供面团或面糊,该面团或面糊包含面粉和与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少70%同一性的葡糖淀粉酶;以及

[0069] b) 汽蒸该面团或该面糊以制作蒸制的面粉制品。

[0070] 在本发明的优选实施例中,所述葡糖淀粉酶是亲本葡糖淀粉酶的成熟热稳定变体。

[0071] 本发明的第二方面涉及面团预混物或面糊预混物,该面团预混物或面糊预混物包含如本发明中所定义的面团或面糊、以及亲本葡糖淀粉酶的成熟热稳定变体。

[0072] 在本发明的优选实施例中,与其他条件相同但不向面团/面糊中添加酶的条件相比,在室温或4℃的低温下储存0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6或7天后,或在-20℃下储存长达1、2、3、4、5、6个月,本发明的蒸制的面粉制品具有降低的硬度和/或改善的弹性,并且因此具有改善的储存稳定性。

[0073] 在本发明的优选实施例中,与其他条件相同但不向面团/面糊中添加酶的条件相比,在室温或4℃的低温下储存0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6或7天后,或在-20℃下储存长达1、2、3、4、5、6个月,本发明的蒸制的面粉制品有改善的感官评价。

[0074] 在本发明的优选实施例中,与其他条件相同但不向面团/面糊中添加酶的条件相比,在室温或4℃的低温下储存0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6或7天后,或在-20℃下储存长达1、2、3、4、5、6个月,对本发明的蒸制的面粉制品进行复蒸,复蒸后的产品具有改善的感官评价。

[0075] 在本发明的优选实施例中,感官评价是对蒸制的面粉制品的柔软度、弹性、外观白度、瓤结构、湿润度、粘聚性、咀嚼性和/或甜度、优选平均值的综合评价。

[0076] 在本发明另一个优选的实施例中,蒸制的面粉制品具有与用两倍量的成熟葡糖淀粉酶制成的对照产品至少相同的甜度或甜味,该成熟葡糖淀粉酶的氨基酸序列示于SEQ ID NO:10中。

[0077] 另一方面涉及一种生产煮制的面粉制品的方法,该方法包括:

[0078] a) 提供面团,该面团包含面粉和与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少70%同一性的葡糖淀粉酶;以及

[0079] b) 煮该面团以制作该煮制的面粉制品。

[0080] 在本发明的优选实施例中,所述葡糖淀粉酶是亲本葡糖淀粉酶的成熟热稳定变体。

[0081] 蒸制的面粉制品:

[0082] 如本文所用,“蒸制的面粉制品”意指任何通过汽蒸面团或面糊制备的面粉制品。蒸制的面粉制品的实例包括馒头、如中国北方馒头和中国南方馒头、蒸制包子(包子)、蒸制花卷(花卷)、蒸制卷子(卷子)、蒸制饺子、蒸面(焖面)、蒸年糕(年糕)、蒸制发糕(发糕)或蒸制米发糕(米发糕)。蒸制的面粉制品可含有一种或多种另外的成分,例如肉(例如猪肉、牛肉、鸡肉或鱼肉)、蔬菜(例如蘑菇、西兰花和其他绿色蔬菜)、水果(例如椰枣和枣)、糖果、奶酪和乳(或其他乳制品)及其组合。

[0083] 本发明涉及包含本发明的热稳定葡糖淀粉酶的面团或面糊。如本文所用,“面团”意指用于制备蒸制的面粉制品(例如,馒头)的任何面团。用于制备蒸制的面粉制品的面团可以由任何适合的面粉来源制成,例如来源于谷物的面粉,如小麦面粉、玉米面粉、黑麦面粉、大麦面粉、燕麦面粉、大米面粉、或高粱面粉、马铃薯面粉以及其组合(例如,小麦面粉与其他面粉来源之一组合;大米面粉与其他面粉来源之一组合)。

[0084] 本发明的面团通常是经发酵的面团或待发酵的面团。面团能以各种方式来发酵,例如通过添加面团成分如化学膨松剂(例如碳酸氢钠)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*)的培养物来发酵面团。

[0085] 本发明涉及面粉预混物,该面粉预混物包含本发明的热稳定葡糖淀粉酶,这样的面粉预混物可以包含任何适合的面粉来源,例如来源于谷物的面粉,如小麦面粉、玉米面粉、黑麦面粉、大麦面粉、燕麦面粉、大米面粉、或高粱面粉、马铃薯面粉以及其组合(例如,小麦面粉与其他面粉来源之一组合;大米面粉与其他面粉来源之一组合)。

[0086] 制备馒头的方法在本领域中是熟知的,并且包括例如“直接发酵方法(straight dough process)”和“中种发酵方法(sponge and dough process)”,其非限制性实例在下文“材料和方法”部分提供。制备馒头的方法通常涉及下述顺序步骤:制作面团(与任选的醒发(proofing)步骤),对该面团进行压片(sheeting)、成形、醒发、然后汽蒸,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。

[0087] 制备蒸制发糕的方法在本领域中是熟知的,并且包括例如制备蒸制发糕的方法,该方法包括从含有面粉的材料制备面糊、发酵、并汽蒸来制作蒸制发糕。优选地,面糊是大米面糊。优选地,面粉可以来自谷物,例如小麦面粉、玉米面粉、黑麦面粉、大麦面粉、燕麦面粉、大米面粉、或高粱面粉、马铃薯面粉以及其组合。

[0088] 优选地,制好的发糕具有细腻的网状结构、柔软的口感、宜人的酒香、和由发酵产生的乳酸香味。优选地,面糊含有本发明的热稳定葡糖淀粉酶。优选地,蒸制发糕由大米制成,例如该方法包括:将大米浸泡在水中,将浸泡后的大米磨碎并过筛以获得大米面糊,或通过向蒸制发糕预混物粉末中添加水制作大米面糊,并且将大米面糊在30℃-40℃下发酵约1-25小时,然后可以添加蔗糖和烘焙粉末,将混合物均匀混合并汽蒸约15分钟来制作蒸制发糕。如本领域中熟知的,面糊通常通过添加适合的酵母培养物例如酿酒酵母(面包酵母)的培养物或化学膨松剂来发酵。

[0089] 除了制备新鲜的馒头面团或馒头产品之外,本发明涉及用于制备冷冻的馒头面团的方法。冷冻的馒头面团可以有利于储存和/或配送。用于制备冷冻的馒头面团的方法的实例包括以下步骤:制作面团(与任选的醒发),对该面团进行压片、成形、醒发、以及冷冻。本发明还涉及冷冻的馒头面团,其包含本发明的热稳定葡糖淀粉酶。

[0090] 本发明特别有用于在工业化方法中制备馒头面团和馒头产品,即,其中用来制备馒头和/或馒头产品的面团是使用自动化或半自动化的设备机械地制备的。本发明提供了显著的优势,即现在可以使用自动化或半自动化的方法制备馒头,其中馒头在制备后可储存超过24小时以用于分销和消费者使用,但是基本上保留当日新鲜制备的馒头的品质。

[0091] 制备馒头的方法通常涉及下述顺序步骤:制作面团(和任选的醒发步骤)、压片、成

形、醒发、汽蒸和包装。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馒头生产方法中,如压片、成形、醒发、汽蒸和/或包装等步骤中的一个或多个是使用自动化或半自动化的设备进行的。

[0092] 在一个实施例中,能以0.01-1,000mg酶蛋白(mg EP)/kg面粉的量、优选地0.01-500mg酶蛋白(mg EP)/kg面粉的量、甚至更优选地0.1-100mg酶蛋白(mg EP)/kg面粉的量,将根据本发明的葡萄糖淀粉酶添加到面粉或面团或面糊中。

[0093] 煮制的面粉制品:

[0094] 如本文所用,“煮制的面粉制品”意指通过煮面团制备的任何面粉制品。煮制的面粉制品的实例包括中国传统主食(例如,面条、饺子和馄饨、粽子和米粉),以及干制品(例如,干面条和半干面条、热干面、干米粉和半干米粉以及湿米粉)。面粉可以由任何适合的面粉来源制成,例如来源于谷物的面粉,如大米面粉、小麦面粉、荞麦面粉、紫米面粉、玉米面粉、黑麦面粉、大麦面粉、燕麦面粉、或高粱面粉、马铃薯面粉以及其组合(例如,小麦面粉与其他面粉来源之一组合;大米面粉与其他面粉来源之一组合)。可以是有馅的产品也可以是无馅的产品。馅可以是肉、蔬菜、豆类或其组合。这类产品的面团通常不经酵母发酵。获得的面团可以通过不同方法被加工成不同形状的产品,可以是有馅的也可以是无馅的。

[0095] 在食用之前,通常将煮制的面粉制品根据产品的厚度、或是否有馅、和冷冻或干燥状态煮适当的时间。将不同的产品在沸水中煮3-20分钟,以达到完全糊化的目的。

[0096] 在一个实施例中,能以0.01-1,000mg酶蛋白(mg EP)/kg面粉的量、优选地0.01-500mg酶蛋白(mg EP)/kg面粉的量、甚至更优选地0.1-100mg酶蛋白(mg EP)/kg面粉的量,将根据本发明的葡萄糖淀粉酶添加到面粉或面团中。

[0097] 葡萄糖淀粉酶

[0098] 根据本发明,不同类型的葡萄糖淀粉酶可以用作产生热稳定葡萄糖淀粉酶变体的亲本,例如,葡萄糖淀粉酶可以由以下编码的多肽:在曲霉属(*Aspergillus*)、根霉属(*Rhizopus*)、或篮状菌属(*Talaromyces*)或青霉属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。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(*Aspergillus oryzae*)、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*)。

[0099] 亲本葡萄糖淀粉酶可以从任何属的微生物中获得。出于本发明的目的,如本发明中与给定来源结合使用,术语“从……获得”应当意指由多核苷酸编码的亲本是由该来源或由其中已经插入来自该来源的多核苷酸的菌株产生的。在一方面,亲本是胞外分泌的。

[0100] 在本发明的一方面,葡萄糖淀粉酶或亲本葡萄糖淀粉酶可以从青霉属(例如,草酸青霉、光孢青霉、巴西青霉、罗氏青霉、米克青霉)获得。

[0101] 在一方面,亲本真菌葡萄糖淀粉酶可以是青霉属葡萄糖淀粉酶,例如,草酸青霉葡萄糖淀粉酶、光孢青霉葡萄糖淀粉酶、巴西青霉葡萄糖淀粉酶、罗氏青霉葡萄糖淀粉酶、米克青霉葡萄糖淀粉酶。

[0102] 在另一方面,亲本葡萄糖淀粉酶从草酸青霉中获得,例如,如SEQ ID NO:1所示的葡

糖淀粉酶。在另一方面,亲本葡糖淀粉酶从草酸青霉中获得,例如,如SEQ ID NO:6所示的葡糖淀粉酶。在另一方面,亲本葡糖淀粉酶从草酸青霉中获得,例如,如SEQ ID NO:7所示的葡糖淀粉酶。在另一方面,亲本葡糖淀粉酶从草酸青霉中获得,例如,如SEQ ID NO:8所示的葡糖淀粉酶。

[0103] 在一个实施例中,本发明的热稳定葡糖淀粉酶与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少70%同一性,与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8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。在一个实施例中,葡糖淀粉酶是葡糖淀粉酶变体或亲本葡糖淀粉酶的成熟热稳定变体。

[0104] 在一个实施例中,成熟变体在对应于SEQ ID NO:1中的位置1、2、4、6、7、11、31、34、65、79、103、132、327、445、447、481、566、568、594和595的一个或多个(几个)或全部位置处包含至少一个氨基酸修饰。

[0105] 在一个实施例中,其中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。

[0106] 在一个实施例中,其中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 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。

[0107] 在一个实施例中,其中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。

[0108] 在一个实施例中,其中该成熟热稳定变体相对于其亲本具有至少3°C,优选地至少4°C、5°C、6°C、7°C或8°C的热稳定性改善(Td)。

[0109] 在一个实施例中,其中该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。

[0110] 在一个实施例中,热稳定葡糖淀粉酶是葡糖淀粉酶变体。在一个实施例中,本发明的葡糖淀粉酶变体与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的多肽具有至少60%,例如,至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%或100%

序列同一性,这些多肽具有葡糖淀粉酶活性。

[0111] 在一个实施例中,葡糖淀粉酶变体或本发明的葡糖淀粉酶变体的氨基酸序列与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8,或SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的成熟多肽相差不超过十个氨基酸,例如九个氨基酸、八个氨基酸、七个氨基酸、六个氨基酸、五个氨基酸、四个氨基酸、三个氨基酸、两个氨基酸、和一个氨基酸。在一个实施例中,在一个实施例中,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的成熟多肽如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示。

[0112] 在一个实施例中,葡糖淀粉酶、葡糖淀粉酶变体或本发明的葡糖淀粉酶变体的氨基酸序列包括以下或由以下组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID:8的氨基酸序列。

[0113] 变体的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;高达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功能(如聚组氨酸段、抗原表位或结合结构域)来促进纯化。

[0114] 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,于The Proteins[蛋白质],Academic Press[学术出版社],纽约中描述。常见取代为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。

[0115] 可替代地,这些氨基酸改变具有使多肽的物理化学特性改变的这样一种性质。例如,氨基酸改变可以改善多肽的热稳定、改变底物特异性、改变最适pH等。

[0116] 可以根据本领域中已知的程序,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(Cunningham和Wells,1989,Science[科学]244:1081-1085)来鉴定多肽中的必需氨基酸。在后一种技术中,在分子中的每个残基上引入单一丙氨酸突变,并且测试所得的突变型分子的葡糖淀粉酶活性以鉴别对分子的活性至关重要的氨基酸残基。还参见,Hilton等人,1996,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]271:4699-4708。酶或其他生物学相互作用的活性位点还可以通过结构的物理分析来确定,如由如下技术确定:核磁共振、晶体学(crystallography)、电子衍射、或光亲和标记,连同对推定的接触位点氨基酸进行突变。参见例如,de Vos等人,1992,Science[科学]255:306-312;Smith等人,1992,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]224:899-904;Wlodaver等人,1992,FEBS Lett.[欧洲生化学会联合会快报]309:59-64。还可以从与相关多肽的比对来推断必需氨基酸的身份。

[0117] 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	100.00	99.83	98.99	98.82	96.64	95.97	77.07
	77.12 74.32							
	AMG_NL	99.83	100.00	99.16	98.99	96.81	96.13	77.07
	77.12 74.32							
	AMG_anPAV498	98.99	99.16	100.00	99.83	97.65	96.97	76.73
	76.95 73.82							
	AMG_JPO001	98.82	98.99	99.83	100.00	97.82	97.14	76.73
	76.95 73.82							
[0118]	AMG_JPO124	96.64	96.81	97.65	97.82	100.00	99.33	77.07
	77.12 74.32							
	AMG_JPO172	95.97	96.13	96.97	97.14	99.33	100.00	76.73
	76.78 73.99							
	米克青霉	77.07	77.07	76.73	76.73	77.07	76.73	100.00
	94.75 80.51							
	罗氏青霉	77.12	77.12	76.95	76.95	77.12	76.78	94.75
	100.00 79.66							
	光孢青霉	74.32	74.32	73.82	73.82	74.32	73.99	80.51
	79.66 100.00							

[0119] 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。

[0120] 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3℃,优选地至少4℃、5℃、6℃、7℃或8℃的热稳定性改善(Td),优选地如本文例示的那样所测定的。

[0121] 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℃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。

[0122] 另外的酶

[0123] 任选地,一种或多种另外的酶(如 α -淀粉酶、产麦芽糖淀粉酶、 β -淀粉酶、氨肽酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素分解酶、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、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、卤代过氧化物酶、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、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶和木聚糖酶)可以与本发明的葡糖淀粉酶一起使用。

[0124] 一种或多种另外的酶可以是任何来源的,包括哺乳动物来源的、植物来源的、和微

生物(细菌、酵母或真菌)来源的。

[0125] 酶组合物

[0126] 本发明的成熟热稳定葡萄糖淀粉酶变体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)形式添加至面粉或面团中,或可以作为基本上干的粉末或颗粒被添加至面粉或面团中。

[0127] 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。

[0128] 一种或多种酶能以任何适合的方式添加至面团成分中,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些酶一起添加。

[0129] 本文所描述和要求保护的发明并不局限于本文披露的特定实施例的范围,因为这些实施例旨在作为本发明的几方面的例示性说明。任何等同的实施例连同这些实施例中一个或多个的组合旨在包含在本发明的范围内。

[0130] 本文引用了多个参考,其披露内容通过引用以其全文并入。进一步通过以下实例来描述本发明,这些实例不应理解为限制本发明的范围。

[0131] 实例

[0132] 实例1:PoAMG文库的构建

[0133] 如下构建PoAMG文库:

[0134] 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(TOYOBO)]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。

[0135] PCR反应混合物:

[0136] PrimeSTAR Max DNA聚合酶[宝生物公司(TaKaRa)]

[0137] 总计25 μ l

[0138] 1.0 μ l 模板DNA(1ng/ μ l)

[0139] 9.5 μ l H₂O

[0140] 12.5 μ l 2x PrimeSTAR Max预混物

[0141] 1.0 μ l 正向引物(5 μ M)

[0142] 1.0 μ l 反向引物(5 μ M)

[0143] PCR程序:

[0144] 98°C/2min

[0145] 25x(98°C/10sec,60°C/15sec,72°C/2min)

[0146] 10°C/保持

[0147] 实例2:筛选更好的热稳定性

[0148] 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/L 5N NaOH、10ml/L COVE盐、10ml/L 1M乙酰胺)的96孔或24孔MTP中在32℃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。

[0149] pNPG热稳定性测定:

[0150] 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10μl底物溶液于pH 5.0 200mM NaOAc缓冲液中混合,并且在70℃下孵育20min以进行酶反应。反应后,添加60μl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。

[0151] 表1a.PoAMG变体与其亲本anPAV498或JP0-0001 (anPAV498带前导肽/前肽) 相比的相对活性的列表

[0152]

名称	80℃/75℃下的相对活性(%)
anPAV498	17%
JP0-004	32%
JP0-005	15%
JP0-006	16%
JP0-007	3%

[0153]

名称	80℃/75℃下的相对活性(%)
AnPav498	13%
JP0-009	16%
JP0-011	15%
JP0-012	15%
JP0-013	17%
JP0-020	20%

[0154]

名称	80℃/70℃下的相对活性(%)
JP0-001	10%
JP0-004	29%
JP0-009	13%
JP0-014	21%
JP0-020	16%
JP0-021	30%
JP0-052	33%

[0155]

名称	79℃/70℃下的相对活性(%)
JP0-001	23%
JP0-021	46%
JP0-022	39%
JP0-023	44%

[0156]

JP0-025	51 %
JP0-027	49 %
JP0-029	37 %
名称	77℃/70℃下的相对活性 (%)
JP0-001	72 %
JP0-029	82 %
JP0-047	80 %
JP0-048	90 %
JP0-049	84 %
JP0-050	86 %
JP0-064	87 %

[0157]

名称	79℃/77℃下的相对活性 (%)
JP0-001	36 %
JP0-029	51 %
JP0-047	45 %
JP0-048	81 %
JP0-049	53 %
JP0-050	58 %
JP0-064	65 %

[0158]

名称	79℃/77℃下的相对活性 (%)
JP0-001	41 %
JP0-021	60 %
JP0-022	48 %
JP0-023	57 %
JP0-025	56 %
JP0-027	64 %
JP0-029	66 %
JP0-047	50 %
JP0-048	72 %
JP0-051	82 %
JP0-058	73 %
JP0-062	72 %
JP0-063	85 %
JP0-064	83 %

[0159]

表1b.PoAMG变体与其亲本JP0-022相比的相对活性的列表

[0160]

名称	77°C/70°C 下的相对活性 (%)
JPO-022	60%
JPO-027	67%
JPO-042	8%

[0161]

JPO-044	86%
JPO-045	67%
JPO-046	48%

[0162]

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%

[0163]

名称	79°C/77°C 下的相对活性 (%)
JPO-022	49%
JPO-023	51%
JPO-025	52%
JPO-027	58%
JPO-058	69%
JPO-059	36%
JPO-060	41%
JPO-061	44%
JPO-062	57%

[0164] 表1c.PoAMG变体与其亲本JPO-063相比的相对活性的列表

[0165]

名称	79°C/77°C 下的相对活性 (%)
JPO-063	91%
JPO-066	96%

[0166]

JPO-071	89%
JPO-072	84%
JPO-074	103%
JPO-075	86%
JPO-076	92%
JPO-077	95%
JPO-078	88%
JPO-079	100%

[0167]

名称	84℃/80℃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 %

[0168]

名称	82℃/70℃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 %

[0169]

名称	83℃/80℃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 %

[0170] 表1d.PoAMG变体与其亲本JP0-096相比的相对活性的列表

[0171]	名称	83°C/70°C下的相对活性 (%)
	JP0-082	53 %
	JP0-088	70 %
	JP0-091	69 %
	JP0-092	65 %
	JP0-093	62 %
	JP0-094	74 %
	JP0-095	69 %
	JP0-096	67 %
	JP0-097	65 %
	JP0-098	65 %

	名称	83°C/80°C 下的相对活性 (%)
	JPO-051	20%
[0172]	JPO-096	43%
	JPO-109	51%
	JPO-126	33%

	JPO-129	48%
[0173]	JPO-130	18%
	JPO-131	51%
	JPO-132	34%

[0174] 表1e.PoAMG变体与其亲本JP0-129相比的相对活性的列表

[0175]	名称	84°C/80°C下的相对活性 (%)
	JP0-129	62 %
	JP0-156	51 %
	JP0-160	34 %
	JP0-161	41 %
	JP0-162	49 %
	JP0-163	21 %
	JP0-164	57 %
	JP0-165	77 %

[0176] 表1f.PoAMG变体与其亲本JP0-166相比的相对活性的列表

[0177]	名称	84℃/75℃下的相对活性(%)
	JP0-166	19%
	JP0-167	66%
	JP0-168	58%
	JP0-169	53%
	JP0-171	47%
	JP0-172	98%

[0178] 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
[0179]	anPAV498	P2N P4S P11F T65A K79V Q327F
	JPO-001	R1A P2N P4S P11F T65A K79V Q327F
	JPO-018	D75N R77D A78Q

[0180]

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
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
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

[0181]

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
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

[0182]

	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 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

[0183]

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
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

[0184]		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

[0185] 实例3:黑曲霉的发酵

[0186] 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。

[0187] 实例4:PoAMG(JPO-001)变体的纯化

[0188] 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。

[0189] 实例5:热稳定性测定(TSA)

[0190] 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。

[0191] TSA的设备参数:

[0192] 仪器:LightCycler 480实时PCR系统(罗氏应用科学部(Roche Applied Science))

[0193] 扫描速率:0.02℃/sec

[0194] 扫描范围:37℃-96℃

[0195] 积分时间:1.0秒

[0196] 激发波长465nm

[0197] 发射波长580nm

[0198] 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PoAMG变体的Td表示为anPAV498为0。

[0199] 实例6:PoAMG活性测定

[0200] 通过GOD-POD方法进行的麦芽糖糊精(DE11)测定

[0201] 底物溶液

[0202] 30g麦芽糖糊精(来自松谷化学工业公司(MATSUTANI chemical industry Co., Ltd.)的pindex#2)

[0203] 100ml 120mM乙酸钠缓冲液,pH 5.0

[0204] 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.))

[0205] 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10 μ l的反应溶液与590 μ l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。

[0206] 表3

[0207]

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

[0208]

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
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

[0209]

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
JPO-145	8.2	-

[0210]	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

[0211] 实例7:PoAMG在馒头中的用途

[0212] 通过直接发酵方法制备中国北方馒头,配方如表4和表5所示。本文所用的所有原料都是食品级的,使用PoAMG变体JPO-172(本文所用的75ppm表示24.45mg EP/1000g面粉)和产麦芽糖 α -淀粉酶,本文中的产麦芽糖 α -淀粉酶是Novamyl Boost(诺维信公司的商业产品)。简而言之,将面粉、酵母和馒头改良剂称重并放入面团缸(立式混合器,DIOSNA品牌),然后添加酶和水。将混合物低速搅拌6分钟,直到面团成形并且面团表面光滑,并将面团压片,直到达到理想程度。压片次数取决于手感。压片后,称取约110g面团并将其塑造成馒头形状。在35℃下(室内湿度约为80%),将成型的面团放进醒发机中约40min。醒发后,将面团放进蒸锅(100℃)并汽蒸20min。然后,关闭蒸汽,约5min后,将馒头取出并在室温下冷却2小时,之后将制成的馒头用密封的塑料包装封装,以进行质地和感官评价。

[0213] 馒头的复蒸:将制成的馒头在室温下储存24小时,或在冰箱中在4℃储存48小时,然后在蒸锅(100℃)中复蒸约15min。然后关闭蒸汽,约5min后,将复蒸后的馒头取出以进行感官评价。

[0214] 表4.北方馒头的配方

[0215]

配方	商业供应商	重量百分比% (基于面粉)
小麦面粉	五得利, 中国	100
酵母 (高活性干酵母)	安琪酵母	0.8
馒头改良剂	安琪酵母 (好搭档品牌)	0.5
水		50-52
JPO-172	/	参见表 5
Novamyl Boost	诺维信公司 (Novozymes A/S)	

[0216] 表5:

[0217]

批次	JPO-172	Novamyl Boost
A	0	0
B	75ppm	0
C	0	100ppm

[0218] 样品表征

[0219] 硬度的测定方法:将馒头使用切片机分片 (每个馒头片厚度是1.2cm), 两片切好的馒头片为一组 (厚度为2.4cm), 使用TA.XT Plus质地分析器进行测定。以克为单位, 硬度值越高, 代表制成的馒头品质越差。

[0220] 弹性的测定方法:将馒头使用切片机分片 (每个馒头片厚度是1.2cm)。两片切好的馒头片为一组 (厚度为2.4cm), 使用TA.XT Plus质地分析器进行测定。以%为单位。弹性值越高, 代表制成的馒头品质越好。

[0221] 感官评价:

[0222] 为了进行感官评价, 由小组 (5名训练有素的人员) 评估馒头/复蒸后的馒头的品质。对如柔软度、弹性、外观白度、瓤结构、湿润度、粘聚性、咀嚼性和/或甜度等参数进行评分。批次A中制备的馒头评分为5.0分, 用作基准。取平均值以进行综合评价, 其中平均值得分越高, 代表制成的馒头品质越好。

[0223] 表6. 在室温下储存24小时后馒头的硬度和弹性

[0224]

批次	硬度/g	弹性/%
A	2655	54.96
B	1512	63.21
C	1691	60.67

[0225] 从下表6可以看出, 与对照 (批次A) 相比, 在制备馒头期间使用PoAMG (JPO-172) 和 Novamyl Boost时, 馒头的硬度都显著降低, 同时馒头的弹性也都得到改善。然而, 相比之下, PoAMG (JPO-172) 展现出比Novamyl Boost更好的效果。

[0226] 将各批次制备的馒头在室温下储存24小时后进行感官评价, 结果示于表7中。与对照 (批次A) 相比, 在面团中添加PoAMG (JPO-172) 和Novamyl Boost改善了馒头的感官评价,

如触觉柔软度、触觉弹性、瓤结构、湿润度、粘聚性、以及咀嚼性也有改善。此外,PoAMG(JP0-172)还改善了馒头的甜度。相比之下,PoAMG(JP0-172)在改善馒头品质方面显著优于Novamy1 Boost。

[0227] 表7.馒头的感官评价(在室温下储存24小时后)

	批次	触觉柔软度	触觉弹性	外观白度	瓤结构	湿润度	粘聚性	咀嚼性	甜度	平均值
[0228]	A	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	B	6.3	6.0	4.8	5.1	5.5	5.7	5.7	5.7	5.6
	C	5.8	5.5	4.3	4.9	5.6	5.7	5.7	5.3	5.3

[0229] 将各批次制备的馒头在室温下储存24小时,然后复蒸,接着冷却至室温后对复蒸后的馒头进行感官评价,结果示于表8中。

[0230] 表8.馒头的感官评价(在室温下储存24小时后复蒸)

		触觉柔软度	触觉弹性	外观白度	瓤结构	咀嚼性	甜度	平均值
[0231]	A	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	B	5.6	5.6	5.5	5.6	5.0	5.5	5.5
	C	4.8	4.8	4.4	4.6	4.8	5.0	4.7

[0232] 将各批次制备的馒头在4℃下储存48小时,然后复蒸,接着冷却至室温后对复蒸后的馒头进行感官评价,结果示于表9中。

[0233] 表9:馒头的感官评价(在4℃下储存48小时后复蒸)

		触觉柔软度	触觉弹性	外观白度	瓤结构	咀嚼性	甜度	平均值
[0234]	A	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	B	5.5	5.5	5.5	5.3	5.2	5.4	5.4
	C	4.9	5.0	4.4	5.1	4.7	5.0	4.8

[0235] 从表8和表9可以看出,与对照批次A相比,在面团中添加PoAMG(JP0-172)明显改善了复蒸后的馒头的感官评价,如触觉柔软度、触觉弹性、瓤结构、咀嚼性和甜度都有改善。PoAMG(JP0-172)还改善了复蒸后的馒头的外观白度。然而,相比之下,即使添加了Novamy1 Boost,复蒸后的馒头的感官评价也不好,甚至不如批次A。

[0236] 实例8:POAMG在蒸制米发糕中的用途

[0237] 用根据表10和表11的配方制备蒸制米发糕,简而言之,通过在容器中混合蒸制米发糕预混物粉末和水来制备大米面糊,批次A为无酶对照,在大米面糊中添加PoAMG(JP0-172)作为批次B。混合物被密封并在35℃下发酵16小时,在发酵后添加蔗糖和烘焙粉末。之后,将发酵好的混合物搅拌并放入模具中,然后在蒸锅(100℃)中汽蒸约15分钟。然后关闭蒸汽,约5min后,将蒸制米发糕取出并在室温下冷却3小时,以进行质地和感官评价。

[0238] 表10. 蒸制米发糕的配方

[0239]	配方	重量百分比%(基于预混物粉末)
	蒸制米发糕预混物粉末(可商 购自安琪酵母)	100
	水	100
	蔗糖	17
	烘焙粉末	2

[0240] 表11:

[0241]	批次	内容
	A	0
	B	65mg EP/1000g预混物粉末

[0242] 硬度的测定方法:沿模具外缘将蒸制米发糕的表面切成平面(每个样品的高度为2.5cm),使用TA.XT Plus质地分析器测定硬度。以克为单位,硬度值越高,代表制成的产品品质越差。

[0243] 弹性的测定方法:沿模具外缘将蒸制米发糕的表面切成平面(每个样品的高度为2.5cm),使用TA.XT Plus质地分析器测定弹性。弹性值越高,代表制成的产品品质越好。

[0244] 感官评价:

[0245] 为了进行感官评价,由小组(5名训练有素的人员)评估蒸制米发糕的品质。对如口感柔软度、口感湿润度、口感弹性、瓤结构和甜度等参数进行评分。批次A中制备的蒸制米发糕评分为5.0分,用作基准。取平均值以进行综合评价,其中平均值得分越高,代表制成的蒸制发糕品质越好。

[0246] 制成的蒸制米发糕的感官评价示于表12中。当在面糊中添加PoAMG(JP0-172)时,制成的蒸制发糕的口感柔软度、口感湿润度、口感弹性和甜度得到改善,并且没有瓤结构损失。

[0247] 表12:蒸制米发糕的感官评价

[0248]	批次	口感柔软度	口感湿润度	口感弹性	瓤结构	甜度
	A	5	5	5	5	5
	B	6.4	6.1	5.9	5	5.5

[0249] 此外,质地分析的结果可见于表13中,当将PoAMG(JP0-172)用于蒸制米发糕的制备时,制成的蒸制米发糕具有降低的硬度和改善的弹性。

[0250] 表13. 硬度和弹性

[0251]	批次	硬度/g	弹性/%
	A	3435.25	74.18
	B	1810.09	77.08

P_oxalicum	RPDPKGGNLTFFIHKEGERSLQGI LDNLGGRGKKT PGTAAGLFIAS PNTENPNYYYYTWTR
AMG_NL	RPDPKGGNLTFFIHKEGERSLQGI LDNLGGRGKKT PGTAAGLFIAS PNTENPNYYYYTWTR
AMG_anPAV498	RND SKGGNLTFFIHKEGERSLQGI LDNLGGRGKKT PGTAAGLFIAS PNTENPNYYYYTWTR
JPO001	AND SKGGNLTFFIHKEGERSLQGI LDNLGGRGKKT PGTAAGLFIAS PNTENPNYYYYTWTR
JPO124	AND SKSTNLTFFIHKEGERSLQGI LDNLGGRGKKT PGTAAGLFIAS PNTENPNYYYYTWTR
JPO172	AND SKSTNLTFFIHKEGERSLQGI LDNLGGRGKKT PGTAAGLFIAS PNTENPNYYYYTWTR
P_miczynskii	NPT SKDAKMASYISKEGQRSIVGITENLGGKGSKTPGTAAGLFIAS PNMANPNYYYYTWTR
P_russellii	---SKDGNLASYIAKEGQRSIVGITENLGGKGSKTPGTAAGLFIAS PNMANPNYYYYTWTR
P_glabrum	---NPFNSLDSFILKEGARSYQGI IDNLGNKGVKAPGTAAGLFIAS PNTANPDYFYTWTR
	.: : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
P_oxalicum	DSALTAKCLIDLFEDSRAKFPIDRKYLETGIRDYVSSQAILQSVSNPSGTLKDGSGLGEP
AMG_NL	DSALTAKCLIDLFEDSRAVFPIDRKYLETGIRDYVSSQAILQSVSNPSGTLKDGSGLGEP
AMG_anPAV498	DSALAAKCLIDLFEDSRAVFPIDRKYLETGIRDYVSSQAILQSVSNPSGTLKDGSGLGEP
JPO001	DSALAAKCLIDLFEDSRAVFPIDRKYLETGIRDYVSSQAILQSVSNPSGTLKDGSGLGEP
JPO124	DSALAAKCLIDLFEDSRAVFPIDRKYLETGIRDYVSSQAILQSVSNPSGTLKDGSGLGEP
JPO172	DSALAAKCLIDLFEDSRAVFPIDRKYLETGIRDYVSSQAILQSVSNPSGTLKDGSGLGEP
P_miczynskii	DSALTFKCLIDLFETSQDY-ISRKELETDIRNYVSSQAVLQNVSNPSGTLKDGSGLGEP
P_russellii	DSALTFKCLIDLFETSQDY-ISRKELETDIRNYVSSQAVLQNVSNPSGTLKDGSGLGEP
P_glabrum	DSALTFKCLIDLFEGGSTEFGLKNSLETDIRNYVSSQAVLQNVSNPSGTLKDGSGLGEP
	****: *****: . : :... * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
P_oxalicum	KFEIDLNPFGAWGRPQRDGPALRATAMITYANYLISHGQKSDVSQVMWPIIANDLAYVG
AMG_NL	KFEIDLNPFGAWGRPQRDGPALRATAMITYANYLISHGQKSDVSQVMWPIIANDLAYVG
AMG_anPAV498	KFEIDLNPFGAWGRPQRDGPALRATAMITYANYLISHGQKSDVSQVMWPIIANDLAYVG
JPO001	KFEIDLNPFGAWGRPQRDGPALRATAMITYANYLISHGQKSDVSQVMWPIIANDLAYVG
JPO124	KFEIDLNPFGAWGRPQRDGPALRATAMITYANYLISHGQKSDVSQVMWPIIANDLAYVG
JPO172	KFEIDLNPFGAWGRPQRDGPALRATAMITYANYLISHGQKSDVSQVMWPIIANDLAYVG
P_miczynskii	KFEIDLNPFGSWGRPQRDGPALRATAMITYADWLISHGKSEANIMWPIIANDLAYVG
P_russellii	KFEIDLNPFGSWGRPQRDGPALRATAMITYADWLISHGKSEANIMWPIIANDLAYVG
P_glabrum	KFEVDLNPFTGSWGRPQRDGPALRATAMITYADWLISHGKSEANIMWPIIANDLAYVG
	: **: * . *****: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
P_oxalicum	QYWNNTGFDLWEEVDGSSFFTTIAVQHRALVEGSQ LAKKL GKSCDACDSQPPQILCFLQSF
AMG_NL	QYWNNTGFDLWEEVDGSSFFTTIAVQHRALVEGSQ LAKKL GKSCDACDSQPPQILCFLQSF
AMG_anPAV498	QYWNNTGFDLWEEVDGSSFFTTIAVQHRALVEGSQ LAKKL GKSCDACDSQPPQILCFLQSF
JPO001	QYWNNTGFDLWEEVDGSSFFTTIAVQHRALVEGSQ LAKKL GKSCDACDSQPPQILCFLQSF
JPO124	QYWNNTGFDLWEEVDGSSFFTTIAVQHRALVEGSQ LAKKL GKSCDACDSQPPQILCFLQSF
JPO172	QYWNNTGFDLWEEVDGSSFFTTIAVQHRALVEGSQ LAKKL GKSCDACDSQPPQILCFLQSF
P_miczynskii	QYWNNTGFDLWEEVDGSSFFTTIAVQHRALVEGSQ LAKKL GKSCDACDSQPPQILCFLQSF
P_russellii	QYWNNTGFDLWEEVDGSSFFTTIAVQHRALVEGSQ LAKKL GKSCDACDSQPPQILCFLQSF
P_glabrum	QYWNNTGFDLWEEVDGSSFFTTIAVQHRALVEGSQ LAKKL GKSCDACDSQPPQILCFLQSF
	****: *****: *****: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
P_oxalicum	WNGKYITSNINTQASRSGIDLDSVLGSIHTFDPEAACDDATFQPC SARALANHKVYVDSF
AMG_NL	WNGKYITSNINTQASRSGIDLDSVLGSIHTFDPEAACDDATFQPC SARALANHKVYVDSF
AMG_anPAV498	WNGKYITSNINTQASRSGIDLDSVLGSIHTFDPEAACDDATFQPC SARALANHKVYVDSF
JPO001	WNGKYITSNINTQASRSGIDLDSVLGSIHTFDPEAACDDATFQPC SARALANHKVYVDSF
JPO124	WNGKYITSNINTQASRSGIDLDSVLGSIHTFDPEAACDDATFQPC SARALANHKVYVDSF
JPO172	WNGKYITSNINTQASRSGIDLDSVLGSIHTFDPEAACDDATFQPC SARALANHKVYVDSF
P_miczynskii	WNGNYITANINLDTSRSGIDLDSVLGSIHTFDPEAACDDSTFQPC SARALANHKVYVDAF
P_russellii	WNGNYITANINLDTSRSGIDLDSVLGSIHTFDPEAACDDSTFQPC SARALANHKVYVDAF
P_glabrum	WNGNYITANINLDTSRSGIDLDSVLGSIHTFDPEAACDDSTFQPC SARALANHKVYVDAF
	***: ***: *** : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

图1

图1-续