(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0027570
(43) 공개일자 2024년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/43 (2006.01) *A23L 2/60* (2006.01)
A23L 25/10 (2016.01) *A23L 27/30* (2016.01)
A23L 27/60 (2016.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/43 (2013.01)
A23L 2/60 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7024796
(22) 출원일자(국제) 2021년12월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년07월19일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2021/062109
(87) 국제공개번호 WO 2022/137121
국제공개일자 2022년06월30일
(30) 우선권주장
63/128,207 2020년12월21일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
아마이 프로테인스 엘티디.
이스라엘, 7670402 레호보트, 헤임 홀즈만 스트리트 2에이
(72) 발명자
사미쉬, 일란
이스라엘, 7670402 레호보트, 하임 홀즈만 스트리트 2A
카스, 이타마르
이스라엘, 7670402 레호보트, 하임 홀즈만 스트리트 2A
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
성낙훈

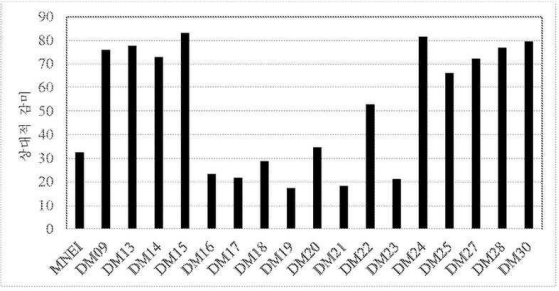
전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 **향미 개질 단백질 및 이를 함유하는 식품 제품**

(57) 요 약

본 발명은 기준 MNEI 단백질로부터 2개 이상의 아미노산 결실, 삽입, 대체, 또는 이의 임의의 조합을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 개질된 MNEI 단백질; 및 식품 산업에서의 이의 용도에 관한 것이며, 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질과 비교하여 적어도 하나의 개선된 식품 관련 특성을 갖는다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 25/10 (2016.08)
A23L 27/31 (2016.08)
A23L 27/60 (2016.08)

(72) 발명자
헤흐트, 달리트
이스라엘, 7670402 레호보트, 하임 홀즈만 스트리트 2A
마르코, 슈무엘
이스라엘, 7670402 레호보트, 하임 홀즈만 스트리트 2A
주커, 인바르
이스라엘, 7670402 레호보트, 하임 홀즈만 스트리트 2A

(30) 우선권주장
63/174,550 2021년04월14일 미국(US)
63/223,608 2021년07월20일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

기준 MNEI 단백질로부터 2개 이상의 아미노산 결실, 삽입, 대체, 또는 이의 임의의 조합을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 개질된 단쇄 모넬린(MNEI) 단백질로서, 기준 MNEI 단백질과 비교하여 적어도 하나의 개선된 식품 관련 특성을 갖는 개질된 MNEI 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 적어도 2개 이상의 아미노산 결실, 대체, 또는 이의 임의의 조합은 기준 MNEI 단백질의 표면상에 또는 기준 MNEI 단백질의 코어 내에 위치하는, 개질된 MNEI 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 적어도 2개 이상의 아미노산 결실, 삽입, 대체, 또는 이의 임의의 조합은 잔기 46 내지 56에 걸치는 개질된 MNEI 단백질 루프(loop) 및 베타 가닥 가장자리 내에 위치하는, 개질된 MNEI 단백질.

청구항 4

기준 MNEI 단백질과 40% 내지 98%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 개질된 MNEI 단백질로서, 기준 MNEI 단백질과 비교하여 적어도 하나의 개선된 식품 관련 특성을 갖는 개질된 MNEI 단백질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 로제타 에너지 단위(REU: Rosetta Energy Unit)로 제공된 -182 미만인 에너지를 갖는 개질된 MNEI 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 식품 관련 특성은 감미 역가, 감미 동력학, 차폐(masking) 효과, 맛 증강(enhancing taste), 및 이미(off-taste) 중 적어도 하나인, 개질된 MNEI 단백질.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 기준 MNEI 단백질과 비교하여 적어도 1.5배 증가된 감미 역가를 갖는 개질된 MNEI 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 기준 MNEI 단백질과 비교하여 다음 중 적어도 하나를 특징으로 하는 개질된 MNEI 단백질: (1) 증가된 열 안정성, (2) 증가된 pH 안정성, (3) 증가된 용해도, (4) 소수성 영역에 대한 감소된 결합, (5) 고압 안정성, 및 (6) 증가된 저장 수명 안정성.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10, 서열 번호 11, 서열 번호 12, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15, 서열 번호 16, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 및 서열 번호 21, 또는 이의 단편 또는 변형으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 개질된 MNEI 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 기준 MNEI 단백질은 서열 번호 45로 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 개질된 MNEI 단백질.

청구항 11

경구 전달을 위한 제품의 제조에서의 용도를 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 개질된 MNEI 단백질, 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 2개 이상의 개질된 MNEI 단백질의 임의의 조합.

청구항 12

제11항에 있어서, 제품은 식품 제품, 식품 보조 제품, 또는 약제인, 개질된 MNEI 단백질 또는 MNEI 단백질의 조합.

청구항 13

향미 개질제, 향미 증강제, 또는 향미 차폐제로서의 용도를 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 개질된 MNEI 단백질, 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 2개 이상의 개질된 MNEI 단백질의 임의의 조합.

청구항 14

감미료로서의 용도를 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 개질된 MNEI 단백질, 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 2개 이상의 개질된 MNEI 단백질의 임의의 조합.

청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 개질된 MNEI 단백질 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 2개 이상의 개질된 MNEI 단백질의 임의의 조합을 포함하는 식품 제품.

청구항 16

제15항에 있어서, 적어도 하나의 식품 성분을 포함하는 식품 제품.

청구항 17

제16항에 있어서, 식품 성분은 인공 향미료, 식품 첨가제, 식품 착색제, 보존제, 또는 감미 증강제 중 적어도 하나인, 식품 제품.

청구항 18

제17항에 있어서, 식품 성분은 스테비아, 수크로스, 아가베 시럽, 현미 시럽, 대추야자 설탕, 꿀, 메이플 시럽, 당밀, 나한과, 당알코올, 희소당(rare sugar), 아스파탐, 수크랄로스, 아세설팜 칼륨, 사카린, 네오탐, 어드반탐(advantame), 및 식이 섬유로 구성된 군으로부터 선택되는, 식품 제품.

청구항 19

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 개질된 MNEI 단백질 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 2개 이상의 개질된 MNEI 단백질의 임의의 조합을 포함하는, 감미 조성물.

청구항 20

제19항에 따른 감미 조성물을 포함하는 섭취 가능한 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 낮은 혈당 효과를 갖고 액체 또는 고체 식품의 형태인 섭취 가능한 조성물.

청구항 22

하나 이상의 개질된 단쇄 모넬린(MNEI) 단백질을 포함하는 식품 또는 음료 제형으로서, 상기 하나 이상의 개질된 MNEI 단백질은 100 그램 또는 100 ml당 약 0.2 mg 내지 약 30 mg 범위인, 식품 또는 음료 제형.

청구항 23

제22항에 있어서, 약 2 내지 약 8.5 범위의 pH를 갖는 식품 또는 음료 제형.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 개질된 MNEI 단백질은 서열 번호 45로 제시된 서열을 포함하는 기준 MNEI 단백질과 40% 내지 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 식품 또는 음료 제형.

청구항 25

제22항에 있어서, 개질된 MNEI 단백질은 서열 번호 1 내지 27, 또는 이의 단편 또는 변형으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 식품 또는 음료 제형.

청구항 26

인간 대상체에 의한 소비를 위해 제형화된 식품 또는 음료 조성물로서, 제22항 내지 제25항 중 어느 한 항의 제형을 포함하는 식품 또는 음료 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 음료는 탄산 청량 음료, 비-탄산 청량 음료, 기호 음료(fountain beverage), 냉동 즉석 음료(frozen ready-to-drink beverage), 커피 음료, 차 음료, 낙농 음료, 과일 음료, 착향수, 증강수(enhanced water), 스포츠 음료, 에너지 음료, 등장 음료, 저칼로리 음료, 및 알코올 음료로 구성된 군으로부터 선택되는, 음료 조성물.

청구항 28

제26항에 있어서, 식품은 베이커리 제품, 쿠키, 비스킷, 베이킹 믹스, 시리얼, 과자류, 캔디, 토피(toffee), 추잉검, 풍선검, 유제품, 요거트, 착향 요거트, 땅콩 버터, 간장 및 다른 대두 기반 제품, 비유제품, 샐러드 드레싱, 케첩, 마요네즈, 식초, 빙과류, 식육 가공품, 어육 가공품, 병제품 및 캔제품, 식탁용 감미료(tabletop sweetener), 초콜릿, 과일, 건과일, 및 야채로 구성된 군으로부터 선택되는, 식품 조성물.

청구항 29

제26항에 있어서, 기준 MNEI 단백질을 갖는 식품 또는 음료 조성물과 비교하여 적어도 하나의 개선된 식품 또는 음료 관련 특성을 갖는 식품 또는 음료 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 적어도 하나의 개선된 식품 또는 음료 관련 특성은 더 양호한 감미 프로파일, 단축된 단맛 여운(shortened sweet taste lingering), 더 양호한 감미 역가, 더 양호한 감미 동력학, 증가된 열 안정성, 고압 안정성, 증가된 pH 안정성, 소수성 영역에 대한 감소된 결합, 개선된 동결-융해 안정성, 건조 후 개선된 복원성, 증가된 용해도, 당의 것에 더 가까운 관능 프로파일, 및 증가된 저장 수명 안정성으로 구성된 군으로부터 선택되는, 식품 또는 음료 조성물.

청구항 31

제26항에 있어서, 적어도 하나의 추가의 식품 성분을 포함하는 식품 또는 음료 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 식품 성분은 향미료, 식품 첨가제, 식품 착색제, 보존제, 및 감미 증강제로 구성된 군으로부터 선택되는, 식품 또는 음료 조성물.

청구항 33

제31항에 있어서, 식품 성분은 스테비아, 수크로스, 아가베 시럽, 현미 시럽, 대추야자 설탕, 꿀, 메이플 시럽, 당밀, 스테비올 배당체, 나한과, 당알코올, 희소당, 아스파탐, 수크랄로스, 아세설팜 칼륨, 사카린, 네오탐, 어드반탐, 및 식이 섬유로 구성된 군으로부터 선택되는, 식품 또는 음료 조성물.

청구항 34

제26항에 있어서, 낮은 혈당 효과를 갖는 식품 또는 음료 조성물.

청구항 35

제27항에 있어서, 탄산 청량 음료는 콜라, 레몬-라임 착향 스파클링 음료, 오렌지 착향 스파클링 음료, 자몽 착향 스파클링 음료, 포도 착향 스파클링 음료, 라즈베리 착향 스파클링 음료, 딸기 착향 스파클링 음료, 파인애플 착향 스파클링 음료, 진저에일, 루트 비어, 및 맥아 음료로 구성된 군으로부터 선택되는, 음료 조성물.

청구항 36

제27항에 있어서, 비-탄산 청량 음료는 과일 쥬스, 과일 착향 쥬스, 쥬스 음료, 넥타(nectar), 야채 쥬스, 야채 착향 쥬스, 스포츠 음료, 에너지 음료, 단백질 음료, 비타민 증강수, 니어 워터 음료(near water drink), 코코넛수, 차, 커피, 코코아 음료, 우유 성분 함유 음료, 시리얼 추출물 함유 음료, 및 스무디로 구성된 군으로부터 선택되는, 음료 조성물.

청구항 37

제22항의 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 청량 음료.

청구항 38

제22항의 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 유제품.

청구항 39

제22항의 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 소스 제품.

청구항 40

제22항의 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 건과일 제품.

청구항 41

제22항의 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 검 제품.

청구항 42

제22항의 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 스프레드 제품(spread product).

청구항 43

제22항의 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 시럽 제품.

청구항 44

제1항에 있어서, 상기 아미노산 결실, 치환, 대체, 그래프팅, 또는 이의 임의의 조합은 (i) 적어도 하나의 수소결합의 첨가, (ii) 루프 영역을 보유하는 베타 가닥의 연장, (iii) 루프 영역에서 상대적 데바이-월러 인자(Debye-Waller factor)의 감소, 또는 (iv) 이의 임의의 조합 중 적어도 하나에 의해 개질된 단백질의 루프 영역을 안정화시킬 수 있는, 개질된 단쇄 모넬린(MNEI) 단백질.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 안정화는 (i) 응집 감소, (ii) 용융 온도 증가, (iii) 저장 수명 안정성 증가, 또는 (iv) 이의 임의의 조합 중 적어도 하나가 가능한, 개질된 단쇄 모넬린(MNEI) 단백질.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 향미 개질 단백질 및 이를 포함하는 제형과 식품 제품에 관한 것이다. 향미 개질 단백질은 동물 사료 및 인간 섭취를 위해 다양한 제형으로 제공될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 당 대체제는 대사 증후군의 근본적 원인으로서의 당 과잉섭취로 인한 증가된 질환 인식때문에 증가된 주목을 받았다. 대사 증후군의 알려진 징후는 당뇨, 비만, 충치, 몇몇의 유형의 암, 및 다수의 추가의 질병이다. 식품 및 음료 산업은 소비자 및 공공 정책 관계자의 요구를 충족시키도록 더 건강하고, 저감된 칼로리의 식품을 제조하는 것이 요구되고 있다. 이러한 수많은 나라 중 일부는 당 소비세 및 경고 라벨을 적용하고 있다.

[0003] 식품 산업은 성공적 제품에 필요한 맛을 제공하면서, 소비자 추세에 맞는, 당신을 위한 보다 천연적이고 우수한 식품 및 음료를 제조하는 도전 과제에 직면한다. 저칼로리 감미료 성분은 이들의 식단에서 칼로리 및 당 수준을 낮추기를 기대하는 소비자에게 확장된 선택사항을 갖지만, 이들 성분은 맛, 안정성, 및 다용성에 의해 제한된다.

[0004] 성공적으로 글로벌 시장에서 경쟁하기 위해 최적의 관능 특성 및 양호한 안정성을 갖는 식품 및 음료 제품을 위한 건강한 감미 대체제에 대한 긴급한 글로벌 요구가 존재한다. 인공적 고강도 감미료(HIS), 예컨대 사카린, 아스파탐, 사이클라메이트, 및 아세설팜 K, 수크랄로스, 네오탐, 및 어드반탐(advantame)이 당관련 질병, 예컨대 당뇨, 고지혈증, 대사 증후군 등을 앓는 환자를 위해 저칼로리 감미료로서 전세계적으로 사용된다. HIS는 다양한 부작용을 가지며, 예를 들어 이러한 제로-칼로리 감미료는 마이크로바이옴과 상호작용하고, 당보다 더 적은 정도이기는 하지만 비만 및 당뇨 전증 병태를 유발하는 것으로 보고되었다(문헌[Suez et al., 2014, Nature volume 514, pages 181 -186]). 미국 심장 협회는 "부정적 건강 효과에 대한 증거 부족"이 존재함을 주장하면서 HIS에 대한 주의문을 발표하였다(문헌[Johnson et al., 2018, Circulation, Vol. 138, No. 9]). 이 주의문에서, 천연(스테비올 배당체 및 나한과) 및 인공의 모든 HIS는 동일한 정밀 조사 하에 놓였다. 추가적으로, 저강도 감미료(LIS), 즉, 희소당(rare sugar) 및 폴리올(예를 들어, 자일리톨, 만니톨, 알룰로스 등)은 고비용과 연관되며, 인간 신체에 의해 완전히 소화되지 않아서, 복부 팽만감(bloating), 설사, 및 다른 부정적 위장 영향을 피하기 위해서 이들의 사용을 제한한다. 따라서, 현재, 유의하게(>30%) 당이 감소될 수 있도록 하며, 맛, 건강, 비용, 및 제품 적합성을 완전히 해결하는 양호한 당 대체제가 존재하지 않는다.

[0005] 단백질은 수크로스와 달리 인슐린 반응을 유도하지 않기 때문에, 감미 단백질(SP)은 혈당 지수를 갖지 않는 천연, 감칠맛의 저칼로리 감미료를 제공함으로써 HIS를 대체할 가능성을 갖는다(문헌[Weihrauch 2001 and Cohen 2001]). SP는 외래 과일에서 발견되며, 당보다 700 내지 3,000배 더 달다. 이들 건강한 감미료는 당과 같은 감미 수용체에 결합하지만, 단백질로서 소화된다. 이들은 0의 혈당 지수, 약 0 칼로리를 가지며, 우리의 건강 또는 마이크로바이옴에 대한 부정적 효과를 갖지 않는 것으로 기대된다. 타우마틴은 현재 시장에서 글로벌하게 승인된 유일한 감미 단백질이다. 높은 가격, 제한된 공급, 및 차선의 관능 프로파일로 인해, SP는 일반적으로 유의한(>30%) 당-감소 해결책으로서 사용되지는 않는다. 타우마틴 외에, SP는 비용, 제한된 공급, 낮은 안정성, 특히 지방 환경에서의 짧은 저장 수명, 및 여운 맛(lingering taste)으로 인해 대규모 식품 시장에 진입하지 않았다. 따라서, 상기 언급된 문제 중 하나 이상을 극복할 조성물 및 제형을 개발하는 것에 대한 요구가 존재한다.

[0006] 독일 특허출원공개 GB2123672호는 다양한 음료, 구강 청결제에서 또는 약학적 베이스로서 선택적으로 식품 산 또는 벌크화제와 함께 감미 단백질, 예컨대 타우마틴 및 모넬린, 및 혼입된 약산성 다당류 검을 기술한다.

[0007] 국제공개 WO8402450호는 검 베이스, 감미료, 및 향미료를 포함하는 추잉검 조성물의 표면에 대한 타우마틴 또는 모넬린의 적용을 서술한다.

[0008] 국제공개 WO2019215730호는 개선된 식품 관련 특성을 갖는 개질된 단백질을 개시하고 있다.

발명의 내용

[0009] 일부 양태에 따르면, 본 개시내용은 MNEI 기준 단백질로부터 2개 이상의 아미노산 결실, 삽입, 대체, 또는 이의 임의의 조합을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단쇄 모넬린(MNEI) 단백질의 개질된 버전을 제공하며, 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질과 비교하여 적어도 하나의 개선된 식품 관련 특성을 갖는다.

[0010] 일부 다른 양태에 따르면, 본 개시내용은 MNEI 기준 단백질로부터 2개 이상의 아미노산 결실, 삽입, 대체, 또는

이의 임의의 조합을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 개질된 MNEI 단백질을 포함하는 식품 제품을 제공하며, 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질과 비교하여 적어도 하나의 개선된 식품 관련 특성을 갖는다. 일부 실시형태에 따르면, 개질된 단백질은 기준 MNEI 단백질로부터 적어도 3개의 아미노산 결실, 삽입, 대체, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0011] 일부 실시형태에 따르면, 2개 이상의 아미노산 결실, 삽입, 대체, 또는 이의 임의의 조합은 기준 MNEI 단백질의 표면 상에 또는 기준 MNEI 단백질의 코어 내에 위치한다. 일부 실시형태에 따르면, 2개 이상의 아미노산 결실, 삽입, 대체, 또는 이의 임의의 조합은 개질된 MNEI 루프(loop)('링커 영역'으로도 칭함) 및 베타-가닥 가장자리 내에 위치한다. 일부 실시형태에 따르면, 2개 이상의 아미노산 결실, 삽입, 대체, 또는 이의 임의의 조합은 잔기 46 내지 56에 걸치는 개질된 MNEI 루프 및 베타 가닥 가장자리 내에 위치한다.

[0012] 일부 실시형태에 따르면, (i) 적어도 하나의 수소 결합의 첨가, (ii) 루프 영역을 보유하는 베타 가닥의 연장, (iii) 루프 영역에서 상대적 데바이-월러 인자(Debye-Waller factor)의 감소, 또는 (iv) 이의 임의의 조합 중 적어도 하나에 의해 루프 영역을 안정화시키는 상기 아미노산 결실, 치환, 대체, 그래프팅, 또는 이의 임의의 조합. 일부 실시형태에 따르면, 상기 안정화는 (i) 응집 감소, (ii) 용융 온도 증가, (iii) 저장 수명 안정성 증가, 또는 (iv) 이의 임의의 조합 중 적어도 하나와 연관된다.

[0013] 일부 실시형태에 따르면, 개질된 MNEI 단백질은 로제타 에너지 단위(REU: Rosetta Energy Unit)로 제공된 -182 미만의 에너지를 갖는다.

[0014] 일부 실시형태에 따르면, 적어도 하나의 식품 관련 특성은 감미 역가, 감미 동력학, 차폐(masking) 효과, 맛 증강(enhancing taste), 이미(off-taste), 또는 이의 임의의 조합 중 적어도 하나이다. 일부 실시형태에 따르면, 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질과 비교하여 적어도 1.5배 증가된 감미 역가를 갖는다.

[0015] 일부 실시형태에 따르면, 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질과 비교하여 다음 중 적어도 하나를 특징으로 한다: (1) 증가된 열 안정성, (2) 증가된 pH 안정성, (3) 증가된 용해도, (4) 소수성 영역에 대한 감소된 결합, (5) 고압 안정성, (6) 증가된 저장 수명 안정성, 및 이의 임의의 조합.

[0016] 일부 실시형태에 따르면, 개질된 MNEI 단백질은 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10, 서열 번호 11, 서열 번호 12, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15, 서열 번호 16, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 및 서열 번호 21, 또는 이의 단편 또는 변형으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0017] 일부 실시형태에 따르면, 기준 MNEI 단백질은 서열 번호 45로 제시된 서열을 갖는다.

[0018] 일부 실시형태에 따르면, 개질된 MNEI 단백질 또는 이의 임의의 조합은 경구 전달을 위한 제품의 제조에서 사용된다.

[0019] 일부 실시형태에 따르면, 제품은 식품 제품, 식품 보조 제품, 또는 약제이다.

[0020] 일부 실시형태에 따르면, 개질된 MNEI 단백질 또는 이의 임의의 조합은 향미 개질제 또는 향미 증강제로서 사용된다.

[0021] 일부 실시형태에 따르면, 개질된 MNEI 단백질은 감미료로서 사용된다.

[0022] 일부 양태에 따르면, 본 개시내용은 본 발명의 개질된 단백질을 포함하는 식품 제품을 제공한다.

[0023] 일부 실시형태에 따르면, 식품 제품은 적어도 하나의 식품 성분을 포함한다. 일부 실시형태에 따르면, 식품 성분은 인공 향미료, 식품 첨가제, 식품 착색제, 보존제, 또는 당 첨가제 중 적어도 하나이다. 일부 실시형태에 따르면, 식품 성분은 스테비아, 수크로스, 아가베 시럽, 현미 시럽, 대추야자 설탕, 꿀, 메이플 시럽, 당밀, 나한과, 당알코올, 희소당, 아스파탐, 수크랄로스, 아세설팜 칼륨, 사카린, 네오탐, 어드반탐, 및 식이 섬유로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0024] 일부 실시형태에 따르면, 상기 스테비아는 리바우디오사이드(rebaudioside) 또는 스테비올 배당체이다. 일부 실시형태에 따르면, 상기 리바우디오사이드는 RebM이다.

[0025] 일부 실시형태에 따르면, RebM과 본 발명의 개질된 MNEI 단백질 사이에는 상승 효과가 존재한다.

[0026] 일부 양태에 따르면, 본 개시내용은 본 발명의 개질된 MNEI 단백질을 포함하는 감미 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에 따르면, 본 개시내용은 상기 감미 조성물을 포함하는 섭취 가능한 조성물을 제공한다.

[0027] 일부 실시형태에 따르면, 섭취 가능한 조성물은 낮은 혈당 효과를 갖고, 액체 또는 고체 식품의 형태이다.

[0028] 일부 양태에 따른 본 발명은 개선된 식품 또는 음료 관련 특성을 갖는 특정 식품 및 음료 제형을 제공한다.

[0029] 일부 양태에 따르면, 본 개시내용은 100 그램 또는 100 ml당 약 0.2 mg 내지 약 30 mg 범위의 하나 이상의 개질된 단쇄 모넬린(MNEI) 단백질을 포함하는 식품 또는 음료 제형을 제공한다. 일부 실시형태에 따르면, 범위는 100 그램 또는 100 ml당 약 0.4 mg 내지 약 10 mg 범위이다.

[0030] 일부 실시형태에 따르면, 상기 제형은 약 2 내지 약 8.5 범위의 pH를 갖는다.

[0031] 일부 실시형태에 따르면, 상기 개질된 MNEI 단백질은 서열 번호 45로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 기준 MNEI 단백질과 40% 내지 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0032] 일부 실시형태에 따르면, 개질된 MNEI는 서열 번호 1 내지 27, 또는 이의 단편 또는 변형으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0033] 일부 실시형태에 따르면, 개질된 MNEI 단백질은 소화 가능한 단백질이다.

[0034] 일부 양태에 따르면, 본 발명은 인간 대상체에 의한 소비를 위해 제형화된 식품 또는 음료 조성물을 제공하며, 조성물은 상기 제형을 포함한다.

[0035] 일부 실시형태에 따르면, 음료 조성물은 탄산 청량 음료, 비-탄산 청량 음료, 기호 음료(fountain beverage), 냉동 즉석 음료(frozen ready-to-drink beverage), 커피 음료, 차 음료, 낙농 음료, 과일 음료, 착향수, 증강수(enhanced water), 스포츠 음료, 에너지 음료, 등장 음료, 저칼로리 음료, 및 알코올 음료로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0036] 일부 실시형태에 따르면, 식품 조성물은 빵류(baked good), 쿠키, 비스킷, 베이킹 믹스, 시리얼, 과자류, 캔디, 토피(toffee), 추잉검, 유제품, 요거트, 착향 요거트, 간장 및 다른 대두 기반 제품, 비유제품, 샐러드 드레싱, 케첩, 마요네즈, 식초, 빙과류, 식육 가공품, 어육 가공품, 병제품 및 캔제품, 식탁용 감미료(tabletop sweetener), 초콜릿, 과일, 건과일, 및 야채로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0037] 일부 실시형태에 따르면, 상기 조성물은 기준 MNEI 단백질을 갖는 식품 또는 음료 조성물과 비교하여 적어도 하나의 개선된 식품 또는 음료 관련 특성을 갖는다.

[0038] 일부 실시형태에 따르면, 적어도 하나의 개선된 식품 또는 음료 관련 특성은 개선된 감미 프로파일, 단축된 단맛 여운(shortened sweet taste lingering), 개선된 감미 역가, 개선된 감미 동력학, 증가된 열 안정성, 고압 안정성, 증가된 pH 안정성, 소수성 영역에 대한 감소된 결합, 개선된 동결-융해 안정성, 건조 후 개선된 복원성, 증가된 용해도, 당의 것에 더 가까운 관능 프로파일, 및 증가된 저장 수명 안정성으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0039] 일부 실시형태에 따르면, 적어도 하나의 추가의 식품 성분을 포함하는 식품 또는 음료 조성물.

[0040] 일부 실시형태에 따르면, 식품 성분은 향미료, 식품 첨가제, 식품 착색제, 보존제, 또는 감미 증강제 중 적어도 하나이다.

[0041] 일부 실시형태에 따르면, 식품 성분은 스테비아, 수크로스, 아가베 시럽, 현미 시럽, 대추야자 설탕, 꿀, 메이플 시럽, 당밀, 스테비올 배당체, 나한과, 당알코올, 희소당, 아스파탐, 수크랄로스, 아세설팜 칼륨, 사카린, 네오탐, 어드반탐, 및 식이 섬유로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0042] 일부 실시형태에 따르면, 희소당은 알룰로스 또는 타가토스이다.

[0043] 일부 실시형태에 따르면, 식품 또는 음료 조성물은 낮은 혈당 효과를 갖는다.

[0044] 일부 실시형태에 따르면, 탄산 청량 음료는 콜라, 레몬-라임 착향 스파클링 음료, 오렌지 착향 스파클링 음료, 자몽 착향 스파클링 음료, 포도 착향 스파클링 음료, 라즈베리 착향 스파클링 음료, 딸기 착향 스파클링 음료, 파인애플 착향 스파클링 음료, 진저에일, 루트 비어, 및 맥아 음료로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0045] 일부 실시형태에 따르면, 비-탄산 청량 음료는 과일 쥬스, 과일 착향 쥬스, 쥬스 음료, 넥타(nectar), 야채 쥬스, 야채 착향 쥬스, 스포츠 음료, 에너지 음료, 단백질 음료, 비타민 증강수, 니어 워터 음료(near water drink), 코코넛수, 차, 커피, 코코아 음료, 우유 성분 함유 음료, 시리얼 추출물 함유 음료, 및 스무디로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0046] 일부 실시형태에 따르면, 제형은 경구 전달을 위한 제품의 제조에서 사용된다.

[0047] 일부 실시형태에 따르면, 제품은 식품 또는 음료 제품, 식이 보충 제품, 또는 약제이다.

[0048] 일부 양태에 따르면, 본 개시내용은 본 발명의 제형을 포함하는 식품 또는 음료 제품을 제공한다.

[0049] 일부 양태에 따르면, 본 개시내용은 상기 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 청량 음료를 제공한다.

[0050] 일부 양태에 따르면, 본 개시내용은 상기 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 유제품을 제공한다. 일부 실시형태에 따르면, 상기 유제품은 요거트 또는 말라비이다.

[0051] 일부 양태에 따르면, 본 개시내용은 상기 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 소스 제품을 제공한다. 일부 실시형태에 따르면, 상기 소스는 케첩이다.

[0052] 일부 양태에 따르면, 본 개시내용은 상기 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 건과일을 제공한다. 일부 실시형태에 따르면, 상기 건과일은 크랜베리, 건포도, 블루베리, 프룬, 체리, 사과, 파인애플, 멜론, 캔탈로프, 무화과, 바나나, 대추, 커런트(currant), 및 살구로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에 따르면, 상기 건과일은 과일 레더(fruit leather)이다.

[0053] 일부 양태에 따르면, 본 개시내용은 상기 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 검 제품을 제공한다. 일부 실시형태에 따르면, 상기 검 제품은 추잉검 또는 풍선검 제품이다.

[0054] 일부 양태에 따르면, 본 개시내용은 상기 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 스프레드 제품(spread product)을 제공한다. 일부 실시형태에 따르면, 상기 스프레드 제품은 땅콩 버터이다.

[0055] 일부 양태에 따르면, 본 개시내용은 상기 제형을 포함하는 저가당 또는 무가당 시럽 제품을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0056] 이제, 본원에 개시된 기술 요지를 더 잘 이해하고, 이것이 실제로 실시될 수 있는 방법을 예시하기 위해, 실시형태가 첨부된 도면을 참조하여 단지 비제한적 실시예로서 설명될 것이다.

도 1은 MNEI의 상대적 감미를 보여주는 히스토그램이며, MNEI 개질된 단백질의 감미는 DM09에 대해 수 중에 희석된 1:4000의 역가를 기반으로 하는 6° Bx에서 평가되었다.

도 2a 내지 2d는 MNEI(도 2a), DM13(도 2b), DM28(도 2c), 및 DM31(도 2d)의 감미 강도의 용량-반응을 보여주는 그래프이다.

도 3은 90℃로 최대 10분의 가열 후에 시트레이트 완충액 중의 DM13의 안정성을 보여주는 히스토그램이다. Y축은 감미 강도이다.

도 4는 95℃로 30초 동안 가열 후에 시트레이트 완충액 중의 DM13의 안정성을 보여주는 히스토그램이다. Y축은 감미 강도이다.

도 5a 및 도 5b는 21℃ 및 32℃에서 8주의 저장 후에 DM13의 안정성을 보여주는 히스토그램이다. Y축은 감미 강도이다.

도 6은 첨가된 당의 69% 감소를 갖는 대조군 케첩 시제품 및 DM09를 갖는 예시적 케첩의 특성을 보여주는 스파이더 그래프이며, 결과는 대조군 케첩이 DM09를 갖는 케첩과 비교하여 덜 달고, 더 시고, 더 짜고, 혀에서의 아린감(tongue tingling)이 더 강함을 보여준다.

도 7은 첨가된 당의 69% 감소를 갖는 케첩 시제품이 충분한 당(full sugar)을 갖는 케첩과 비교하여 덜 달고, 더 시고, 더 옅은 색상을 갖는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 8은 DM09를 갖는 케첩 시제품(첨가된 당의 69% 감소)이 충분한 당 케첩의 관능 프로파일과 매우 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 9는 DM28을 갖는 케첩이 DM09를 갖는 케첩과 비교하여 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 10은 1달의 저장 수명 후에, DM09를 갖는 케첩이 이의 감미를 잃지 않는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다. 제품에 발생하는 변화는 1달의 저장 수명 이후 케첩에 대해 전형적이다(더 짙은 색상, 더 시즈닝

되고(more seasoned), 덜 시고, 더 진하고, 더 부드러운 질감).

도 11은 첨가된 당의 33% 감소를 갖는 플레인 요거트가 DM09 및 첨가된 당의 33% 감소를 갖는 플레인 요거트보다 덜 단 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 12는 DM09를 갖는 플레인 요거트(첨가된 당의 33% 감소)가 충분한 당 요거트와 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 13은 DM28을 갖는 딸기 요거트가 DM09를 갖는 딸기 요거트와 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 14는 2주의 저장 수명 후에, DM09를 갖는 플레인 요거트가 DM09를 갖는 신선한 플레인 요거트와 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 15는 스테비아 및 DM09를 갖는 수용액이 동일한 감미 수준 당량으로 스테비아를 단독으로 갖는 수용액보다 더 단 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 16은 나한과, 스테비아, 및 DM09의 조합을 갖는 수용액이 동일한 감미 수준 당량으로 나한과 및 스테비아를 단독으로 갖는 수용액과 비교하여 더 짧은 "늦은 개시(late onset)"를 가지며 더 단 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 17은 레몬 착향 음료(스테비아를 갖는 50% 당 감소, 5° Bx 당량)가 스테비아 및 DM09(각각 2.5° Bx 당량)와 매우 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 18은 DM031을 갖는 케첩(첨가된 당의 69% 감소)이 DM09를 갖는 케첩의 관능 프로파일과 매우 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 19는 DM31을 갖는 딸기 요거트가 DM09를 갖는 딸기 요거트와 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 20은 DM09를 갖는 추잉검은 30초의 저작 후에 DM09가 없는 추잉검보다 더 단 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 21은 DM09 및 50% 당 감소를 갖는 땅콩 버터가 충분한 당의 땅콩 버터의 관능 프로파일과 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 22는 DM09를 갖는 아이스 커피(70% 당 감소)가 DM09가 없는 아이스 커피(70% 당 감소)보다 더 단것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 23은 크랜베리 쥬스(40% 당 감소, 스테비아, 및 DM09)가 충분한 당의 크랜베리 쥬스와 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 24는 DM28을 갖는 크랜베리 쥬스가 DM09를 갖는 크랜베리 쥬스보다 더 단 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 25는 40%의 당 감소, 스테비아, 및 DM31을 갖는 크랜베리 쥬스가 40%의 당 감소, 스테비아, 및 DM09)를 갖는 크랜베리 쥬스와 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 26은 건조된 크랜베리(50% 당 감소 및 DM09)가 DM09가 없는 건조된 크랜베리(50% 당 감소)보다 더 단 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 27은 DM09를 갖는 복숭아 레더가 DM09를 갖지 않는 복숭아 레더보다 더 단 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 28은 40%의 첨가된 당 감소 + DM09 및 스테비아를 갖는 아이스 녹차가 DM09 및 스테비아 없이 40%의 첨가된 당 감소를 갖는 아이스 녹차와 비교하여 더 단 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 29는 50%의 첨가된 당 감소 + DM31을 갖는 말라비가 DM31 없이 50%의 첨가된 당 감소를 갖는 말라비와 비교하여 더 단 것을 보여주는 스파이더 그래프이다.

도 30a 및 도 30b는 DM31에서 일어났던 변화를 강조하는 결정 구조 이미지이다. 도 30a는 DM31의 결정 구조(흑색)의 MNEI의 결정 구조(PDB ID: 2o9u)(백색)로의 정렬을 보여준다. 도 30a에서의 더 작은 패널들은, DM31에서

선택된 아미노산 변화뿐만 아니라 재설계되었던 루프를 확대 표시한다. 재설계된 루프는 안정성이 증가되도록 할 뿐만 아니라 신규 수소 결합 및 인근에 2개의 세장형 베타-가닥에 이르게 하였다(도 30a, 하단 최우측 패널). 도 30b는 공공 데이터베이스에서 입수 가능한 추가의 MNEI 구조와 DM31의 동일한 루프 영역의 중첩을 보여준다. DM31은 흑색으로 표시된다.

도 31a 및 도 31b는 몇 개의 MNEI 구조(2o9u, liv7, 5zlp), DM09, 및 DM31에 대해 정규화된 B-인자를 보여주는 히스토그램이다. 골격 B-인자는 먼저 Z-스코어 정규화를 사용하여 각각의 구조에 대해 개별적으로 정규화되었다. B-인자는 상이한 2차 구조 요소(도 31a)뿐만 아니라 재설계된 루프 영역의 일부인 특정 잔기(MNEI의 서열에 따라 숫자를 매긴 E48 내지 E54)(도 31b)에 대한 평균으로서 나타난다.

도 32a 내지 도 32c는 MNEI(도 32a), DM09(도 32b), 및 DM31(도 32c)의 결정 구조에서의 안정화 수소 결합을 보여준다. 재설계된 루프 영역은 흑색 프레임으로 강조된다.

도 33a 및 도 33b는 베타-회전의 고전적 정의(도 33b)와 비교하여 DM31에 대한 결정 구조에서의 루프 영역(도 33a)을 보여준다. DM31의 루프 구조(도 33a)는 도 33b에서 보여주는 개략적 정의와 일치한다.

도 34a 및 도 34b는 1 ug의 시험관내 소화된 샘플의 소화 전(TO), 구강 단계의 말단에서(3분, M), 위내 소화 단계의 말단에서(2시간, G), 그리고 장 십이지장 단계의 말단(2시간, D)에서의 16% SDS PAGE 트리신 단백질 겔 및 쿠마시 블루로 염색된 이미지이며, 도 34b는 도 34a와 관련하여 상세하게 설명된 양성 대조군으로서 사용된 α-락트알부민, M, G, 및 D의 이미지를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 인공적 저칼로리 감미료는 시장에서 용이하게 입수 가능하지만, 다수는 유의한 부작용을 갖는다. 예를 들어, 첨가된 칼로리 또는 탄수화물 없이 식품 및 음료를 달게 하는 데 광범위하게 사용되는 사카린은 방광암과 같은 암에 연관되었다. 따라서, 식품 제품과 음료에서 사용하기 위한 최적의 관능 프로파일 및 적합성을 모두 제공할 현재 입수 가능한 인공적 저칼로리 감미료의 대체제에 대한 상당한 요구가 존재한다.

[0058] 본 개시내용은 MNEI 기반 감미 단백질 및 MNEI 맛 개질 단백질에 관한 것이며, 알려진 감미료에 대해 개선된 특성을 나타내는 단백질의 식별을 기반으로 한다. 이러한 단백질은 최적화 방법, 예를 들어 다양한 컴퓨터 방법에 의해 식별되었다.

[0059] 놀랍게도, 본 발명자들은 MNEI(본원에서 "*기준 단백질*"로 표시됨)의 아미노산 서열에 다양한 특정 결실 또는 치환을 도입하는 것이 기준 MNEI 단백질과 비교하여 적어도 하나의 개선된 특성을 갖는 단백질을 수득함을 발견하였다. 단백질의 적어도 하나의 개선된 특성은 개질된 MNEI 단백질의 식품 및 음료 적용에서의 적합성 및 사용에서 유의할 수 있음을 시사하였다.

[0060] 구체적으로는, 하기 실시예에서 나타낸 바와 같이, 단백질(본원에서 "*개질된 단백질*" 또는 "*설계자 단백질*"로 표시됨)은 이들의 기준 단백질과 비교하여 개선된 관능 프로파일 및/또는 안정성을 나타냈다. 본원에 기재된 관능 프로파일은 맛 프로파일에 관한 것이다(예를 들어, 감미 역가, 뒷맛, 및 여운).

[0061] 따라서, 본 개시내용은 이의 가장 광범위한 양태에서 기준 MNEI 단백질의 서열과 비교하여 적어도 2개의 아미노산 결실, 대체(치환), 및/또는 삽입을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 개질된 MNEI 단백질에 관한 것이며, 개질된 단백질은 기준 MNEI 단백질과 비교하여 적어도 하나의 개선된 식품 관련 특성을 갖는다.

[0062] 적어도 하나의 개선된 *식품 관련 특성*은 개질된 단백질의 식품 및 음료 적용에서의 적합성을 증가시키는 특성, 예컨대 향미, 질감, 맛, 감미 역치, 감미 수준, 감미 프로파일, 관능 프로파일, 감미 동력학, 안정성(구조적 그리고 기능적), 내열성, 식품 매트릭스에 대한 적합성, 저장 수명, 다른 향미의 차폐 및/또는 증강, 이미, 맛 개시, 여운 맛, 맛 라운드감(taste roundness), 또는 당-유사 맛을 포함한다.

[0063] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 식품 관련 특성은 관능-영향 특성이다. 본원에 사용된 용어 "*관능-영향 특성*"은 예를 들어 맛에 의해 결정된 관능적 느낌에서의 변화를 지칭한다. 관능-영향 특성은 예를 들어 감미 프로파일, 예컨대 감미 역가(당-유사 향미), 감미 동력학(개시 시간, 여운 시간, 맛 지속 기간), 이미의 부재(예를 들어, 금속성 맛), 및 다른 맛의 차폐 또는 증강을 포함한다. 예를 들어, 개선된 특성은 증가된 감미, 감소된 개시 시간, 또는 감소된 여운 맛에 관한 것이다.

[0064] 적어도 하나의 특성이 *관능-영향 특성*인 일부 실시형태에 따르면, 개질된 단백질은 당 대체제로 간주될 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 식품 관련 특성은 감미 역가, 감소된 개시 시간, 또는 감소된 여운

맛 중 적어도 하나이다.

[0065] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 식품 관련 특성은 안정성이다. 일부 실시형태에서, 안정성은 열 안정성, 더 긴 저장 수명, 낮은 pH에 대한 안정성, 염 농도 안정성, 이온 강도 안정성, 또는 지방 함유 또는 단백질 함유 매트릭스에서의 안정성 중 적어도 하나이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 식품 관련 특성은 열 안정성이다.

[0066] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 식품 관련 특성은 증가된 저장 수명 안정성이다. 예를 들어, 개질된 단백질은 적어도 1주일, 2주일, 1달 동안, 그리고 심지어 1년에 걸쳐 안정할 수 있다.

[0067] 저장 수명 안정성은 시차 주사 열량 측정법, 시차 주사 형광 측정법, 원편광 이색성, 및 관능 분석에 의해 분간된다. 일부 실시형태에서, 식품 맛은 유지되며, 단백질은 원래대로이다.

[0068] 상기 상세히 기재된 바와 같이, 개질된 MNEI 단백질은 적어도 하나의 추가의 식품 성분과 조합하여 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 식품 관련 특성은 개질된 MNEI 단백질과 적어도 하나의 식품 성분 사이에 상승 효과를 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에 따르면, 상기 상승 효과는 맛 증강, 맛 차단, 또는 맛 개질에 영향을 미칠 수 있다. 식품 성분의 비-제한적 예는 인공적 또는 천연 향미료, 식품 첨가제, 식품 착색제, 보존제, 벌크화제, 또는 추가의 당 첨가제를 포함한다. 식품 성분은 맛 차폐 또는 증강 효과를 가질 수 있다.

[0069] 본원에 기재된 기준 단백질은 맛 개질 단백질 및/또는 맛 증강제 단백질 및/또는 맛 단백질 및 구체적으로는 감미 단백질이다. 맛 개질 단백질은 관능 프로파일을 개선하며, 예를 들어, 단맛을 비-감미 물질, 예를 들어 물 및 신 물질에 첨가할 수 있다. 본원에 사용된 맛 단백질은 맛 수용체에 결합하며, 맛 감각을 유발하는 것으로 알려져 있다. 본원에 사용된 감미 단백질은 감미 수용체에 결합하며, 감미 감각을 유발하는 것으로 알려져 있다. 감미 수용체의 비-제한적 예는 유형 1 구성원 1과 같은 2개의 하위 단위로 이루어진 맛 수용체 헤테로이량체(TAS1R1, 인간 유전자에 대한 Uniprot ID: TS1R1 HUMAN), 맛 수용체 유형 1 구성원 2(TAS1R2, T1R2, TR2, UniProt - Q8TE23), 맛 수용체 유형 1 구성원 3(TAS1R3, T1R3, UniProt - Q7RTX0)을 포함한다.

[0070] 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 자연 발생 단백질이다. 일부 다른 실시형태에서, 기준 단백질은 식물, 예컨대 열대 식물에서 발견된다. 식물의 비-제한적 예는 카파리스 마사이카이, 우블리, 세렌디피디 베리, 카템페, 미라클 과일 베리, 또는 램바 중 적어도 하나를 포함한다.

[0071] 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 모넬린이다.

[0072] 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 사슬 A(GenBank 항목 번호 P02881)와 사슬 B(GenBank 항목 번호 P02882)로 이루어진 모넬린이다.

[0073] 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 MNEI이다.

[0074] 야생형 모넬린과 MNEI 사이의 주요 차이는 Gly-Phe 디펩타이드가 2개의 하위 단위를 MNEI로 칭하는 단쇄 모넬린으로 연결하는 데 사용되었던 영역이라는 것이다.

[0075] 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 자연에서 발견되지 않는 서열이며, 따라서 합성 단백질 또는 엔지니어링된 단백질 또는 설계자 단백질로 불린다. 합성 단백질은 자연 발생 단백질의 아미노산 서열 전체 또는 일부(단백질의 폴리펩타이드 사슬 전체 또는 일부), 또는 이의 일부를 포함할 수 있다. 예를 들어, 기준 단백질은 자연 발생 단백질의 결합 개질을 포함하여, 야생형 단백질의 적어도 2개의 폴리펩타이드 사슬이 다른 아미노산에 의해 공유 부착되도록 하는 자연 발생 단백질에 해당하는 단일 폴리펩타이드 사슬을 수득할 수 있다.

[0076] 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 MNEI로 알려진 개질된 모넬린 단백질이다.

[0077] 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 단쇄 모넬린(MNEI) 단백질(서열 번호 45)이다. 본원에서 지칭되는 MNEI 아미노산 번호는 단백질 자료 은행(PDB) ID 2o9u에 따른다.

[0078] 본원에 기재된 개질된 단백질은 다양한 방법에 의해 설계될 수 있다.

[0079] 일부 실시형태에서, 단백질 설계는 컴퓨터 도구를 사용하여 또는 전문가의 단백질 설계 및 구조 생물학 방법, 예를 들어 하기 추가로 설명되는 부위-특이적 돌연변이 유발, 단백질 엔지니어링, 또는 유도 진화에 의해 이루어진다. 본 발명자들은 기준 향미 단백질 및 서열 및/또는 구조 특색에서 기준 향미 단백질과 국소적 또는 전체적 유사성을 갖는 다른 단백질의 서열 데이터, 구조 데이터, 및/또는 진화 데이터를 기반으로 하는 컴퓨터 방법론을 개발하였다. 본원에서 개발 및 적용된 컴퓨터 방법은 본 발명자들이 에너지적으로 유리하며, 따라서 개

선된 특성, 예컨대 열안정성, 할로안정성, pH-안정성, 저장 수명, 접힘, 및 안정성 특색을 갖는 것으로 예상되는 특정 아미노산 치환을 갖는 단백질을 설계할 수 있도록 하였다. 구체적으로, 컴퓨터 단백질 설계(CPD)는 기준 단백질 구조 및/또는 수용체에 기능적으로 결합할 필요가 없는 서열 내의 특정 부위 또는 영역에 적용되었다. 또한, CPD는 본 발명자들이 요구되는 개선된 특색에 적합한 아미노산의 사전 정의된 세트로 치환을 제한하도록 하였다. 아미노산의 사전 정의된 세트는 입력 데이터(즉, CPD에 적용되는 단백질 영역)와 출력 데이터(즉, 수득되는 개질된 단백질 내에 존재하는 아미노산의 위치 및 유형) 둘 모두이다.

[0080] 예를 들어, CPD를 사용하는 것에 의해, "비-이상적" 아미노산(예컨대, 소수성 코어 내의 친수성 아미노산 또는 외부 표면 영역 상의 소수성 아미노산)을 "이상적" 아미노산(예컨대, 외부 표면 영역 내의 친수성 아미노산 및 소수성 코어 내의 소수성 아미노산)으로 대체하는 것이 가능하다

[0081] 이론에 구속되고자 하는 바 없이, 본 발명자들은 외부 표면 영역 상에서 소수성 아미노산을 친수성 아미노산으로 치환하는 것이 구강에 대한 비특이적 결합을 감소시키며, 여운 뒷맛을 감소시킬 것임을 시사한다.

[0082] 본원에서 개발된 방법론은 "안정화 치환", 예를 들어, 단백질 구조의 전체 에너지를 감소시킬 아미노산 치환에 대한 검색을 포함한다. 전체 에너지는 당업계에 알려진 알고리즘을 적용하여 계산될 수 있다. 이러한 알고리즘의 비-제한적 예는 Rosetta, OSPREY(문헌[M. Hallen, J. Martin, et al., Journal of Computational Chemistry 2018; 39(30): 2494-2507]), 또는 EnCoM(문헌[Frappier V, Chartier M, Najmanovich RJ. Nucleic Acids Res. 2015;43(W1): W395-400])을 포함한다. 이들 CPD 방법은 다수의 직교 방법, 예컨대 진화 서열 및 구조적 일치, 표준 및 고온 분자 동력학(MD) 및 다른 동력학 시뮬레이션, 상관 돌연변이 분석(CMA), 표면 정전기 분석, 육안 검사뿐만 아니라 공동, 소수성 패치, 만족스럽지 않은 수소 결합 등의 분석에 의한 집속 및 필터링을 겪는다.

[0083] 아미노산 치환은 다음의 고려 사항을 기반으로 한다: (a) 표면 정전기 전위 및 표면 상의 소수성 패치(의 부재), (b) 단백질의 특정 범위에서의 등전점(pI)의 유지, (c) 단백질 내부 공동의 분석, (d) 상관 돌연변이 분석, 정상 모드 분석, 및 고온 또는 실온 동력학에서의 실효값 변동(RMSF)을 포함하는 동력학 안정성, (e) 치환 에너지학의 엔트로피 및/또는 엔탈피 성분, (f) 특정 치환의 가시화, (g) 엄선된 다중 서열 정렬(MSA)의 진화 보존 분석에 의해 반영된; 관련 단백질 패밀리에 허용되는 아미노산 유형, 및 (h) 낮은 유사 에너지 CPD 계산에 반영된 치환의 빈도.

[0084] 컴퓨터 방법론은 다음 단계 중 하나 이상을 포함한다:

[0085] (1) 다중 서열 정렬(MSA) 또는 다중 구조 정렬. 이 단계에서, 표적 기준 단백질 또는 이의 단편과 유사성을 갖는 DNA 서열 및/또는 단백질 서열은 공공 자료 은행에 문의한다. 얻은 결과를 기반으로, 다중 서열 정렬(MSA) 또는 다중 구조 정렬을 구축하고, 보존율을 계산한다. MSA 결과에 따라, 실시되어야 하는 CPD의 수준 관련 결정을 한다. 비-보존되는 위치에서, 모든 아미노산(시스테인을 갖거나, 갖지 않음)은 CPD에서 허용되는 반면, 보다 보존되는 위치의 경우, CPD는 유사한 특성(전하, 크기, 내부 동력학 등)을 갖는 잔기로 제한된다. 이 단계는 생물물리학 지식 및 보존 데이터를 기반으로 각각의 위치에서 치환을 제한하는 단계를 포함한다. MSA는 위치 특이적 치환 매트릭스(PSSM)를 수득할 수 있으며, 여기서, 서열을 따라 각각의 위치는 가능하게는 아미노산의 치환 또는 결실 또는 삽입의 잠재적 확률을 고려하여 각각의 아미노산의 상대적 풍부도와 상관된 방식으로 설명된다.

[0086] (2) 단백질 기능 분석 및 구조-기능-동력학 관계의 분석. 이 단계에서, 알려진 영향(예컨대, 활성도, 구조, 결합 등)을 갖는 치환의 데이터베이스를 종래 지식을 사용하여 구축한다. 단백질 안정성 및/또는 기능을 방해하는 것으로 종래의 지식을 기반으로 알려진 치환 및 치환-인접 위치(예를 들어, 0.5 내지 1 nm의 거리)를 CPD 동안 제한하며, 치환되지 않는다.

[0087] (3) CPD. 이 단계는 지정된 소프트웨어, 예컨대 ROSETTA, OSPREY, SCWRL, PyMol, AlphaFold 등에 의해 부분적으로 수행한다. 결정론적 CPD를 실시하기 전에, 기준 단백질 3D 구조/모델을 에너지 최소화한다. CPD는 부위 특이적 아미노산 대체(여기서, 하나의 아미노산은 또 다른 것으로 대체됨), 또는 상이한 길이를 갖는 단백질을 수득하는 다른 아미노산 서열에 의한 단백질 영역의 대체를 포함할 수 있다. 후자는 루프와 같은 영역을 순이론적 방법에 의해 재건하는 것에 의해 또는 영역을 다른 단백질로부터 취하는 것, '그래프팅'으로 지칭될 수 있는 방법에 의해 수행할 수 있다. 각각의 기준 단백질의 경우, 다수의 모델이 고려된다.

[0088] (4) 선택: 최저 에너지를 갖는 단백질 모델을 수집한다. MSA를 이들 모델에서 조립하고, 보존된 서열을 결정한다. 생화학적 및 생물물리학적 사전 지식을 기반으로, 치환의 하위 세트를 선택한다. 이들 하위 세트는 높은

빈도로 CPD 동안 나타나는 하나 이상의 위치에서의 대체를 나타낸다. 이어서, 각각의 하위 세트를 단백질의 3D 구조에 대해 모델링하며, 에너지는 최소화한다. 최저 에너지 하위 세트를 이후 추가의 컴퓨터 및 실험 검증 동안 선택한다.

[0089] CPD에 사용된 고려 사항 중 하나는 수용체 결합 부위 및 결합 영역과 이의 근접에서 아미노산이 치환되는지 여부이다. 맛 수용기 결합에 중요한 아미노산 잔기를 결정하는 것은 일반적으로 다양한 아미노산의 단일 지점 치환에 의해 수행될 수 있다. 실시예에서 본원에 상세히 기재되는 바와 같이, 본 발명자들은 맛 수용기의 추정상 결합 부위를 특성화하기 위해 컴퓨터 분석을 사용하였다. 본 발명자들은 기준 및 개질된 단백질에 결합하는 맛 수용기에서의 몇몇의 신규 결합 부위를 식별하였다.

[0090] CPD에서의 또 다른 고려 사항은 수용기에 대한 결합에 필요한 기능적 가소성을 유지하면서, 본질적으로 대개 단백질 강성화(rigidification)와 연관되는 열 안정성을 증가시키는 것이다. 단백질은 수용체를 활성화시키기 위해 일부 배좌적(conformational) 변화('기능적 가소화'로도 알려짐)를 겪어야 한다. 따라서, 본 발명자들은 기능적 가소성이 유지되어야 하는 영역을 보존하면서, 강성화될 수 있는 영역에 주목하였다.

[0091] 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질(아미노산 서열)을 기반으로 하며, 따라서, 개질된 MNEI 단백질에 대해 본원에 기재된 임의의 특색/특성/특징은 대응하는 기준 MNEI 단백질에 대해 제공됨을 유의하여야 한다.

[0092] 본원에 기재된 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질(기준 아미노산 서열)에 대해 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 적어도 18개의 아미노산 치환, 결실, 또는 삽입을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0093] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질(기준 아미노산 서열)에 대해 2개 내지 20개의 아미노산 치환, 결실, 또는 삽입, 2개 내지 10개의 아미노산 치환, 3개 내지 10개의 아미노산 치환, 3개 내지 6개의 아미노산 치환을 포함한다. 본원에 사용된 범위는 예를 들어 3개 내지 6개가 3, 4, 5, 및 6을 포함하도록 하는 범위 한계를 포함한다.

[0094] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 서열 번호 45로 제시된 서열을 갖는 기준 MNEI 단백질에 대해 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 적어도 18개의 아미노산 치환, 결실, 또는 삽입을 포함한다.

[0095] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질의 아미노산 서열과 40% 내지 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 아미노산 서열과 90% 내지 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0096] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 아미노산 서열과 60% 내지 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 아미노산 서열과 70% 내지 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0097] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 서열 번호 45로 제시된 아미노산 서열과 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0098] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 서열 번호 45로 제시된 아미노산 서열과 90% 내지 98% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0099] 둘 이상의 아미노산 서열들 사이의 % 동일성은 둘 이상의 서열이 비교되고, 최대 대응을 위해 정렬될 때, 결정된다. 본 개시내용의 맥락에서, % 동일성을 갖는 본원에 기재된 서열(아미노산)은 동일성이 계산되는 기준 서열과 동일한 기능/활성도를 갖는 것으로 간주된다.

[0100] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질의 아미노산 서열과 40% 내지 98% 유사한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 아미노산 서열에 대한 90% 내지 98% 유사성의 아미노산 서열을 포함한다.

[0101] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 아미노산 서열에 대한 60% 내지 90% 유사성의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 아미노산 서열과 70% 내지 90% 유사한 아미노산 서열을 포함한다.

[0102] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 서열 번호 45로 제시된 아미노산 서열과 적어도 60%, 적어도 65%, 적

어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0103] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 서열 번호 45로 제시된 아미노산 서열과 90% 내지 98% 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0104] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 서열 번호 1 내지 21 중 하나로 제시된 아미노산 서열, 이의 변형 또는 전술한 것의 단편을 포함한다. 특히, 개질된 MNEI 단백질은 서열 번호 1, 4, 16, 19, 또는 24 중 하나로 제시된 아미노산 서열, 이의 변형, 또는 전술한 것의 단편을 포함할 수 있다. 개질된 MNEI 단백질은 또한 서열 번호 1 내지 21 중 하나, 특히, 서열 번호 1, 4, 16, 19, 또는 24 중 하나와 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 서열을 포함할 수 있다.

[0105] 본원에 사용된 서열 유사성 또는 서열 상동성은 유사한 생리화학적 특성으로 보존된 아미노산, 예를 들어 류신 및 이소류신의 양(%)을 지칭한다.

[0106] 서열 동일성을 결정하는 데 있어서, 간격은 계산에 포함되지 않으며, 서열 동일성은 둘 중의 더 짧은 서열에 대한 것이다. 이러한 맥락에서, 기준 MNEI 단백질(아미노산 서열)의 길이는 개질된 MNEI 단백질(아미노산 서열)과 동일할 수 있거나, 개질된 MNEI 단백질(아미노산 서열)과 상이할 수 있음을 유의하여야 한다.

[0107] 용어 "아미노산 서열" 및/또는 "폴리펩타이드 사슬"은 아미노산 서열 또는 폴리펩타이드 사슬을 갖는 단백질을 설명하는 데 사용된다. 따라서, 용어 "기준 단백질"은 용어 "기준 아미노산 서열"과 동등하며, 용어 "개질된 단백질"은 용어 "개질된 아미노산 서열"과 동등하다. 용어 "아미노산 서열" 및/또는 "폴리펩타이드 사슬"은 3D 구조를 갖는 서열뿐만 아니라 3D 구조를 갖지 않는 서열을 포함함을 유의하여야 한다.

[0108] 본 개시내용과 관련하여 본원에 사용된 용어 "단편"은 단축된, 즉, 적어도 하나의 아미노산이 결여된 전장 단백질로부터 유도된 단백질 또는 펩타이드에 관한 것이다. 이러한 단편은 단백질의 1차 서열 중 적어도 10개, 보다 예컨대 20개 또는 30개 또는 그 초과의 연속적 아미노산을 포함할 수 있다.

[0109] 본 개시내용에 사용된 용어 "변형"은 예를 들어 치환, 결여, 삽입, 또는 화학적 개질에 의한 아미노산 서열의 개질을 포함하는 단백질 또는 펩타이드의 유도체에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 이러한 개질은 단백질 또는 펩타이드의 기능성을 감소시키지는 않는다. 이러한 변형은 하나의 아미노산이 이들의 각각의 D-입체 이성질체에 의해 또는 자연 발생 20개의 아미노산 외의 아미노산, 예컨대 오르니틴, 하이드록시프롤린, 시트룰린, 호모세린, 하이드록시라이신, 및 노르발린에 의해 대체되었던 단백질을 포함한다. 그러나, 이러한 치환은 또한 보존적일 수 있으며, 즉, 아미노산 잔기는 화학적으로 유사한 아미노산 잔기로 대체된다.

[0110] 컴퓨터 최적화 과정의 일부로서, 개질된 단백질은 에너지적 고려 사항, 즉, 낮은 에너지를 갖는 이들 서열을 기반으로 컴퓨터-, 생물정보-, 또는 구조-생물학 분석 이후 아미노산 서열의 대량 출력 집단으로부터 선택될 수 있다.

[0111] 에너지적 계산은 전체 아미노산 서열에 적용될 수 있거나, 대안적으로는 단백질 내의 특정 영역 또는 선택된 아미노산으로 한정될 수 있다. 후자(상이한 영역 또는 선택된 아미노산)에서, 정보는 전체 단백질을 측정하기 위해 통합될 수 있다.

[0112] 아미노산 서열(예를 들어, 개질된 단백질)의 각각의 하나의 계산은 물리적-기반(또한 생물물리적 방법으로도 알려짐) 및 통계 기반 잠재성(지식 기반 잠재성 또는 정보학 방법으로도 알려짐)을 조합하는 것에 의해, 예컨대 로제타 에너지 단위(REU)를 사용하는 것에 의해 수행될 수 있다. 로제타 에너지 단위(REU)는 Rosetta 소프트웨어 알고리즘, 컴퓨터 모델링 및 단백질 구조 분석을 위한 알고리즘 패키지이다. Rosetta 소프트웨어는 드노보(*de novo*) 단백질 설계, 효소 설계, 리간드 도킹(ligand docking), 및 생물학적 거대 분자 및 거대분자 복합체의 구조 예측을 포함하여 컴퓨터 생물학에서의 주목할 만한 과학적 진전이 가능하도록 한다. 로제타 에너지 함수는 임의의 실제 물리적 에너지 단위와 일치하지 않는 물리 및 통계 기반 잠재성의 조합이다. 로제타 에너지는 임의의 척도 기준이며, 때때로 REU("로제타 에너지 단위"의 경우)로 지칭된다.

[0113] 일부 실시형태에서, REU는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 전체 단백질 서열에 대해 계산될 수 있다. 일부 다른 실시형태에서, REU는 전체 단백질 서열의 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 적어도 하나의 영역에 대해 계산될 수 있다. 일부 다른 실시형태에서, REU는 전체 단백질 서열에서의 적어도 하나의 아미노산 치환에 대해 계산될 수 있다.

[0114] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -182 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된

단백질은 REU로 제공된 약 -190의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 약 -195의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -195 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -196 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -197 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -198 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 약 -198의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -198.4 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -200 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -203 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -206.4 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -210 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -214.6 미만의 에너지를 갖는다.

[0115] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -270.11 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -300 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -350 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -400 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -410 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -418 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -420 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -430 미만의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -433 미만의 에너지를 갖는다.

[0116] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -182 내지 REU로 제공된 약 -214.6의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -195 내지 REU로 제공된 약 -214.6의 에너지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 REU로 제공된 -197 내지 REU로 제공된 약 -214.6의 에너지를 갖는다.

[0117] 본원에 기재된 개질된 단백질은 단백질의 다양한 영역에서 아미노산 치환 또는 결실로부터 기인할 수 있다. 본원에 사용된 "*단백질 영역*"은 단백질 서열(아미노산 서열) 또는 구조의 일부인 아미노산 서열 또는 구조 모티프를 지칭한다. 단백질 영역의 비-제한적 예는 단백질 표면, 단백질 코어, 단백질 루프, 2차 구조 요소, 2차 구조 캡핑, 디설파이드, 결합 부위, 링커, 소수성 패치, 또는 단백질 소수성 영역을 포함한다.

[0118] 기준 단백질에서의 아미노산 치환은 특정 단백질 영역 또는 서열로 제한되지 않는다. 아미노산 치환을 포함할 수 있는 기준 단백질의 영역은 기준 단백질 표면, 소수성 코어, 또는 루프 영역이라 불리는 영역(2차 구조가 결여된 영역으로도 표시됨), 2차 구조의 가장자리(2차 구조 캡핑 영역으로도 표시됨), 디설파이드 영역, 결합 부위 영역, 링커 영역, 및 소수성 패치 영역을 포함한다.

[0119] 본원에 사용된 "기준 표면 영역", "기준 코어 영역", 또는 "기준 디설파이드 결합 또는 루프 영역"은 기준 MNEI 단백질일 수 있는 기준 단백질의 상응하는 영역을 지칭할 수 있다.

[0120] 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 기준 단백질 구조 및/또는 서열 내의 제한된 영역 내에서 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 표면 영역에서 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 코어 영역에서 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 디설파이드 결합에 의해 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 루프 영역에서 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산 대체는 기준 단백질의 표면 상에 위치한다.

[0121] 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 수용체에 대한 기준 단백질의 예측되거나, 알려진 결합 부위 인근 영역이 아닌 제한된 영역 내에서 치환될 수 있다. 이러한 맥락에서, '인근'은 결합 계면으로부터 4 내지 7A를 의미할 수 있다.

[0122] 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 기준 단백질 구조 및/또는 서열 내의 상이한 영역에서 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 기준 단백질은 표면 영역, 코어 영역, 디설파이드 결합 또는 루프 영역, 또는 이의 임의의 조합에서 적어도 치환될 수 있다.

[0123] 본원에 사용된 단백질 표면 영역은 부분적 또는 전체 용매 접근성(SASA - 용매 접근 가능한 표면 영역)을 갖는 영역이다. 본원에 사용된 단백질 코어 영역은 50% 미만, 또는 내부 코어의 경우 20% 미만의 아미노산 상대적 SASA(용매 접근 가능한 표면 영역)로 용매에 접근 가능하지 않은 영역이다.

[0124] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 표면 영역에 대해 표면 영역에서 10% 내지 98%, 20% 내지 98%, 30% 내지 98%, 40% 내지 98%, 50% 내지 90%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 98%의 동일성을 갖는 아미

노산 서열을 포함한다.

[0125] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 소수성 코어(소수성 패치) 영역에 대해 소수성 코어(소수성 패치)에서 10% 내지 98%, 20% 내지 98%, 30% 내지 98%, 40% 내지 98%, 50% 내지 90%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 98%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0126] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 소수성 코어(소수성 패치) 영역에 대해 소수성 코어(소수성 패치)에서 10% 내지 98%, 20% 내지 98%, 30% 내지 98%, 40% 내지 98%, 50% 내지 90%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 98%의 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0127] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 표면 영역에 대해 표면 영역에서 세 개(3) 내지 사십 개(40)의 아미노산 치환, 4개 내지 30개, 5개 내지 30개의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0128] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 표면 영역에 대해 표면 영역에서 적어도 한 개(1), 두 개(2), 세 개(3), 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 18개, 적어도 20개, 적어도 25개, 또는 적어도 30개의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0129] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 코어 영역에 대해 코어 영역에서 20%, 30%, 50%, 80%, 90%, 95%, 또는 98%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0130] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 아미노산 서열 코어 영역에 대해 코어 영역에서 20%, 30%, 50%, 80%, 90%, 95%, 또는 98% 유사한 아미노산 서열을 포함한다.

[0131] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 코어 영역에 대해 코어 영역에서 1개 내지 5개의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0132] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준물에서 수용체에 결합하는 기준 영역에 대해 수용체에 결합하는 영역(*수용체 결합 부위*)에서 90%, 95%, 또는 98%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0133] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 수용체 결합 부위에 대해 수용체 결합 영역에서 90%, 95%, 또는 98%의 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0134] 일부 실시형태에서, 기준 단백질의 수용체 결합 부위는 개질된 단백질에서 치환되지 않는다.

[0135] 일부 실시형태에서, 디설파이드 결합 중 적어도 하나는 제거되며, 이들 주위의 영역은 각각의 제거된 디설파이드 결합 주위에서 8개 내지 20개의 치환으로 재설계된다.

[0136] 아미노산은 이들의 일반적으로 알려진 3문자의 기호에 의해 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회에 의해 권장되는 1문자의 기호에 의해 본원에서 지칭될 수 있다. 본원에 사용된 *아미노산 치환*(대체)은 하나의 아미노산에서 상이한 아미노산으로의 변화를 지칭한다. 이는 전형적으로는 코돈 서열을 변경하여 기준물과 상이한 아미노산을 코딩하는 비동의어적 미스센스 돌연변이에 의해 유발되는 DNA 서열에서의 점 돌연변이로 인한 것이다. 아미노산 대체는 일반적으로 대체된 아미노산이 유사하거나, 유사하지 않은 정도 및 서열 또는 구조에서의 이들의 위치에 따라 단백질 기능 또는 구조에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 아미노산 치환은 크기, 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성, 벌크성(또는 가요성), 베타-분지, 특정 2차 구조 또는 특정 용매 접근성 영역에서 존재할 경향성, 방향족성, 특정 결합 상호작용(수소 결합, 염 가교, 극성, 및 비극성 상호작용)을 부여할 능력, pK, 당에 결합할 능력 및 다른 번역 후 개질, 및/또는 포함된 잔기의 양극성 성질에서의 유사성을 기반으로 이루어질 수 있다.

[0137] 일부 실시형태에서, 아미노산 치환은 보존적 대체일 수 있다. 이러한 대체는 하나의 아미노산의 유사한 성질을 나타내는 또 다른 아미노산으로의 변화를 포함한다. 보존적 아미노산 대체(보존적 아미노산 "치환" 또는 보존적 아미노산 돌연변이로도 표시됨)는 소정의 아미노산을 유사한 생화학적, 구조적, 그리고/또는 화학적 특성을 갖는 상이한 아미노산으로 변경하는 단백질에서의 아미노산 대체이다.

[0138] 예를 들어, 아미노산은 이들의 구조 및 이들의 측쇄(R 기)의 일반적인 화학적 특징을 기반으로 6개의 주요 클래스로 분류될 수 있다.

[0139] 지방족: 이소류신(I), 류신(L), 글리신(G), 알라닌(A), 발린(V);

[0140] 하이드록실 또는 황/셀레늄 함유: 세린(S), 시스테인(C), 트레오닌(T), 메티오닐(M);

[0141] 사이클릭: 프롤린(P)

[0142] 방향족: 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W)

[0143] 염기성: 히스티딘(H), 라이신(K), 아르기닌(R)

[0144] 산성 및 이들의 아미드: 아스파르테이트(D), 글루타메이트(E), 아스파라긴(N), 글루타민(Q).

[0145] 또한, 다음 그룹은 각각 서로에 대해 보존적 치환인 다른 예시적 아미노산을 함유한다:

[0146] 1) 매우 작음: 알라닌(A), 글리신(G);

[0147] 2) 음하전: 아스파르트산(D), 글루탐산(E);

[0148] 3) 극성(아미드화 카복실 측쇄): 아스파라긴(N), 글루카민(Q);

[0149] 4) 양으로 하전됨: 아르기닌(R), 라이신(K);

[0150] 6) 방향족: 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W), 및 때때로 또한 히스티딘(H);

[0151] 7) 매우 극성: 세린(S), 트레오닌(T);

[0152] 8) 황 함유: 시스테인(C), 메티오닌(M);

[0153] 9) 작음: 알라닌(A), 글리신(G), 세린(S).

[0154] 10) 베타-분지형: 발린(V), 이소류신(I), 및 때때로 또한 트레오닌(T);

[0155] 11) 극성: 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 세린(S), 트레오닌(T);

[0156] 그렇지만, 다수의 아미노산 지수를 수득하는 수많은 아미노산 클러스터가 존재하며, 각각은 아미노산 특징의 상이한 양태를 강조한다 - 예를 들어, aa 지수 데이터베이스 https://wwwWgenome.jp/aaindex/에서의 이러한 수백 개의 지수를 참조한다. 결과적으로, 보존적 대체 중 일부는 식품 및 음료 산업에서의 산업적 용도를 위한 단백질 적합성에 대한 다른 중요한 특색, 예를 들어 혀에 대한 비특이적 결합 또는 다른 관능 프로파일 양태를 나타낼 수 있다.

[0157] 추가의 보존 분석은 다음을 기반으로 한다.

[0158] - 비극성 "소수성" 아미노산은 발린(V), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 트립토판(W), 시스테인(C), 알라닌(A), 티로신(Y), 히스티딘(H), 트레오닌(T), 세린(S), 프롤린(P), 글리신(G), 아르기닌(R), 및 라이신(K)으로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0159] - "극성" 아미노산은 아르기닌(R), 라이신(K), 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아스파라긴(N), 글루타민(Q)으로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0160] - "양으로 하전된" 아미노산은 아르기닌(R), 라이신(K), 및 히스티딘(H)으로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0161] - "산성" 아미노산은 아스파르트산(D), 아스파라긴(N), 글루탐산(E), 및 글루타민(Q)으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0162] 일부 실시형태에서, 대체는 라디칼 대체이다. 라디칼 대체(치환)는 아미노산의 상이한 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로의 교환이다.

[0163] 기준 단백질과 개질된 단백질 사이의 서열 유사성 및/또는 서열 동일성의 정도는 일반적으로 개질된 단백질의 특성에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 다수의 치환은 결합 동력학, 접힘 동력학, 용해도, 열안정성, 할로안정성, pH 안정성, 저장 수명, 비수성 입자(예를 들어, 식품 매트릭스에서의 단백질 또는 지방, 또는 구강에서의 소수성 영역)에 대한 결합, 3D 구조뿐만 아니라 이의 활성도 및 관련 특성에 영향을 미칠 수 있다. 본원에서 개발 및 적용된 컴퓨터 방법은 개선된 개질된 단백질을 수득할 치환에 대한 추정 아미노산 잔기의 완전한 이해를 제공한다.

[0164] 일부 양태에 따르면, 기준 단백질은 서열 번호 45로 제시된 아미노산 서열을 갖는 MNEI이다. 하기 실시예 1에 나타내는 바와 같이, CPD 분석은 치환 또는 결실에 대한 표적으로서의 몇몇의 아미노산을 밝혔다.

[0165] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 보존적 치환이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 아미

노산 치환은 라디칼 치환이다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 아미노산이 치환된다.

[0166] MNEI에서의 아미노산 치환은 다수의 돌연변이를 포함하여 이전에 보고되었다. 예를 들어, Zheng 등은 개선된 감미 및 안정성을 갖는 신규한 이중 돌연변이 MNEI-기반 단백질을 보고하였다. 구체적으로는, Zheng 등은 MNEI에서의 단일 치환 E2N이 3배 개선된 감미 및 약간 감소된 안정성을 수득하였음을 입증하였다. Zheng 등은 E2N 치환 외에 추가의 치환, E23A 또는 Y65R(예를 들어, E2N/E23A, E2N/Y65R)을 도입하는 것이 감미에 영향을 미치지 않았음을 추가로 보여주었다.

[0167] 일부 실시형태에서, MNEI인 기준 단백질에서의 적어도 3개의 아미노산 치환 중 적어도 2개 또는 적어도 3개는 보존적 치환이다.

[0168] 본원에 기재된 바와 같이, 본원에 기재된 개질된 MNEI 단백질은 개선된 식품 관련 특성을 갖는다. 단백질의 감미 프로파일, 예컨대 *개질된 단백질*의 감미 역가(당-유사 향미), 이미의 부재, 감소된 개시 시간, 및 감소된 여운 맛은 당업계에 알려진 임의의 알려진 맛 시험에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 수크로스 또는 다른 감미료의 감미에 대한 비교는 맛 패널에 의해 수행될 수 있으며, 감미 역가는 하기 실시예에서 상세히 기재되는 바와 같이 등급화될 수 있다.

[0169] 비교는 알려진 감미료, 예컨대 수크로스와 비교하여 개질된 단백질의 역치를 결정하는 것에 의해, 예를 들어 감미 감각을 유발하는 데 필요한 최소 농도, 또는 감미 프로파일, 감미 개시 시간, 여운 맛, 구강촉감, 뒷맛, 이미, 및 원하지 않은 맛의 차폐와 같은 특징을 포함하는 감미 프로파일 평가를 결정하는 것에 의해 수행될 수 있다.

[0170] 본원에 사용된 용어 감미-영향 특성은 약 0.28 mg/L, 약 0.5 mg/L, 또는 그 초과의 감미 역치, 약 1 내지 20초, 때때로 2 내지 18초, 때때로 2 내지 4초의 감미 지속 기간 중 적어도 하나에 의해 결정된 감미 감각을 포함한다.

[0171] 기준 MNEI 단백질과 같이, 개질된 MNEI 단백질은 감미 수용체에 결합한다.

[0172] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 중량당 기준으로 당보다 300 내지 16,000 초과인 인지된 감미 역치를 갖는다.

[0173] 관능 프로파일은 경시적인 맛 강도를 나타내는 맛 동력학, 즉, 개시 기간(맛을 느낄 때까지의 시간), 맛 지속 기간, 및 여운 맛의 시간(가우스 테일(gaussian tail)에 해당함)을 포함한다. 추가의 특색은 이미(예를 들어, 다른 수용체에 대한 결합으로 인함), 맛 라운드감, 금속성 및 다른 부가적 맛, 다른 성분과의 상승 효과(예를 들어, 스테비아와 같은 다른 향미 또는 원하지 않는 맛을 차폐 및 증강시킴), 구강촉감, 떫은맛 등을 포함한다.

[0174] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 단백질에 대해 동일하거나 개선된 다음 중 적어도 하나를 특징으로 한다: (1) 구조적 열 안정성, (2) 기능적 열 안정성, (3) pH 안정성, (4) 물 또는 부분적으로 수성 환경(예를 들어, 지방 함유 식품) 중의 용해도, 또는 (5) 저장 수명 안정성.

[0175] 본원에 기재된 개질된 단백질은 경구 전달을 위한 제품의 제조에서의 감미료로서의 사용될 수 있는 단맛뿐만 아니라 다른 맛 효과(원하지 않는 맛 차폐, 더 적은 뒷맛, 더 적은 여운 맛, 더 적은 이미, 감칠맛, 더 양호한 구강촉감)를 특징으로 한다.

[0176] 개질된 단백질은 향미 개질제 또는 향미 증강제로서 사용될 수 있다.

[0177] 본원에 기재된 개질된 단백질은 구강 제품으로서 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 제품은 식품 또는 음료 제품, 식이 보충 제품, 또는 약제이다. 제품 제조를 위해, 본원에 기재된 단백질은 임의의 식품 등급 첨가제와 조합될 수 있다. 식품 또는 음료 제품은 비제한적으로 미세 분말, 동결 건조물, 과립물, 정제 등을 포함하는 임의의 고체의 건조 형태로 제공 및 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 액체 형태, 예를 들어 수 중의 용질로서 제공된다(수용액).

[0178] 개질된 단백질을 포함하는 제품은 다양한 적용을 가질 수 있다. 이는 비제한적으로(다음은 각각 본 개시내용의 별도의 실시형태를 구성함) 식품 및 음료 산업에서 향미 특징을 갖는 감미료, 향미료, 증강제, 차폐제, 및 단백질로서(과일 및 야채 쥬스 및 넥타, 청량 음료, 즉석 음료, 시럽, 기능성 음료, 스포츠 음료 등), 낙농업, 즉, 유제품, 요거트, 및 푸딩; 의약 산업; 자연요법 산업, 영양보조 산업(nutraceutical industry)(예를 들어, 영양보조 바), 및 다른 헬스케어 제품(예를 들어, 치약 및 구강 청결제), 과자류, 캔디, 및 검 산업, 야채(예를 들어, 케첩 또는 소스), 또는 부형제 또는 첨가제로서 향미 개질 조성물의 사용이 필요한 임의의 다른 적용에서의

활용을 포함한다.

[0179] 일부 실시형태에 따르면, 추가의 식품 성분은 수크로스, 프룩토스, 글루코스, 아가베 시럽, 현미 시럽, 대추야자 설탕, 꿀, 메이플 시럽, 당밀, 나한과, 당알코올, 희소당, 스테비올 배당체, 아스파탐, 수크랄로스, 아세설팜 칼륨, 및 식이 섬유로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0180] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 단백질에 대해 동일하거나, 개선된 구조적 열 안정성을 갖는다.

[0181] 본원에 사용된 용어 "구조적 열 안정성" 또는 "열 안정성"은 기준 단백질의 것의 초과의 온도에서 이의 3D 구조를 유지하는 개질된 단백질의 능력을 지칭한다. 단백질의 3D 구조적 안정성은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예컨대 원편광 이색성(CD) 또는 열 시프트 검정, 예컨대 시차 주사 형광 측정법(DSF) 또는 시차 주사 열량 측정법(DSC) 또는 단백질 변성제, 예컨대 구아니디늄 클로라이드를 이용한 적정에 의해 측정될 수 있다. 3D 단백질 구조는 단백질 기능에 영향을 미칠 수 있다. 특히, 식품 및 음료 제품에 필요한 저장 수명 및 열 안정성은 구조적 열 안정성과 관련될 수 있고, 여러 가지 측정 가능한 것들(measurables)로 구성되며, 예를 들어, 저온 살균(또는 소비자 포장재의 최종 제품(consumer-packaged good final product)의 제조 동안 열 처리)이 상이한 프로토콜에 의해 적용될 수 있고, 매우 단시간에 걸쳐 단백질 구조를 유지하는 내열성과 관련된다.

[0182] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 단백질에 대해 동일하거나, 더 높은 기능적 열 안정성을 갖는다. 본원에 사용된 용어 "기능적 열 안정성"은 기준 단백질과 비교하여 고온에 대한 노출 후의 이의 기능을 유지하는 개질된 단백질의 능력을 지칭한다.

[0183] 일부 실시형태에서, 본원의 개질된 단백질은 보다 고온에서, 또는 제한된 기간 동안 보다 고온에 대한 노출 후에 그 감미 효과를 유지할 수 있다. 바꾸어 말하면, 때때로 최대 50℃, 때때로 최대 100℃, 또는 심지어 최대 150℃의 실온 초과의 온도에 대한 제품 노출 후에 감미 또는 관능 프로파일에서의 명백한 변화가 없다. 단백질 기능, 예를 들어 감미는 단백질이 시험될 수 있는 온도로 냉각된 후에 관능 시험에 의해 측정될 수 있다.

[0184] 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 기준 단백질과 동일하거나, 더 높은 pH 안정성을 갖는다. *pH 안정성*은 기준 단백질에 대해 더 광범위한 pH 범위에서의 개질된 단백질의 장기적 안정성을 지칭하며, 즉, 개질된 단백질은 3 내지 8의 임의의 pH, 때때로 4 내지 8의 pH에 대한 제품의 노출 후에 3D 구조 및/또는 기능을 유지한다. 예를 들어, 콜라같은 소다수는 2.3 내지 2.5의 pH를 가지며, 감미 단백질 중 일부는 불안정하고, 즉시 또는 음료의 일반적 저장 수명보다 더 짧은 시간 후에 기능성을 잃는다.

[0185] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질보다 더 높은 용해도를 갖는다. 용해도는 수성, 부분적으로 수성, 또는 비-수성 환경, 예컨대 지방 함유 식품 중에서 존재할 수 있다.

[0186] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질에 대해 개선된 저장 수명을 갖는다. 개선된 저장 수명은 최대 150℃의 임의의 온도, 때때로 4℃ 내지 150℃, 또는 100℃의 임의의 온도에 대한 제품의 노출 후에 조성물을 포함하는 제품의 감미의 감지된 변화(기능) 또는 물리적 저하(예를 들어, 색상 변화, 상분리 등)가 없는 것을 지칭한다.

[0187] 일부 다른 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질에 대해 동일하거나, 개선된 다음 중 적어도 하나를 특징으로 한다: (1) 접힘 동력학, (2) 단백질의 번역 후 개질(예를 들어, 글리코실화 또는 아세틸화) 패턴이 기준 단백질과 상이함, (3) 디설파이드 결합의 수가 디설파이드 결합을 갖지 않는 기준 MNEI 단백질에 대해 더 높음.

[0188] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 기준 MNEI 단백질과 동일하거나 더 높은 접힘 동력학을 갖는다. 즉, 풀리거나(unfolded), 부분적으로 접힌 구조로부터의 단백질 접힘 속도는 더 빠르다(인실리코(*in silico*), 예를 들어 분자 동력학에 의해, 또는 실험적 시험관내 또는 생체내 방법에 의해, 평가된 바와 같음). 대안적으로, 더 빠른 접힘 동력학은 예를 들어 변성제 적정(예를 들어, 구아니디늄 클로라이드 및/또는 고농도 우레아) 또는 다른 방법에 의한 변성 실험에서의 더 느린 풀림 동력학을 지칭한다.

[0189] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 평가된 숙주 유기체에서의 기준 MNEI 단백질과 동일하거나, 더 높은 발현 수율을 특징으로 한다.

[0190] 일부 실시형태에서, 개질된 MNEI 단백질은 8.6 내지 9.5의 pI 값을 갖는다.

[0191] 본원에 기재된 개질된 단백질은 경구 전달을 위한 제품의 제조에서의 감미료로서의 사용될 수 있는 단맛뿐만 아니라 다른 맛 효과(원하지 않는 맛 차폐, 더 적은 뒷맛, 더 적은 여운 맛, 더 적은 이미, 더 적은 여운 맛

개시, 및 감칠맛)를 특징으로 한다.

[0192] 개질된 MNEI 단백질은 향미 개질제 또는 향미 증강제로서 사용될 수 있다.

[0193] 본원에 기재된 개질된 MNEI 단백질은 구강 제품으로서 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 제품은 식품 제품, 식품 보조 제품, 또는 약제이다. 제품 제조를 위해, 본원에 기재된 단백질은 임의의 식품 등급 첨가제와 조합될 수 있다. 식품 제품은 비제한적으로 미세 분말, 동결 건조물, 과립물, 정제 등을 포함하는 임의의 고체의 건조 형태로 제공 및 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 액체 형태, 예를 들어 수 중의 용질로서 제공된다(수용액).

[0194] 개질된 MNEI 단백질을 포함하는 제품은 다양한 적용을 가질 수 있다. 이는 비제한적으로(다음은 각각 본 개시내용의 별도의 실시형태를 구성함) 식품 및 음료 산업에서 감미료, 향미료, 증강제, 또는 차폐제로서(과일 및 야채 쥬스 및 넥타, 청량 음료, 즉석 음료, 시럽, 기능성 음료, 스포츠 음료 등), 낙농업, 즉, 유제품, 요거트, 및 푸딩, 의약 산업, 자연요법 산업, 영양보조 산업, 및 다른 헬스케어 제품(예를 들어, 치약 및 구강 청결제), 과자류, 캔디, 및 검 산업, 야채(예를 들어, 케첩 또는 소스), 또는 부형제 또는 첨가제로서 향미 개질 조성물의 사용이 필요한 임의의 다른 적용에서의 활용을 포함한다.

[0195] 제품은 추가의 식품 성분을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 식품 성분은 감미료, 예를 들어 스테비올 배당체이다. 본원에 기재된 개질된 단백질과 스테비올 배당체의 조합은 상승 효과를 생성한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 제품은 서열 번호 1 내지 21로 표시되는 적어도 하나의 개질된 단백질 및 스테비올 배당체를 포함한다.

[0196] 스테비아(스테비아 배당체 또는 이의 혼합물로 본원에 표시됨) 및/또는 이의 변형이 0.5° Bx 내지 8° Bx의 수크로스 당량 범위로 본 발명의 개질된 단백질과 조합되는 경우, 개질된 단백질은 수크로스 감미의 30% 내지 70% 대체를 나타낸다. 인지된 감미 강도는 0.5° Bx 내지 8° Bx의 수크로스 당량의 적어도 100%의 스테비아 용액이다. 인지된 여운 관능 프로파일은 0.5° Bx 내지 8° Bx의 수크로스 당량의 100%의 스테비아 용액보다 우수하다.

[0197] 인지된 산미 관능 프로파일은 0.5° Bx 내지 8° Bx의 수크로스 당량의 100%의 스테비아 용액보다 우수하다.

[0198] 일부 실시형태에 따르면, 추가의 식품 성분은 수크로스, 아가베 시럽, 현미 시럽, 대추야자 설탕, 꿀, 메이플 시럽, 당밀, 나한과, 당알코올, 희소당, 아스파탐, 수크랄로스, 아세설팜 칼륨, 및 식이 섬유로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0199] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 제형은 감소된, 제거된, 또는 차폐된 뒷맛 또는 이미(예를 들어, 금속성 또는 감초 맛), 또는 감소되거나, 제거되거나, 차폐된 쓴맛, 또는 감소되거나, 제거되거나, 차폐된 단맛 여운을 갖는 당-유사 맛 프로파일을 제공한다.

[0200] 본 발명에 따른 개질된 MNEI 단백질은 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있으며, 예를 들어 단백질은 합성적으로, 재조합 DNA 기술에 의해, 또는 발효조, 식물, 식물 캘러스, 또는 다른 생물반응기를 통한 미생물에서의 단백질 생성에 의해 제조될 수 있음을 유의하여야 한다. 일부 실시형태에서, 개질된 단백질은 세균, 예컨대 대장균에서 제조될 수 있다. 일부 다른 실시형태에서, 개질된 단백질은 제조된 효모, 예컨대 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)일 수 있다. 일부 다른 실시형태에서, 개질된 단백질은 사상성 진균, 예컨대 트리초데르마(*Trichoderma*) 또는 아스페르길루스(*Aspergillus*)에서 제조될 수 있다.

[0201] 용어 "효모 및 사상성 진균"은 임의의 클루이베로미세스 속(*Kluyveromyces* sp.), 예컨대 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 사카로미세스 속(*Saccharomyces* sp.), 예컨대 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 속(*Pichia* sp.), 예컨대 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 피키아 핀란디카(*Pichia finlandica*), 피키아 트레할로필라(*Pichia trehalophila*), 피키아 코클라메(*Pichia koclamae*), 피키아 멤흐라네파시엔스(*Pichia memhranaefaciens*), 피키아 미누타(*Pichia minuta*)(오가테아 미누타(*Ogataea minuta*), 피키아 린드너리(*Pichia lindneri*)), 피키아 오푼티에(*Pichia opuntiae*), 피키아 써모톨러란스(*Pichia thermotolerans*), 피키아 살릭타리아(*Pichia salictaria*), 피키아 구에르쿰(*Pichia guercuum*), 피키아 피페리(*Pichia pyperi*), 피키아 스티프티스(*Pichia stiptis*), 피키아 메타놀리카(*Pichia methanolica*), 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 임의의 아스페르길루스 속(*Aspergillus* sp.), 예컨대 아스페르길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 아스페르길루스 니거(*Aspergillus niger*), 아스페르길루스 오리제(*Aspergillus oryzae*), 트리초데르마 리세이(*Trichoderma reesei*), 크리소스포리움 럭노웬스(*Chrysosporium lucknowense*),

푸사리움 속(*Fusarium* sp.), 푸사리움 그래미네움(*Fusarium gramineum*), 푸사리움 베네나툼(*Fusarium venenatum*), 피스코미트렐라 파텐스(*Physcomitrella patens*), 마이셀리오프토라(*Myceliopthora*), 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0202] 일부 실시형태에서, 선택된 아미노산 서열의 DNA 서열은 RNA 및 DNA 수준에서 최적화된다. RNA 수준에서, 이는 리보좀으로 신속하게 삽입되도록 RNA 2차 구조의 최소화를 포함한다. DNA 수준에서, 이는 숙주 유기체에 대한 코돈 최적화를 포함한다(RNA 수준 최적화를 고려함). 코돈-사용 최적화는 발현된 각각의 아미노산에 대해 숙주 유기체에서 가장 풍부한 tRNA를 사용하기 위한 선호도를 제공한다.

[0203] 상기와 관련하여, 제공되는 경우, 예를 들어 10%, 50%, 120%, 500% 등과 같은 백분율 값은 "접힘 변화" 값, 즉, 각각 0.1, 0.5, 1.2, 5 등과 상호 교환적인 것으로 이해되어야 한다.

[0204] 본원에 사용된 모든 과학 및 기술 용어는 달리 명시되지 않는 한, 당업계에서 일반적으로 사용되는 의미를 갖는다. 본원에 제공된 정의는 본원에서 빈번하게 사용되는 특정 용어의 이해를 용이하게 하기 위한 것이지, 본 개시내용의 범주를 제한하는 것을 의도하지 않는다.

[0205] 본원에서 사용된 용어 "약"은 ± 10%를 지칭한다. 용어 "포함하다(comprise)", "포함하는(comprising)", "포함하다(includes)", "포함하는(including)", "갖는(having)", 및 이들의 변형어는 "포함하지만, 이들로 제한되지는 않는"을 의미한다. 용어 "~로 본질적으로 구성된"은 조성물, 방법, 또는 구조가 추가의 성분, 단계, 및/또는 부분을 포함할 수 있지만, 오직 추가의 성분, 단계, 및/또는 부분이 청구된 조성물, 방법, 또는 구조의 기본적 그리고 신규 특징을 실질적으로 변경하지 않는 경우 그러한 것을 의미한다. 본원에서 사용된 용어 "약"은 지칭된 값보다 최대 1%, 보다 구체적으로는 5%, 보다 구체적으로는 10%, 보다 구체적으로는 15%, 그리고 일부 경우, 최대 20% 더 높거나, 더 낮게 벗어날 수 있는 값을 나타내고, 편차 범위는 연속적 범위를 구성하는 정수 값 및 적용 가능한 경우, 비-정수 값을 또한 포함한다.

[0206] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 단수 형태("a", "an", 및 "the")는 맥락이 달리 분명하게 지시하지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함함을 유의하여야 한다.

[0207] 본원에 사용된 "용액"은 소량의 성분(용질)이 주요 성분(용매) 내에 균일하게 분포되어 있는 액체 혼합물을 지칭한다. 용액은 투명하며, 현탁액 또는 탁한 혼합물과 대조적으로 미립자 물질을 함유하지 않는다.

[0208] 본원에 사용된 "시럽" 또는 "음료 시럽"은 유체, 전형적으로는 물이 첨가되어 즉석 음료 또는 "음료"를 형성하는 음료 전구물질(precursor)을 지칭한다. 전형적으로는, 시럽 대 물의 부피 비율은 1:3 내지 1:8, 보다 전형적으로는 1:4 내지 1:6이다. 시럽 대 물의 부피 비율은 "트로우(throw)"로 표시된다. 음료 산업에서 일반적으로 사용되는 비율, 1:5 비율은 "1+5 트로우"로 알려져 있다.

[0209] 제형은 "있는 그대로" 또는 다른 감미료, 향미료, 및 식품 성분과 조합하여 사용될 수 있다.

[0210] 감미료의 비-제한적 예는 스테비올 배당체, 스테비오사이드, 리바우디오사이드 A, 리바우디오사이드 B, 리바우디오사이드 C, 리바우디오사이드 D, 리바우디오사이드 E, 리바우디오사이드 F, 둘코사이드 A, 스테비올바이오사이드, 루부소사이드뿐만 아니라 스테비아 리바우디아나 베르토니 식물에서 발견되는 다른 스테비올 배당체 및 이의 혼합물, 스테비아 추출물, 루오 한 구오 추출물(Luo Han Guo extract), 모그로사이드, 고-프룩토스 콘 시럽, 콘 시럽, 전화당, 푸룩토올리고당, 이눌린, 이눌로올리고당, 커플링 당, 말토올리고당, 말토덱스트린, 콘 시럽 고체, 글루코스, 말토스, 수크로스, 락토스, 아스파탐, 사카린, 수크랄로스, 당알코올을 포함한다.

[0211] 향미료의 비-제한적 예는 크랜베리, 레몬, 오렌지, 바나나, 포도, 배, 파인애플, 구아라나, 사과, 망고, 고편도, 콜라, 시나몬, 당, 코튼캔디(cotton candy), 및 바닐라 향미료를 포함한다.

[0212] 다른 식품 성분의 비-제한적 예는 향미료, 산미료, 유기산 및 아미노산, 착색제, 벌크화제, 개질된 전분, 검, 질감화제, 보존제, 산화방지제, 유화제, 안정제, 증점제, 및 겔화제를 포함한다.

[0213] 본원에 사용된 문구 "당-유사 특징", "당-유사 맛", "당-유사 감미", "당 맛(sugary)", 및 "유사 당"은 동의어이다. 당-유사 특징은 수크로스의 특징과 유사한 임의의 특징을 포함하며, 최대 반응, 향미 프로파일, 일시적 프로파일, 적응 거동, 구강촉감, 농도/반응 기능 거동, 맛, 및 향미/감미 상호작용, 공간적 패턴 선택성, 및 온도 효과를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 이들 특징은 수크로스 맛이 천연 및 합성 고역가 감미료의 맛과 상이하다는 관점이다. 특징이 보다 당-유사인지 여부는 당 및 기능성 맛-개선 조성물의 전문가 관능 패널의 평가에 의해 결정된다. 이러한 평가는 조성물 특징에서의 유사성을 정량화한다. 조성물이 보다 당-유사 맛인

지 여부를 결정하기에 적합한 절차는 당업계에 잘 알려져 있다.

[0214] 본원에 사용된 용어 "향미" 또는 "향미 특징"은 맛, 냄새, 및/또는 질감의 성분의 조합된 관능적 인지이다. 본원에 사용된 용어 "증강하다"는 이의 속성을 변화시키지 않고 향미 특징의 관능적 인지를 증대, 강화, 강조, 확대, 및 강력하게 하는 것을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "개질하다"는 이러한 특징의 품질 또는 지속 기간이 부족하였던 경우, 향미 특징의 관능적 인지를 변경, 변형, 억제, 약화, 강화, 및 보충하는 것을 포함한다.

[0215] 본원에 사용된 "맛-개질 단백질(TMP)"은 비제한적으로 감미, 감칠맛뿐만 아니라 차단제, 증강제, 차폐제, 향미 특징을 갖는 단백질과 같은 기본적 맛의 대체제로서 작용하는 단백질로서 정의된다.

[0216] 본 발명에서 "고강도 감미료"는 수크로스와 비교하여 강한 감미를 갖는 단백질을 의미하며, 자연 발생 단백질, 재조합 단백질, 또는 이의 조합일 수 있다. 고강도 감미료는 동일한 양의 수크로스보다 5배 이상, 10배 이상, 50배 이상, 100배 이상, 500배 이상, 1000배 이상, 5000배 이상, 10000배 이상, 50000배 이상, 100000배 이상의 감미를 나타낸다.

[0217] 본원에 사용된 "영양 기능 성분"은 인간을 위한 영양소를 지칭하며, 무기질, 유기산, 비타민, 폴리페놀, 단백질, 아미노산, 식이 섬유, 및 글루사이드(당류 제외)로 구성된 군으로부터 선택되는 임의의 하나 이상을 지칭한다.

[0218] 본원에 사용된 용어 "기능적"은 열 또는 다른 과정 이후 기능(예를 들어, 감미)의 보존을 지칭한다(가능한 구조적 변화에도 불구하고).

[0219] 본원에 사용된 용어 "기능적 안정성"은 건조, 물, 또는 완충액 형태의 순수한 물질의 화학적 안정보다는 제형 또는 소비자 포장재 조건에서의 안정성 및 기능적 관능 특성을 유지하는 안정성을 지칭한다.

[0220] 본원에 사용된 용어 "식품"은 음료, 과자류 제품, 추잉검 제품, 또는 식품 제품을 포함하는 임의의 식용 경구 조성물을 의미한다.

[0221] 본원에 사용된 용어 "음료"는 예를 들어 착향수, 청량 음료, 과일 음료, 커피 기반 음료, 차 기반 음료, 쥬스 기반 음료, 우유 기반 음료, 젤리 음료, 탄산 또는 비-탄산 음료, 알코올 또는 비-알코올 음료를 포함하는 임의의 마실 수 있는 액체 또는 반액체를 의미한다.

[0222] 본원에 사용된 "경구 섭취 가능한 조성물" 및 "감미 조성물"은 동의어이며, 입 내로 취하고, 이후 배출되는 물질 및 마시거나, 먹거나, 삼키거나, 달리 섭취되는 물질을 포함하는, 인간 또는 동물의 입에 접촉하고, 일반적으로 허용 가능한 범위로 사용될 때, 인간 또는 동물 소비에 안정한 물질을 지칭한다. 이들 조성물은 식품, 음료, 의약품, 영양보조품, 경구 위생/화장품 제품 등을 포함한다. 이들 제품의 비-제한적 예는 비-탄산 및 탄산 청량 음료(CSD), 예컨대, 콜라, 진저에일, 루트 비어, 사이다, 과일 착향 청량 음료(예를 들어, 시트러스 착향 청량 음료, 예컨대 레몬-라임, 크랜베리, 또는 오렌지); 분말화 청량 음료 등; 과일 또는 야채로부터 유래된 과일 쥬스; 압착 쥬스 등을 포함하는 과일 쥬스; 과일 입자 함유 과일 쥬스, 과일 음료, 과일 쥬스 음료, 과일 쥬스 함유 음료, 쥬스 향미료를 갖는 음료, 야채 쥬스, 야채 함유 쥬스, 및 과일과 야채 함유 혼합 쥬스; 스포츠 음료, 에너지 음료, 니어 워터 등의 음료(예를 들어, 천연 또는 합성 향미료를 갖는 물); 차 유형 또는 음료, 예컨대 커피, 코코아, 홍차, 녹차, 우롱차 등; 우유 성분 함유 음료, 예컨대 우유 음료, 우유 성분 함유 커피, 카페라테, 밀크차, 과즙유 음료, 마실 수 있는 요거트, 락트산 박테리아 음료 등; 유제품; 베이커리 제품; 디저트, 예컨대 요거트, 젤리, 검류(gummy), 마실 수 있는 젤리, 푸딩, 바바리안 크림, 블랑망즈, 케이크, 브라우니, 무스, 땅콩 버터 등, 티타임 또는 식사 후에 먹을 수 있는 감미 식품 또는 음료 제품; 냉동 제품; 차가운 당과 제품, 예를 들어 아이스크림 유형, 예컨대 아이스크림, 아이스 밀크, 락토스-아이스 등(감미료 및 다양한 다른 유형의 원료가 우유 제품에 첨가되고, 수득되는 혼합물은 교반 및 냉동되는 식품 또는 음료 제품), 및 아이스 당과 제품, 예컨대 셔벗, 디저트 아이스 등(다양한 다른 유형의 원료가 당 맛의 액체에 첨가되고, 수득되는 혼합물은 교반 및 냉동되는, 식품 또는 음료 제품); 아이스크림; 일반 당과 제품, 예를 들어 구운 당과 제품 또는 찐 당과 제품, 예컨대 케이크, 크래커, 비스킷, 팥소(bean-jam) 채운 번 등; 떡 및 스낵; 식탁용 제품; 일반적 당의 당과 제품, 예컨대 추잉검(예를 들어, 고무 또는 먹을 수 있는 특정 천연 합성 수지 또는 왁스를 포함하는 실질적으로 불수용성, 씹을 수 있는 검 베이스, 예컨대 치클 또는 이의 대체제를 포함하는 조성물 포함), 하드 캔디, 소프트 캔디, 민트, 누가 캔디, 젤리빈 등; 과일 착향 소스, 초콜릿 소스 등을 포함하는 소스; 식용 겔; 버터 크림, 밀가루 페이스트, 휘핑 크림 등을 포함하는 크림; 딸기잼, 마멀레이드 등을 포함하는 잼; 달콤한 빵 등을 포함하는 빵 또는 다른 전분 제품; 향신료; 로스트 고기, 로스트 닭, 바베큐 고기 등에 사용되는 시즈닝 간장뿐만 아니라 토마토 케첩(케첩), 소스, 국수 육수 등을 포함하는 일반적 조미료; 농산물, 축

산물, 또는 해산물 가공품; 소시지 등의 육가공품; 레토르트 식품 또는 음료 제품, 피클, 절임, 간장, 진미(delicacies), 곁들임 요리; 스낵, 예컨대 감자 칩, 쿠키 등; 시리얼 제품; 경구적으로 투여되거나, 구강에서 사용되는 약물, 준-약물, 및 식이 보충제(예를 들어, 비타민, 진해시럽, 진해정, 씹을 수 있는 의약 정제, 아미노산, 쓴맛이 나는 약물 또는 약학제, 산미료 등), 약물은 고체, 액체, 겔, 또는 에어로졸 형태, 예컨대 환제, 정제, 분무제, 캡슐, 시럽, 드롭, 트로키제, 분말 등일 수 있음; 퍼스널 케어 제품, 예컨대 구강에 사용되는 경구 조성물, 예컨대 구강 청량제(mouth freshening agent), 가글링제, 구강 세정제, 치약, 치아 광택제, 덴트리피스(dentrifice), 구강 분무제, 치약 미백제 등; 식이 보충제; 동물 사료; 및 질환(예를 들어, 심혈관 질환 및 고콜레스테롤혈증, 당뇨, 골다공증, 염증, 또는 자가면역 장애 수준)의 예방 및 치료를 포함하여 의료 또는 건강상의 이점을 제공할 수 있는 임의의 식품 또는 식품의 일부를 포함하는 영양보조 제품을 포함한다.

[0223] 본원에 사용된 스테비아는 스테비아 리바우디아나(베르토니), 브라질과 파라과이가 원산지인 국화(컴포시테)과의 다년생 관목의 일반명이다. 스테비아 잎, 잎의 수성 추출물, 및 스테비아로부터 단리된 정제된 스테비올 배당체는, 무칼로리이고 천연 유래인 점에서 모두 바람직한 감미료로서 개발되었다. 스테비아 리바우디아나로부터 단리된 스테비올 배당체는 스테비오사이드, 리바우디오사이드 A, 리바우디오사이드 C, 둘코사이드 A, 루부소사이드, 스테비올바이오사이드, 리바우디오사이드 B, 리바우디오사이드 D, 및 리바우디오사이드 F를 포함한다.

[0224] Reb M(리바우디오사이드 X로도 불림), (13-[(2-O-베타-D-글루코피라노실-3-O-베타-D-글루코피라노실-베타-D-글루코피라노실)옥시] 엔트 카우르-16-엔-19-오산-[(2-O-베타-D-글루코피라노실-3-O-베타-D-글루코피라노실-베타-D-글루코피라노실) 에스테르]가 스테비아 리바우디아나로부터 단리 및 특성 규명되었다.

[0225] 본원에 기재된 식품 또는 음료 조성물은 개선된 식품 또는 음료 관련 특성을 갖는다. 조성물의 감미 프로파일, 예컨대 조성물의 감미 역가, 이미의 부재, 감소된 개시 시간, 및 감소된 여운 맛은 당업계에 알려진 임의의 알려진 맛 시험에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 수크로스 또는 다른 감미료의 감미에 대한 비교는 관능 패널에 의해 수행될 수 있으며, 감미 역가는 하기 실시예에서 상세히 기재되는 바와 같이 등급화될 수 있다.

[0226] **비-제한적 실시예**

[0227] **실시예 1: MNEI 기반 단백질의 설계**

[0228] MNEI 기반 단백질의 설계를 다음과 같이 실시하였다: 단쇄 모넬린, MNEI(서열 번호 45)는 약 11 kD의 분자량 및 pI 약 8.7을 갖는, 96개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드이다.

[0229] **컴퓨터 방법**

[0230] 상기 기재된 바와 같이, 컴퓨터 및 인간 전문가 분석은 컴퓨터로, 전문가에 의해, 실험적으로, 또는 이들 방법의 조합에 의해 추가로 분석될 수 있는 감소된 서열 공간을 제공한다. 이러한 분석은 개별적 아미노산, 아미노산 클러스터, 또는 다른 조합에 적용될 수 있다.

[0231] 컴퓨터 단백질 설계(CPD) 과정 동안, 아미노산 대체 및/또는 결실은 수용체 결합 부위의 일부일 가능성이 적은 특정 영역, 예를 들어 나선 주변, 단백질 코어를 형성하는 베타-시트의 비-노출된 측면, 또는 야생형 모넬린으로부터 MNEI를 구별하는 엔지니어링된 루프에서 허용되었다. ROSETTA 실행은 600K 모델을 수득하였다. 모든 모델의 에너지가 그려졌을 때, 결과 그래프는 로짓 함수(logit function)의 형태를 가졌다. 로짓 함수(로그 오드(log odd)로도 알려짐)는 오드 $p/(1-p)$의 로그이며, 여기서, p는 확률이다. 이는 에스자형 "로지스틱" 함수의 역이다.

[0232] 추가의 분석을 위해, 5K 최저 모델을 선택하였다. 대체 수(MNEI와 비교)를 REU의 함수로서 도표화하는 것은 가우스 분포를 제공하였으며, 이는 집단이 정상적이고, 추가의 분석을 위해 유효함을 보여준다.

[0233] **MNEI에서의 루프 설계**

[0234] MNEI에서의 Y47-K56 루프(즉, 글리신-페닐 펩타이드)는 가요성 루프이며, 이는 분자 동력학(MD) 시뮬레이션에 의해 pH=2 및 7에서 입증하였다. 이 루프는 모넬린에 고유한 것이 아니며, 천연 모넬린의 2개의 하위 단위(사슬 A 및 사슬 B)의 링커로서 도입되었다. 이러한 방식으로, MNEI를 제조하였다.도입된 루프는 감미에 대한 영향을 갖지 않으며, 따라서 MNEI는 모넬린과 동일한 감미를 갖지만, MNEI는 더 높은 Tm(용융 온도)을 가지며, 이는 루프가 단백질 안정성에 대한 가질 수 있는 영향을 예증한다(문헌[Curr Opin Struct Biol. 1999 Aug;9(4):494-9]). 루프의 중요성을 식별하여, 본 발명자들은 수율, 안정성, 및 관능 프로파일을 증가시키기 위해 루프를 재설계 및 단축하였다.

[0235] **절차:**

[0236] **그래프팅**

[0237] MNEI의 루프 및 2개의 인접한 베타 시트의 3D 구조 정렬 이후, 2개의 유사한 단백질을 식별하였다. 이들 PDB를 기반으로, 4개의 모델을 구축하고, ROSETTA를 사용하여 최소화하였다.

[0238] **크기 기반 그리고 순이론적 모델링**

[0239] 상기 약술된 그래프팅 절차로부터 별도로, 추가의 루프 변경을 물리적 그리고 생물물리적 고려 사항을 기반으로 얻었다. MNEI 안정성에 대한 루프 길이의 효과를 연구하기 위해, 다양한 길이를 갖는 루프를 Rosetta 또는 Swiss-PDB-뷰어와 같은 CPD 소프트웨어를 사용하여 모델링하였다. 루프 모델링을 MNEI 서열을 사용한 물리적 고려 사항을 기반으로 또는 상동체 모델링을 기반으로 수행하였다. 이어서, 각각의 모델을 에너지 최소화하고, 에너지를 GROMOS96 43B 1 역장을 사용하여 계산하였다. 이러한 분석을 기반으로, 6, 5, 및 4개의 잔기를 갖는 루프를 추가로 시험하였고, 이들 길이를 갖는 루프가 에너지적으로 보다 유리한 것으로 발견되었다.

[0240] **열안정성**

[0241] MNEI 서열의 상이한 변형을 구축하고, 각각의 모델의 에너지를 Rosetta에 의해 예측하였다. 추가의 분석을 위해, 최저 에너지 서열 DM28(원래 MNEI 루프를 3개의 아미노산만큼 단축시킨 4량체 루프, 즉, 4개의 아미노산 루프를 가짐)을 선택하고, 에너지 CPD 계산을 100K 반복을 갖는 Rosetta를 사용하여 실시하였다. 이어서, 추가의 변형을 특정 아미노산 치환을 갖는 4량체 루프를 조합하여 DM28을 주형으로서 사용하여 구축하였다(DM29, DM31, DM32 & DM33을 수득함, 표 3 및 표 4 참조). 하나의 추가의 변형, DM30을 DM09를 기반으로 첨가하였다. 최저 에너지 서열, DM31을 추가의 분석을 위해 선택하였다.

[0242] [표 1A]

ROSETTA 에 의해 계산된 상이한 서열의 에너지. 모든 계산은 Rosetta 3.8 을 사용하여 수행하였다. MNEI 를 제외하고, REU 는 단백질의 이론적 구조에 대해 계산하였으며, 여기서, 계산은 PDB ID 2o9u 및 표의 마지막 열, DM31 의 결정 구조를 기반으로 하였음을 유의한다.

단백질	REU
MNEI	-198.410
DM09_6 량체 루프	-195.663
DM09_5 량체 루프	-189.168
MNEI_5 량체 루프	-192.917
DM28	-200.068
DM29	-198.603
DM30	-200.03
DM31	-203.534
DM32	-201.43
DM33	-203.061
결정 구조 DM31	-208.025

[0243]

[0244] 도 30 내지 도 32는 PDB에서 입수 가능한 결정 구조 및 본 발명자들에 의해 풀어낸 DM31의 결정 구조를 사용하여 DM31의 특성을 MNEI의 것들과 비교한다. 이들 도면은 신규 단백질, DM31을 수득하는 치환, 삽입, 및 결실뿐만 아니라 루프 재설계가 유의하게 더 강성의 구조적 요소를 갖는 더 안정한 단백질을 제조하였음을 시사한다. 증가된 안정성은 MNEI의 루프 구조와 비교하여 DM31의 조밀한 재설계된 루프 구조에 의해 시사된다(도 30b). 또한, 도 31a 및 도 31b에 나타낸 B-인자 분석은 DM31의 루프 잔기에 대한 감소된 B-인자(도 31b)뿐만 아니라 2차 구조 요소에 대한 감소된 평균(도 31a)을 입증한다. B-인자는 무질서를 나타내기 때문에, 이들 결과는 DM31의 증가된 안정성을 입증한다.

[0245] 도 32는 재설계된 루프 및 인접한 베타 가닥에서의 골격 매개 수소 결합을 보여주며, 이는 MNEI의 상응하는 루프(도 32a, PDB ID: 2o9u)와 비교하여 DM31의 이 영역에서의 더 양호하게 최적화된 수소 결합뿐만 아니라 신규 결합(도 32c)을 입증한다. 신규 수소 결합은 안정한 베타 회전을 나타내며, 이는 무질서 루프를 대체한다. 수소 결합은 또한 표 1b에서 보여준다. 이 도면은 DM31에 존재하고, 입수 가능한 MNEI 구조 중 적어도 하나에서는 존재하지 않는 19개의 수소 결합을 예증한다. 표에서의 숫자는 골격 질소 상의 참여 수소와 수용체로서의 골격 산소의 거리를 나타낸다. 표는 MNEI에 대해 입수 가능한 최고 해상도 구조인 2o9u 구조(1.15 A의 해상도)에서, DM31의 결정 구조(1.6 옹스트롬의 해상도)와 비교하여 더 적은 수소 결합이 존재하며, 이들 결합 중 일부는 덜 최적화(거리 및 각도의 측면에서)됨을 시사한다. 도 31에 기술된 B-인자에서의 증가 외에, 2o9u 구조는 이중 점유를 갖는 3개의 잔기(E4, M42, 및 E48)를 가지며; 이는 DM31 구조에서는 강성화되었던 이 고해상

도 구조에서의 무질서를 강조한다.

[0246] 도 30a에서의 삽입은 선택된 아미노산 치환뿐만 아니라 재설계된 루프 영역을 강조한다. 이들 변화는 설계자 단백질, DM31의 증가된 안정성 및 감미의 기반이다. 도 30a(도 30b에서도 보임)에서의 루프 영역을 나타내는 삽입은 루프 영역에서의 잔기가 신규 수소 결합(도 32)을 형성할 뿐만 아니라, 인근에 2개의 베타 가닥의 신장에도 참여하며, 이는 또한 증가된 안정성을 나타냄을 예증한다. 전반적으로, 무질서 루프의 베타 회전에 의해 연결되는 신장된 베타 가닥으로의 대체는 단백질의 이 영역을 강성화시키며, 이는 용융 온도에서의 유의한 증가로 나타나는 증가된 안정성을 수득하게 된다.

[0247] [표 1B]

수소 결합. 1 문자의 아미노산의 설명과, 그에 이어지는 수소 결합의 공여체 또는 수용체인 사슬에서의 아미노산의 숫자. 넘버링은 MNEI(PDB ID: 2o9u)의 넘버링에 따른 것이다. 모든 수소 결합은 골격 질소 상의 수소와 수용체로서의 골격 산소의 사이에 존재한다. 숫자는 공여체의 수소와 수용체 사이의 옹스트롬 거리를 나타낸다.

# 수소 결합	공여체	수용체	liv7	2O9U	DM31
1	T45 N	N2	1.8	--	2.1
2	E4	K43	2.1	2,2.5	2.1
3	K43	E4	1.8	--	1.8
4	M42	Q61	2.4	1.8,2.3	2.1
5	Q61	M42	1.8	--	1.9
6	146	G57	1.8	--	1.9
7	G57	146	2.2	2.5	--
8	E54	E48	--	--	2.1
9	E48	E54	2	1.8	2
10	Y58	E77	1.8	2	1.8
11	E77	Y58	1.9	--	2
12	E59	K44	1.9	--	1.9
13	K44	E59	1.8	1.9	1.8
14	F71	V64	1.9	1.9	1.9
15	V64	F71	1.9	--	1.9
16	D74	R88	2.1	--	1.8
17	R88	D74	2.5	2.3	2.5
18	N90	R72	2.2	2	2
19	R72	N90	2	--	1.9

[0248]

[0249] **B-인자(데바이-월러 인자)**

[0250] 온도 인자, B-인자, 또는 원자 대체 매개변수로도 알려진 데바이-월러 인자는 단백질 자료 은행(PDB)에 누적된 모든 X 선 구조에서의 모든 원자에 대해 포함된다. 이들 값은 모든 단백질 원자에 대해 제공되며, 실험적 전자 밀도 맵에 언급되는 바와 같이 원자의 평균 대체를 지칭한다. 이러한 산란은 2개의 상이한 현상, 원자의 온도-의존적 진동에 의해 유발되는 동적 무질서, 및 정적 무질서의 결과이다.

[0251] 재모델링된 루프의 안정성을 입증하기 위해, DM09 및 DM31의 값에 대한 MNEI의 구조(PDB ID: 2O9U, 1IV7, 5Z1P)의 골격 B-인자를 Structural Proteomic Center(바이츠만 연구소)에 의해 생성된 결정 구조를 기반으로 비교하였다. 각각의 단백질의 경우, 골격 B-인자 값을 먼저 Z-스코어 정규화를 사용하여 개별적으로 정규화하였다.

[0252] 정규화 후, DM31에 도입된 루프 설계(3개의 아미노산의 결여)는, 높은 B-인자를 갖는 위치를 제거하는 것과, 인근 잔기에 영향을 미치는 것에 의해 재설계된 루프에서의 B-인자를 감소시켰음이 명백하였다.

[0253] 도 31a 및 도 31b는 MNEI 구조, DM09 & DM31의 정규화 B-인자를 입증하였다. 골격 B-인자를 먼저 Z-스코어 정규화를 사용하여 각각의 구조에 대해 개별적으로 정규화하였다. 영역 (A)에 의해 그리고 루프 잔기 (B)에 의해.

[0254] **결정 구조 품질 보증 분석**

[0255] 소프트웨어 MolProbity는 단백질 구조의 생물물리적 특성에 대한 품질 보증 분석을 수행한다. MolProbity를 사용하여 MNEI 구조를 확인하고, 이들을 DM09 및 DM31의 결정 구조와 비교한다. 비교는 DM31이 기준 MNEI 구조와 비교하여 유리한 특성을 가졌음을 입증하였다. 특히, DM31은 불량한 회전 이성질체를 갖지 않으며, MolProbity에 따르면 이의 회전 이성질체 중 96% 초과가 선호된다. MolProbity이 시험한 또 다른 양태는 상이한 아미노산에 대한 이들의 각도의 알려진 통계적 분포와 관련된 골격 이면각의 조합이다. 이들 분포와 관련하여, DM31은

이상치(outlier) 각도를 갖지 않으며, 97% 초과의 유리한 값을 입증한다.

[0256] [표 1C]

결정 구조 분석의 데이터

독립체 ID	발표 날짜	해상도	대칭 단위 - 공간 그룹	클래쉬스코어 (clashscore), 모든 원자:	불량한 회전 이성질체	선호되는 회전 이성질체	라마찬드란 이상치 (Ramachandran outlier)	선호되는 라마찬드란
liv7	07/10/2003	1.82	P122	16.69	4.76%	84.52%	0.00%	97.34%
5zlp	21/02/2018	1.89	P 1	5.28	2.50%	92.19%	0.57%	96.01%
2o9u	20/02/2007	1.15	P 1 211	44.76	4.20%	89.08%	0.00%	97.83%
DM09	06/07/2021	1.5	P 1	2.31	0.00%	96.18%	0.00%	97.19%
DM31	13/07/2021	1.6	P 1	3.41	0.00%	96.05%	0.00%	97.75%

[0257]

[0258] **수소 결합: 베타 회전을 루프 영역에 도입**

[0259] 단백질을 수소 결합에 의해 안정화시키고, 이는 또한 이들의 2차 구조를 결정한다. PyMol을 사용하여 DM31, DM09의 결정 구조 및 대표적 고품질 MNEI 구조, PDB id 2O9U의 수소 결합을 분석하였다. 분석은 E48과 E51(MNEI에서 E54와 동등함) 사이의 설계자 루프 영역에서 신규 수소 결합의 존재를 밝혔다. 이러한 도입된 결합, 루프 영역을 안정화시키는 것을 목표로 하는 설계의 결과는 고전적 강성 유형-II 베타 회전을 수득하였으며, 이는 MNEI 구조에서 발견되는 랜덤 코일의 불안정한 루프보다 훨씬 더 안정하다.

[0260] 도 32a 내지 도 32c는 MNEI(A), DM09(B), 및 DM3 1(C)에 대한 수소 결합을 입증한다. 루프 영역은 사각형으로 표시된다.

[0261] 도 33은 DM31 루프 구조가 베타 회전의 구조적 정의와 일치함을 보여준다: DM31 설계된 루프의 구조 및 개략적 베타 회전.

[0262] **실시예 2: MNEI 설계자 단백질 DM13 내지 DM33의 복제, 발현, 및 특성 규명**

[0263] 재조합 MNEI 단백질을 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드(IPTG)로 유도된 T7 촉진제 하에 대장균 BL21(DE3+)에서 제조하였다. 이러한 시스템 하에, MNEI 단백질을 고밀도 발효 과정에서 사이토솔 단백질(가용성 분획)로서 발현하였다. 설계자 MNEI(DM)는 최대 11% 아미노산 치환을 갖는 설계된 단백질이다. 2개의 DM 분자(DM08 및 DM09)는 본 발명자의 발명자들의 국제공개 WO2019215730호에 개시되었다. 두 단백질 모두 MNEI의 위치 2, 23, 및 65에서 3개의 치환을 보유하며, 이는 더 높은 열 안정성 및 증가된 안정성에 이르게 한다.

[0264] 본 발명은 위치 2 및 23에서 대체를 역전시키거나, 역전시키지 않고, 위치 35, 36, 및 70에서 DM08 또는 DM09에 대한 최대 3개의 추가의 아미노산 치환을 첨가하여 제조되었던 신규 DM 분자를 개시하고 있다. 또한, 4개의 아미노산이 모넬린 B와 A 사슬을 연결하는 루프로부터 제거된 2개의 고유한 DM 분자(DM28 및 DM29)를 제조하였다. 위치 36 및 70에서의 치환을 신규하게 설계된 루프와 조합하여, 3개의 추가의 변형(DM31, DM32, 및 DM33)을 제조하였다. 하나의 추가의 변형(DM30)을 DM09에 대한 오직 단일 아미노산 치환에 의해 제조하였다.

[0265] 모든 DM은 대장균 발효에서 제조하고, >95% 수준으로 정제하였다.

[0266] **복제**

[0267] DM08 및 DM09의 서열을 기반으로 하는 부위 특이적 돌연변이 유발(SDM)을 사용하여 DM13 내지 DM33을 제조하였다.

[0268] DM28 내지 DM33에서의 루프 제거를 위해, 결실을 유사한 방식으로 수행하였다. 표 2는 이 과정에 대해 사용된 프라이머를 열거하고 있다. 모든 최종 구조물 서열을 확인하였다.

[0269] [표 2]

DM13 내지 DM33 을 제조하기 위한 부위 특이적 돌연변이 유발 반응에 사용된 프라이머

프라이머 표적	명칭(F/R)(서열 번호):	서열	Tm
DM13	DM13_F(서열 번호 28)	AAGCGAT AAAa t c T T T CGT GC AGAT AT T AG	60°C
	DM13_R(서열 번호 29)	GCTTTCACATACAGCTGATATTC	62°C
DM14	DM14_F(서열 번호 30)	AAGCGATAAAatcTTTCGTGCAGATATTAGC G	64°C
	DM14_R(서열 번호 31)	GCGCGCACATACAGCTGA	69°C
DM15/DM20/DM22	DM15_F(서열 번호 32)	AGT T GACGAAg a aAACAAAAT T GG	56°C
	DM15_R(서열 번호 33)	GCAAATTTACCCAGGTTC	58°C
DM16-18	SDM_K36T_F(서열 번호 34)	ACCTTTAACACCGTTATTCGTCCGTGCATG	63°C
	SDMK_36T_R(서열 번호 35)	CAGACGACCATACTGGCC	65°C
DM19	DM19_F(서열 번호 36)	CTGACCTTTAcCACCGTTATTCG	60°C
	DM19_R(서열 번호 37)	ACGACCATACTGGCCAAT	64°C
DM21/DM23	DM21_F(서열 번호 38)	TACCATGGGCgaaTGGGAGATTA	63°C
	DM21_R(서열 번호 39)	TATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATT TC	61°C
DM24	DM24F(서열 번호 40)	GACCTTTACCaaaGTTATTCGTCCGTGCATG	63°C
	DM24_R(서열 번호 41)	AGACGACCATACTGGCCA	66°C
DM25	DM25 F(서열 번호 42)	AGTTGACGAAattAACAAAATTGGCC	55°C
	DM25_R(서열 번호 43)	GCAAATTTACCCAGGTTC	58°C
DM26	Y65R_F(서열 번호 44)	GCTGTATGTGcgcGCAAGCGATAAAC	62°C
	Y65R_R(서열 번호 46)_	T GATAT T CATAGC CT T TAAT C T C	58°C
DM27	DM27_F(서열 번호 47)	GTTGACGAAGtGAACAAAATTG	57°C
	DM27_R(서열 번호 48)	TGCAAATTTACCCAGGTTC	60°C
DM28/DM29/ DM31-33	Loop1_F(서열 번호 49)	GCGAGATTAAAGGCTATG	58°C
	Loop1_R(서열 번호 50)	CATTTTCATAGATGGTTTTTTTC	55°C
DM30	L70I_F(서열 번호 51)	CAAGCGATAAAatcTTTCGTGCAG	62°C
	L70I_R(서열 번호 52)	CGCGCACATACAGCTGA	55°C

[0270]

[0271] DM13 내지 DM33 및 DM-3, 8-12의 뉴클레오티드 서열은 표 3에 열거되어 있다.

[0272] [표 3]

개질된 단백질의 서열

서열 번호	서열
서열 번호 1(DM13)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEVNKIGQYGRLTFNK VIRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVKASDKIFRA DISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 2(DM14)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEANKIGQYGRLTFNK VIRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKIFRA DISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 3(DM15)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLTFNK VIRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVKASDKIFRA DISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 4(DM016)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEVNKIGQYGRLTFNT VIRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVKASDKIFRA DISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 5(DM17)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEANKIGQYGRLTFNT VIRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKIFRA DISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 6(DM18)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLTFNTV IRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVKASDKIFRAD ISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 7(DM19)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEANKIGQYGRLTFTTV IRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKIFRAD ISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 8(DM20)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLTFTTV IRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKIFRAD ISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 9(DM21)	GEWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLTFTTV IRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKIFRAD ISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 10(DM22)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLTFNTV IRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKIFRAD ISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 11(DM23)	GEWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLTFNTV IRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKIFRAD ISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 12(DM24)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEANKIGQYGRLTFTK VIRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKIFRA DISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 13(DM25)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEINKIGQYGRLTFNKV IRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKLFRA DISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 14(DM26)	GEWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLTFNKV IRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKIFRAD ISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 15(DM27)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEVNKIGQYGRLTFNK VIRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKLFR ADISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 16(DM28)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEANKIGQYGRLTFNK VIRPCMKKTIYENGEIKGYEYQLYVRASDKLFRADIS EDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 17(DM29)	GEWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLTFNKV IRPCMKKTIYENGEIKGYEYQLYVYASDKLFRADISE DYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 18(DM30)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEINKIGQYGRLTFNKV IRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKIFRAD ISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 19(DM31)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEANKIGQYGRLTFNK VIRPCMKKTIYENGEIKGYEYQLYVRASDKIFRADIS EDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 20(DM32)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEVNKIGQYGRLTFNK VIRPCMKKTIYENGEIKGYEYQLYVKASDKIFRADIS EDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 21(DM33)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEVNKIGQYGRLTFNT VIRPCMKKTIYENGEIKGYEYQLYVKASDKIFRADIS EDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 45(MNEI)	GEWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLTFNKV IRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVYASDKLFRA DISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 22(DM03)	GNWEIIDTGPFTQKLGKFAVDEANKIGKYGTLTFTK VIRPTMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVKANDKLFR ADISEDYKTRGLKLLRFNGPVPPP
서열 번호 23(DM08)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEVNKIGQYGRLTFNK VIRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVKASDKLFR ADISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 24(DM09)	GNWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEANKIGQYGRLTFNK VIRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVRASDKLFR ADISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 25(DM10)	GEWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGKYGTLTFTKV IRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVYANDKLFRA DISEDYKTRGRKLLRFNGPVPPP
서열 번호 26(DM11)	GEWEIIDTGPFTQKLGKFAVDEENKIGQYGRLTFNK VIRPTMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVYASDKLFR ADISEDYKTRGLKLLRFNGPVPPP
서열 번호 27(DM12)	GEWEIIDTGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLTFNK VIRPTMKKTIYENEGFREIKGYEYQLYVYASDKLFR ADISEDYKTRGLKLLRFNGPVPPP

[0273]

[0274] **발효**

[0275] 모든 DM 클론을 Sartorius BioStatB 시스템을 사용한 3 L 용기 또는 Solaris Jupiter 시스템의 2 L 용기에서의 발효에 적용하였다. 일부 DM 클론은 VTT(핀란드 소재) 및 SciVac(이스라엘 소재)에서 아웃소싱하여 제조하였다. 모든 발효는 문헌["High cell -density fermentation of Escherichia coli" by Arie Geerlof - EMBL Hamburg 29 January 2008]을 기반으로 하는 프로토콜을 따랐다.

[0276] **정제**

[0277] 모든 DM 샘플을 다음 단계를 사용하여 정제하였다:

[0278] 1. 압력 균질기에 의한 용해

[0279] 2. 다중모드 수지 상의 단백질의 포획, 동일한 완충액 중의 NaCl 농도를 증가시켜서 용출.

[0280] 3. 다음 군으로부터 수지를 사용한 적어도 하나의 연마 단계:

[0281] 1. 이온 교환.

[0282] 2. 소수성 상호작용.

[0283] 3. 크기 배제.

[0284] 4. 최종 미생물 여과(0.2 um) 및 -20℃에서의 저장.

[0285] **특성 규명**

[0286] **정제 수준**

[0287] 정제 수준을 겔 전기영동법에 이어서 쿠마시 염색 및 덴시토메트리 분석을 사용하여 평가하였다. 덴시토메트리에 의한 분석은 50 내지 500 ng/레인의 BSA 표준 곡선을 사용하여 각각의 단백질의 20 pg/레인을 실행하는 것에 의해 실시하였다. 모든 샘플에서, 최대 오염은 3%에 도달하였다(즉, 97% 순도).

[0288] **감미 평가**

[0289] 전문적 관능 패널은 먼저 0 내지 100의 척도(크기 추정)로 당 용액을 보정하였던 패널리스트를 포함하며, 0=전혀 달지 않고, 100=매우 달다. 보정 후, 시식자는 보정된 시험 프로토콜에 따라 동일한 척도에서 시험된 샘플을 등급화하였다. 수크로스에 대한 선형 척도는 2° Bx, 4° Bx, 6° Bx, 및 8° Bx의 농도로 얻었다.

[0290] Brix(Bx) = gr/100 ml.

[0291] 초기의 감미 평가는 선택된 역가 X4000로 각각의 시험에서 6° Bx의 당, DM09, 및 신규 선택된 DM을 비교하여 실시하였다. 모든 희석은 오직 물로 수행하였다. 대조군으로서의 6° Bx 수크로스 및 DM09를 사용하여 여러 가지 경우에 대해 전문가 패널에 의해 샘플을 평가하였다(도 1).

[0292] **DSF 및 DSC 분석 - 열 감도**

[0293] 상대적 Tm은 Nanotemper Prometheus를 사용하여 시차 주사 형광 측정법(DSF)에 의해 결정하였다. DSF는 단백질 안정성 및 응집의 용이하고, 신속하고, 정확한 분석 방법이다. DSF는 단백질 내의 트립토판 및 티로신 잔기의 형광에서의 변화를 검출한다. 트립토판 및 티로신 잔기의 형광은 이들의 인근 환경에 크게 의존한다. 단백질 배좌에서의 변화는 형광 변화로 반영될 것이다. 형광 비율(330/350)의 1차 도함수를 사용하여 변곡점을 결정한다. 2차 리포터 형광단이 필요하지 않기 때문에, 단백질 용액을 완충액 조성물과 독립적으로 그리고 250 mg/ml 내지 10 μg/ml의 농도 범위에 걸쳐 분석할 수 있다. DM13 내지 DM33을 10 mM 인산염 완충액 pH 7 중의 0.5 mg/ml의 농도로 분석하였다.

[0294] 표 4는 개질 단백질 DM13 내지 DM33의 특성을 요약하고 있다. 결과는 단백질 감미 및 열 안정성을 제어하는 데 몇몇의 아미노산의 역할을 나타낸다. E2, E23, 및 Y65 외에, 위치 70에서 류신을 이소류신으로 치환하는 것은 Tm을 2℃만큼 증가시켰다. 안정성은 위치 36에서 라이신을 트레오닌으로 치환함으로써 추가로 증가되지만, 이러한 치환은 또한 단백질 감미의 감소를 초래하였다. 4개의 아미노산의 루프를 수득하는 루프 설계는 약 7 내지 10℃의 Tm의 증가로 표시되는 증가된 안정성에 이르게 하였다.

[0295] [표 4]

개질 단백질 DM13 내지 DM33 의 특성의 요약:
Tm(℃) 구조적 열 안정성은 시차 주사 형광 측정법(DSF)에 의해 결정된 변곡점에 따라 추정한다. 감미 수준은 DM09 와 비교하여 수 중에 희석된 1:4000 의 역가를 기준으로 6°Bx 수크로스 당량에서 평가하였다.

	E2	E23	N35	K36	Y65	L70	루프	Tm	DM09 에 대한 감미 강도(1:4000)
MNEI	-	-	-	-	-	-		71.5	32.5
DM09	N	A	-	-	R	-		82.6	75.9
DM13	N	V	-	-	K	I		84.6	77.7
DM14	N	A	-	-	R	I		84.1	72.9
DM15	N	-	-	-	K	I		74.2	83.1
DM16	N	V	-	T	K	I		86.2	23.3
DM17	N	A	-	T	R	I		86	21.7
DM18	N	-	-	T	K	I		75.3	28.8
DM19	N	A	T	T	R	I		85	17.3
DM20	N	-	T	T	R	I		79.9	34.6
DM21	-	-	T	T	R	I		65.4	18.3
DM22	N	-	-	T	R	I		73	52.8
DM23	-	-	-	T	R	I		73.2	21.1
DM24	N	A	T	-	R	I		82.6	81.5
DM25	N	I	-	-	R	-			66.1
DM26	-	-	-	-	K	I			
DM27	N	V	-	-	R	-		80.1	72.2
DM28	N	A	-	-	R	-	4 량체	91	76.9
DM29	-	-	-	-	-	-	4 량체		---
DM30	N	I	-	-	R	I		82.4	79.6
DM31	N	A	-	-	R	I	4 량체		74.6
DM32	N	V	-	-	K	I	4 량체		75.0
DM33	N	V	-	T	K	I	4 량체		---

[0296]

[0297] 결론: Tm 및 감미 수준에 대한 특정 위치의 효과

[0298] **E2- N**으로 치환 => Tm 및 감미에서의 증가(DM23에 대한 DM22 또는 DM21에 대한 DM20의 비교).

[0299] **E23- A 또는 V**로 치환 => Tm에서의 증가(DM15에 대한 DM13 또는 DM22에 대한 DM17의 비교). 감미에 대한 뚜렷한 효과는 없음(다른 치환을 바탕으로).

[0300] **E23- A 대 V**로 치환 => (DM27에 대한 DM09의 비교).

[0301] **E23- I**로 치환 => Tm에서의 증가(DM15에 대한 DM13 또는 DM22에 대한 DM17의 비교). 감미에 대한 뚜렷한 효과는 없음.

[0302] **N35- T**로 치환 => 각각의 매개변수에 대한 뚜렷한 영향 없음.

[0303] **K36- T**로 치환 => Tm에서의 증가, 감미에서의 강한 감소(DM17에 대한 DM14, DM14에 대한 DM24, 또는 DM16에 대한 DM13의 비교).

[0304] **Y65- R 대 K**로 치환 => (DM27에 대한 DM08의 비교).

[0305] **L70- I**로 치환 => Tm에서의 약간의 증가, 감미에 대한 뚜렷한 효과는 없음(DM14에 대한 DM09 또는 DM13에 대한 DM08의 비교).

[0306] 루프 설계 - E50, F52, R53의 결실 => Tm에서의 큰 증가, 감미에 대한 뚜렷한 효과는 없음

[0307] **실시예 3: 모넬린 설계자 단백질 DM13에 대한 단맛 강도 및 안정도의 관능 평가**

[0308] MNEI(도 2a)와 비교한 DM13(도 2b), DM28(도 2c), 및 DM31(도 2d)의 감미 강도의 용량 반응을 실시하였다. 패널리스트는 먼저 0 내지 100의 척도(크기 추정)로 당 용액을 보정하였으며, 0=전혀 달지 않고, 100=매우 달다. 수크로스에 대한 선형 척도는 2° Bx, 4° Bx, 6° Bx, 및 8° Bx의 농도로 얻었다. Brix(Bx) = gr/100 ml. 보정 후, 시식자는 보정된 시험 프로토콜에 따라 동일한 척도에서 증가된 농도의 시험된 샘플을 등급화하였다.

[0309] 도 2에 의해 입증된 바와 같이, DM13, DM28, 및 DM31은 MNEI보다 4배 더 달다.

[0310] **95℃에서 30초 동안 완충액 시트레이트 중의 열 처리**

[0311] 완충액 시트레이트(pH=3)를 thermomix에서 95℃로 예열하였다. 95℃에서, DM13(5° Bx 이소-감미 농도)을 완충액 용액에 첨가하고, 이 온도에서 30초 동안 유지하였다. 30초 후, 용액을 즉시 냉동기에서 냉각시켰다.

[0312] 전문가 패널(n=15)은 생성물을 시식하고, 0 내지 100의 척도로 감미 강도를 평가하였다. 각각의 처리된 생성물

은 기준물(가열 없는 동일한 용액)과 비교하여 시식되었다. 모든 생성물은 코드 번호로 제공되었다. 도 4에 나타낸 바와 같이, DM13은 95℃에서 30초 동안 완충액 시트레이트 중에 안정하다.

[0313] **90℃에서 10분 동안 완충액 시트레이트 중의 열 처리**

[0314] 완충액 시트레이트(pH=3)를 thermomix에서 90℃로 예열하였다. 90℃에서, DM13(5° Bx 이소-감미 농도)을 완충액 용액에 첨가하고, 이 온도에서 따라서 1분, 3분, 및 10분 동안 유지하였다.

[0315] 관련 시간 후에, 용액을 즉시 냉동기에서 냉각시켰다.

[0316] 전문가 패널은 생성물을 시식하고, 0 내지 100의 척도로 감미 강도를 평가하였다. 처리된 생성물은 기준물(가열 없는 동일한 용액)과 비교하여 시식되었다. 모든 생성물은 코드 번호로 제공되었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, DM13은 90℃에서 10분 동안 완충액 시트레이트 중에 안정하다.

[0317] **21℃ 및 32℃에서의 8주 후의 DM13의 감미 안정성**

[0318] DM13의 저장 수명 안정성을 완충액 시트레이트(0.113% 시트르산, 0.016% 트리나트륨 시트레이트, 99.9% 물) 중에 21℃ 및 32℃에서 4주 및 8주 동안 시험하였다. DM13을 5 Brix 당량(역가 1:4000)으로 첨가하였다.

[0319] 처리된 생성물은 전문가 패널에 의해 시식되고, 신선한 용액과 비교하였다. 도 5a 및 도 5b에 나타낸 바와 같이, DM13은 8주 동안 두 온도 모두에서 안정하다.

[0320] **실시예 4: 설계자-MNEI(DM) 단백질을 갖는 케첩 및 플레인 요거트 제형**

[0321] DM 단백질을 갖는 케첩 제형은 표 5에 제시되어 있다.

[0322] [표 5]

DM09, DM28, 및 DM31 기반 케첩 제형(일반적 케첩과 비교하여 69%의 첨가된 당 감소)

성분[%]	DM09 가짐	DM28 가짐	DM31 가짐
물(용매)	34.6	34.8	34.3
토마토 농축물[22°Bx](베이스 성분)	48	48	48
당 벌크(감미료 & 벌크화제)	4	4	4
DM09(5.14 mg/ml) / DM28(9.6 mg/ml) / DM31(3.62 mg/ml) *	0.614	0.378	0.871
이눌린(오라프티 HIS(orafti HIS))(벌크화제)	7	7	7
식초(향미료)	4.5	4.5	4.5
소금(향미료)	1	1	1
향신료(케첩용 키트)(향미료)	0.04	0.04	0.04
잔탄(증점제)	0.25	0.25	0.25

* 단백질 용액 농도에 따른 변화

[0323]

[0324] DM 단백질을 갖는 요거트 제형은 표 6에 제시되어 있다.

[0325] [표 6]

DM09, DM28, 및 DM31 기반 요거트 제형(일반적 충분한 당의 요거트와 비교하여 33%의 첨가된 당 감소)

충분한 당			중량		
요거트	3% 지방,	100	gr	90%	당 감소% **0%**
딸기 퓨레	보이론(Boiron),	6.7	gr	6%	
수크로스	당	5	gr	4%	
		111.7		100%	

DM09(-33%)			중량		
요거트	3% 지방,	100	gr	91%	당 감소% **33%**
딸기 퓨레	보이론,	6.7	gr	6%	
수크로스	당	3.3	gr	3%	
DM09	(5.14 mg/ml)	0.376	ml	0.3%	
		110.4		100%	

DM28(-33%)			중량		
요거트	3% 지방,	100	gr	91%	당 감소% **33%**
딸기 퓨레	보이론,	6.7	gr	6%	
수크로스	당	3.3	gr	3%	
DM28	(9.6 mg/ml)	0.231	ml	0.2%	
		110.2		100%	

DM31(-33%)			중량		
요거트	3% 지방,	100	gr	91%	당 감소% **33%**
딸기 퓨레	보이론,	6.7	gr	6%	
수크로스	당	3.3	gr	3%	
DM31	(3.62 mg/ml)	0.53	ml	0.5%	
		110.5		100%	

[0326]

[0327] **시험 방법 - 맛 단백질의 전문가 패널**

[0328] 모든 관능 평가는 분석적 식별을 위해 숙련된 전문가 패널을 사용하여 결정하였다. 관능 전문가 패널은 잠재적 시식자의 스크리닝 과정에 의해 확립되었다. 스크리닝 시험을 ISO 표준(IS 8586-1)에 따라 실시하고, 관능 감도, 일관성, 시식자의 관능 기억을 시험하였다. 패널을 잘 숙련시키고, 보정한다. 선택된 패널을 정기적으로 숙련시켜서 고성능 결과물을 유지한다.

[0329] **케첩 및 플레인 요거트 시제품에 대한 관능 프로파일 - 시험 절차:**

[0330] 각각의 카테고리(케첩/플레인 요거트)에 대해, 관능 어휘를 전문가 패널에 의해 결정하였다. 카테고리로부터의 넓은 범위의 생성물을 시식하고, 카테고리를 설명하는 모든 관련 관능 속성을 모아서 관능 어휘를 구축하였다. 제품을 가장 잘 설명하기 위해 가능한 한 다양한 언어 사용.

[0331] 관능 어휘를 가진 후, 설문지에 생성물을 설명하는 데 사용될 주요 속성을 선택.

[0332] 케첩용 및 플레인 요거트용 관능 프로파일 구축: 패널리스트는 용어집에서 선택한 모든 속성에 걸쳐 고정된 기준점(0)을 갖는 양방향 척도(-3 내지 +3)로 기준물에 대한 각각의 시험된 생성물을 평가하였다. 시험된 생성물은 특정 속성에 대해 기준물보다 "더 높게" 평가될 때(예를 들어, 더 달고, 더 진하고 등), 양의 등급(+1, +2, 또는 +3)을 얻고, 특정 속성에 대해 기준물보다 "더 적게" 평가될 때(예를 들어, 덜 달고, 덜 진하고 등), 이는 음의 등급(-1, -2, 또는 -3)을 얻었다. 속성 전 및 사이에, 시식자는 이들의 입을 미네랄수로 헹구고, 무염 크래커 및 오이를 먹고, 물을 다시 마시도록 요청되었다.

[0333] **결과**

[0334] **케첩 시제품**

[0335] 도 6에서 입증된 바와 같이, 첨가된 당의 69% 감소를 갖는 케첩 시제품은 DM09를 갖는 케첩 시제품과 비교하여 덜 달고, 더 시고, 더 짜고, 혀에서의 아린감이 더 강하다.

[0336] 도 7은 첨가된 당의 69% 감소를 갖는 케첩 시제품이 충분한 당을 갖는 케첩 시제품과 비교하여 덜 달고, 더 시고, 더 옅은 색상을 갖는 것을 보여준다.

[0337] DM09를 갖는 케첩(첨가된 당의 69% 감소)은 충분한 당의 케첩 시제품과 매우 유사한 관능 프로파일을 갖는 것이 입증되었다(도 8).

[0338] 도 9는 DM28을 갖는 케첩이 DM09를 갖는 케첩과 비교하여, 더 "늦은 개시" 및 더 높은 점착성을 갖는 것을 제외하고, 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 입증한다.

[0339] 도 18은 DM031을 갖는 케첩(첨가된 당의 69% 감소)이 DM09를 갖는 케첩의 관능 프로파일과 매우 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 입증한다.

[0340] 1달의 저장 수명 후에, DM09를 갖는 케첩이 이의 감미를 잃지 않는다. 제품에 발생하는 변화는 1달의 저장 수명 이후 케첩에 대해 전형적이다(더 짙은 색상, 더 시즈닝되고, 더 시고, 더 진하고, 덜 부드러운 질감)(도 10).

[0341] **요거트 시제품**

[0342] 도 11에서 입증된 바와 같이, 첨가된 당의 33% 감소를 갖는 플레인 요거트는 DM09 및 첨가된 당의 33% 감소를 갖는 플레인 요거트보다 덜 달다.

[0343] 도 12는 DM09를 갖는 플레인 요거트(첨가된 당의 33% 감소)가 충분한 당 요거트 시제품과 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 입증한다.

[0344] 도 13에 나타낸 바와 같이, DM28을 갖는 딸기 요거트는 약간 더 신 것을 제외하고, DM09를 갖는 딸기 요거트와 유사한 관능 프로파일을 갖는다.

[0345] 도 19는 DM31을 갖는 딸기 요거트가 DM09를 갖는 딸기 요거트와 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 입증한다.

[0346] 도 14는 2주의 저장 수명 후에, DM09를 갖는 플레인 요거트가 DM09를 갖는 신선한 플레인 요거트와 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 입증한다.

[0347] **실시예 5: 감미료의 조합**

[0348] **감미료에 대한 관능 프로파일 - 시험 절차:**

[0349] 다수의 감미료 및 감미료 조합을 스크리닝하였다. 최적의 결과를 갖는 감미료 조합은 스테비아 대 스테비아+DM09 및 나한과와 스테비아의 조합 대 나한과, 스테비아, 및 DM09이었다. 각각의 감미 용액은 5° Bx와 동등한 최종 농도였다(2개의 감미료의 조합에서, 각각의 감미료는 2.5° Bx와 동등한 농도이고, 3개의 감미료의 조합에서, 각각의 감미료는 1.7° Bx와 동등한 농도였음).

[0350] 설문지에서 관능 속성은 패널리스트의 예비 시식에 의해 결정하였다.

[0351] 각각의 감미료 용액에 대한 관능 프로파일 구축: 패널리스트는 선택된 속성에 걸쳐 고정된 기준점(0)을 갖는 양방향 척도(-3 내지 +3)로 기준물(DM09/DM28을 갖지 않는 감미료)에 대해 각각의 시험된 용액(감미료+DM09/DM28)을 평가하였다. 시험된 생성물은 특정 속성에 대해 기준보다 "더 높게" 평가될 때(예를 들어, 더 달고, 더 여운이 길고 등), 양의 등급(+1, +2, 또는 +3)을 얻고, 특정 속성에 대해 기준보다 "더 적게" 평가될 때(예를 들어, 덜 달고, 여운이 덜 긴 맛 등), 이는 음의 등급(-1, -2, 또는 -3)을 얻었다.

[0352] 시식 전 및 사이에, 시식자는 이들의 입을 미네랄수로 헹구고, 무염 크래커 및 오이를 먹고, 물을 다시 마시도록 요청되었다.

[0353] **레몬 착향 음료 시제품**

[0354] DM 단백질을 갖는 레몬 착향 음료의 제형은 표 7 및 표 8에 제시되어 있다.

[0355] [표 7]

DM09 기반 레몬 착향 음료
10 Bx - 50%의 첨가된 당 감소

			%
	물	850 ml	93.99
	레몬 향미료	1.7 g	0.19
5 Bx	DM09(5.14 mg/ml)	0.845 ml	0.09
	시트르산	0.85 g	0.09
	당	51 g	5.64
		904.395	100.00

[0356]

[0357] [표 8]

DM09 및 스테비아 기반 레몬 착향 음료(10°B, 50%의 첨가된 당의 감소)

	스테비아를 갖는 적용(5°Bx 당량)	스테비아+DM09 를 갖는 적용(각각 2.5°Bx 당량)
물(g)	90-112	90-112
레몬 향미료(g)	0.18-0.224	0.18-0.224
DM09(5.14 mg/ml)(ml)	—	0.046-0.056
Reb M(mg)	18-22.4	9-11.2
시트르산(g)	0.09-0.112	0.09-0.112
당(g)	5.4-6.7	5.4-6.7

[0358]

[0359] **결과**

[0360] 도 15에 나타낸 바와 같이, 스테비아 및 DM09를 갖는 수용액은 동일한 감미 수준 당량으로 스테비아를 단독으로 갖는 수용액보다 더 달다. 도 16은 나한과, 스테비아, 및 DM09의 조합을 갖는 수용액이 동일한 감미 수준 당량으로 나한과 및 스테비아를 단독으로 갖는 수용액과 비교하여 더 짧은 "늦은 개시"로 더 단 것을 입증한다.

[0361] 도 17에 나타낸 바와 같이, 레몬 착향 음료(스테비아를 갖는 50%의 첨가된 당 감소(5° Bx 당량))는 스테비아 및 DM09(각각 2.5° Bx 당량)와 매우 유사한 관능 프로파일을 갖는다.

[0362] **실시예 6: 설계자-모넬린(DM) 단백질을 갖는 추잉검 시제품**

[0363] 추잉검은 일반적으로 검 베이스, 연화제, 감미료, 및 향미료로 구성된다. 검 베이스는 추잉검에 그 "저작"을 제공하는 것이다. 이는 검에 소기의 질감을 제공하는 식품 등급 중합체, 왁스, 및 연화제의 조합으로 제조된다.

[0364] DM 단백질을 갖는 추잉검의 제형은 표 9에 제시되어 있다.

[0365] [표 9]

DM09 기반 추잉검

재료	백분율
소르비톨	13-17%
만니톨	9-14%
시럽 만니톨	3-8%
아세설팜 k	0.05-0.5%
수크랄로스	0.05-0.5%
검 베이스	14-19%
글리세린	2-4%
향미료	1-3%
대두 렉시틴	0.03-0.08%
부틸화 하이드록시아니솔	0.4-0.9%
물	2-5%
말토덱스트린	38-45%
DM09	0.01-0.03%

[0366]

[0367] **제조 설명:**

[0368] 먼저, 검 베이스를 가열하고, 용융된 매스(mass)를 혼합기 내에 배치한다.

[0369] 다음으로, 성분 1 내지 13을 지속적 혼합 동안 점진적으로 첨가한다.

[0370] 이어서, 매스를 혼련하여 검을 평활화, 형성, 및 성형한다.

[0371] 당알코올 및 인공 감미료를 함유하는 기준 추잉검 샘플을 감미 단백질이 첨가되었던 동일한 양의 당알코올 및 인공 감미료를 갖는 추잉검 샘플과 비교한다.

[0372] 0.01 내지 0.05 중량%의 감미 단백질을 배합표에 첨가하였다.

[0373] 감미 단백질의 역가는 4000 내지 8000이고, 48 내지 56 brix와 동등하다.

[0374] **관능 패널:**

[0375] 추잉검에 대한 관능 프로파일을 분석적 식별을 위해 숙련된 전문가 패널을 사용하여 구축하였다.

[0376] 패널리스트는 설문지에서의 모든 속성에 걸쳐 각각의 시험된 추잉검 생성물을 평가하였다. 속성을 30초, 2분, 및 4분 후에 측정하였다.

[0377] 생성물 전 및 사이에, 시식자는 이들의 입을 미네랄수로 헹구고, 무염 크래커 및 오이를 먹고, 물을 다시 마시도록 요청되었다.

[0378] **결과**

[0379] 도 20에 나타낸 바와 같이, DM09를 갖는 추잉검은 30초의 저작 후에 DM09가 없는 추잉검보다 더 달다.

[0380] **실시예 7: 설계자-MNEI(DM) 단백질을 갖는 땅콩 버터 시제품**

[0381] DM 단백질을 갖는 땅콩 버터의 제형은 표 10에 제시되어 있다.

[0382] [표 10]

DM09 기반 땅콩 버터

성분	충분한 당	50%의 당 감소
땅콩 버터 페이스트(g)	80-100	80-100
지방(g)	1-3	1-3
NaCl(g)	0.1-0.3	0.1-0.3
당(g)	4-6	1-3
말토덱스트린(g)	-	2-4
건조된 DM09(g)	-	0.0006-0.0008
섬유(g)	-	1-3
렉시틴(g)	0-10	0-10

[0383]

[0384] 혼합물이 균질할 때까지 모든 성분을 혼합한다.

[0385] **결과**

[0386] 도 21에 나타낸 바와 같이, DM09 및 50%의 당 감소를 갖는 땅콩 버터는 충분한 당의 땅콩 버터의 관능 프로파일과 매우 유사한 관능 프로파일을 갖는다.

[0387] **실시예 8: 설계자-MNEI(DM) 단백질을 갖는 아이스 커피 시제품**

[0388] DM 단백질을 갖는 아이스 커피의 제형은 표 11에 제시되어 있다.

[0389] [표 11]

DM09 기반 아이스 커피

성분	
커피(g)	0.5-2
당(g)	1-3
말토덱스트린(g)	4-6
DM 09(g)	0.002-0.003
우유(g)	92

[0390]

[0391] 커피, 당, 말토덱스트린, 및 DM09를 조합된 혼합물로 혼합한다. 이어서, 혼합물이 균질할 때까지, 7 내지 9 g의 혼합물을 89 내지 94 g의 우유와 혼합한다.

[0392] **결과**

[0393] 도 22에 나타낸 바와 같이, DM09를 갖는 아이스 커피(70%의 당 감소)는 DM이 없는 아이스 커피(70%의 당 감소)보다 더 달다.

[0394] **실시예 9: 크랜베리 쥬스 시제품**

[0395] DM 단백질을 갖는 크랜베리 쥬스의 제형은 표 12 내지 표 15에 제시되어 있다.

[0396] [표 12]

DM09 및 스테비아 기반 크랜베리 쥬스(40%의 당 감소)

	백분율	1000 ml
크랜베리 JC 50 Bx	3 - 6	30 - 60(g)
수크로스	4 - 8	40 - 80(g)
DM09 (5.14 mg/ml)	0.08 - 0.24	0.8 -2.4(ml)
Reb M PureCircle	0.0025 - 0.004	0.025 - 0.04(g)
NaCl	0.02 - 0.06	0.2 - 0.6(g)
물	85 - 90	850 - 900(g)
총계	100	1000.061

[0397]

[0398] [표 13]

DM09 및 DM16 기반 크랜베리 쥬스(40%의 당 감소(6oBx))

	백분율	1000 ml
크랜베리 JC 50 Bx	3 - 6	30 - 60(g)
수크로스	4 - 8	40 - 80(g)
DM09(5.14 mg/ml)	0.2 - 0.4	2 -4(ml)
DM16(5.8 mg/ml)	0.08 - 0.14	0.8 - 1.4(ml)
NaCl	0.02 - 0.06	0.2 - 0.6(g)
물	85 - 90	850 - 900(g)
총계	100	1000.1

[0399]

[0400] [표 14]

DM28 기반 크랜베리 쥬스(40%의 당 감소(6°Bx))

	백분율	1000 ml
크랜베리 JC 50 Bx	3- 6	30 - 60(g)
수크로스	4 - 8	40 - 80(g)
DM28(9.6 mg/ml)	0.08 - 0.13	0.8 - 1.13(ml)
Reb M(PureCircle)	0.0028 - 0.0042	0.028 - 0.042(g)
NaCl	0.02 - 0.06	0.2 - 0.6(g)
물	85 -90	850 -900(g)
총계	100	1000.1

[0401]

[0402] [표 15]

DM31 기반 크랜베리 쥬스(40%의 당 감소(6°Bx))

	백분율	1000 ml
크랜베리 JC 50 Bx	3 - 6	30 - 60(g)
수크로스	4 - 8	40 - 80(g)
DM31(3.62 mg/ml)	0.12 - 0.35	1.2 - 3.5(ml)
Reb M(PureCircle)	0.0028 - 0.0042	0.028 - 0.042(g)
NaCl	0.02 - 0.06	0.2 - 0.6(g)
물	85 -90	850 -900(g)
총계	100	1000.061

[0403]

[0404] **결과**

[0405] 도 23은 크랜베리 쥬스(40%의 당 감소, 스테비아, 및 DM09)가 충분한 당의 크랜베리 쥬스와 유사한 감미를 갖는 것을 입증한다. 도 24는 DM28을 갖는 크랜베리 쥬스가 DM09를 갖는 크랜베리 쥬스보다 더 단 것을 입증한다. 도 25는 크랜베리 쥬스(40%의 당 감소, 스테비아, 및 DM31)가 40% 당 감소, 스테비아, 및 DM09를 갖는 크랜베리 쥬스와 유사한 관능 프로파일을 갖는 것을 입증한다.

[0406] **실시예 10: 건조된 크랜베리 및 복숭아 레더 시제품**

[0407] DM 단백질을 갖는 건조된 크랜베리의 제형은 표 16 내지 표 18에 제시되어 있다.

[0408] [표 16]

DM 단백질을 갖는 건조된 크랜베리(50%의 첨가된 당 감소 및 45% 당 + 5% 프룩토스)

	충분한 당 적용(100 g 투입)	**DM 적용(100 g 투입)**
물(g)	28-35	50-75
50 Brix 크랜베리 농축물(g)	4.5-5.5	4-8
DM09(5.14 mg/ml)(ml)	---	1.4-1.8
NaCl(g)	0.03-0.07	0.03-0.07
당(g)	53-72	20-40
프룩토스(g)	---	2 - 5

[0409]

[0410] 크랜베리가 45 내지 60° Bx(충분한 당 적용의 경우), 또는 20 내지 30° Bx(DM 적용의 경우)에 도달할 때까지, 크랜베리를 최대 6시간 동안 1:3의 비율로 투입 시럽 중에 침지시키고, 이어서 이들이 70 내지 86° Bx(충분한 당 적용의 경우), 또는 33 내지 45° Bx(DM 적용의 경우)에 도달할 때까지, 크랜베리를 70 내지 120℃에서 오븐 건조시켰다.

[0411] [표 17]

DM 단백질을 갖는 건조된 크랜베리 시제품(40%의 첨가된 당 감소)

	충분한 당 적용(100 g 투입)	**DM 적용(100 g 투입)**
물(g)	28 - 35	50-61
50 Brix 크랜베리 농축물(g)	4 - 6	4 - 8
DM09(5.14 mg/ml)(ml)	—	1.17-1.43
NaCl(g)	0.03 - 0.07	0.03 - 0.07
당(g)	53 - 72	31 - 45

[0412]

[0413] 크랜베리가 45 내지 60° Bx(충분한 당 적용의 경우), 또는 25 내지 38° Bx(DM 적용의 경우)에 도달할 때까지, 크랜베리를 최대 6시간 동안 1:3의 비율로 투입 시럽 중에 침지시키고, 이어서 이들이 74 내지 84° Bx(충분한 당 적용의 경우), 또는 42 내지 54° Bx(DM 적용의 경우)에 도달할 때까지, 크랜베리를 70 내지 120℃에서 오븐 건조시켰다.

[0414] [표 18]

DM 단백질을 갖는 건조된 크랜베리 시제품(50%의 첨가된 당 감소)

투입 시럽			
		충분한 당	50%의 당 감소
	당(g)	63.5	31.75
	50 Brix 크랜베리 농축물(g)	5	5
	물(g)	31.5	62.5
	DM09(12.97 mg/ml)(ml)	-	0.644
	NaCl(g)	0.05	0.05
총계		100	100
오븐 내에서 2 시간 후 (100 g 의 건조된 크랜베리의 경우)	말토덱스트린(g)	-	1.257
	DM09(g)	-	0.003174

[0415]

[0416] 크랜베리가 45 내지 60° Bx(충분한 당 적용의 경우), 또는 20 내지 30° Bx(DM 적용의 경우)에 도달할 때까지, 크랜베리를 2 내지 6시간 동안 1:3의 비율로 투입 시럽 중에 침지시켰다. 이어서, 크랜베리를 70 내지 120℃에서 오븐 건조시킨다. 크랜베리가 충분한 당 적용의 경우 70 내지 86° Bx, 또는 DM 적용의 경우 33 내지 45° Bx에 도달할 때, 건조가 완료된 것으로 간주한다. 2시간 후, 크랜베리를 오븐으로부터 제거하고, 혼합물(말토덱스트린 & 건조된 DM09)을 건조된 크랜베리 상에 분무하였다(혼합물 분무양은 10%의 첨가된 당과 동등함 - 양은 충분한 당 배합표로부터 계산하였음). 크랜베리를 70 내지 120℃에서 추가의 10 내지 30분 동안의 추가의 건조를 위해 오븐 내로 다시 넣는다.

[0417] DM09를 갖는 복숭아 레더의 제형은 표 19에 제시되어 있다.

[0418] [표 19]

DM-09 를 갖는 복숭아 레더 시제품

성분	복숭아 레더(40 Bx 와 동등한 감미)
복숭아 페이스트	98-100g
시트르산	0.1-0.2 g
DM09(12.3 mg/ml)	0.7-0.9 ml

[0419]

[0420] 복숭아를 박리하고, 씨를 제거하였다. 박리된 복숭아를 식품 프로세서에서 시트르산과 배합하여 부드러운 페이스트로 만들었다. 이어서, DM09를 균질한 배합물에 첨가하였다. 혼합물을 균일한 박막 내로 붓고, 고루 펴 바르고, 건조할 때까지, 탈수기 오븐 내에서 40℃에서 9 내지 10시간 동안 건조시켰다. 건조된 복숭아 레더를 꺼내고, 냉각시켰다. 레더를 롤링하고, 밀폐된 용기 내에 저장하였다.

[0421] **결과**

[0422] 도 26은 건조된 크랜베리(50%의 당 감소 및 DM09)가 건조된 크랜베리(50%의 당 감소)와 비교하여 더 단 것을 입증한다.

[0423] 도 27은 DM09를 갖는 복숭아 레더가 DM09를 갖는 복숭아 레더보다 더 단 것을 입증한다.

[0424] **실시예 11: 설계자-MNEI(DM) 단백질을 갖는 아이스 녹차 시제품**

[0425] DM 단백질을 갖는 아이스 녹차의 제형은 표 20에 제시되어 있다.

[0426] [표 20]

DM09 기반 아이스 차

성분	40%의 당 감소*	40%의 당 감소 + DM09
녹차 추출물**	86-100(g)	86-100(g)
당	4.3-5.3(g)	4.3-5.3(g)
시트르산	0.2-0.3(g)	0.2-0.3(g)
DM09(12.97 mg/ml)	-	0.03-0.04(ml)
Reb-M	-	0.002-0.003(g)

* 충분한 당의 아이스 차는 8 g/100 ml 를 함유한다

** 녹차 추출물은 녹차 백을 95℃에서 1.5 분 동안 수 중에 침지시켜서 제조한다.

[0427]

[0428] **결과**

[0429] 도 28에 나타낸 바와 같이, 40%의 첨가된 당 감소 + DM09 및 스테비아를 갖는 아이스 녹차는 스테비아 없이 40%의 첨가된 당 감소를 갖는 아이스 녹차와 비교하여 더 달다.

[0430] **실시예 12: 설계자-MNEI(DM) 단백질을 갖는 말라비 시제품**

[0431] DM 단백질을 갖는 말라비의 제형은 표 21에 제시되어 있다.

[0432] [표 21]

DM31 기반 말라비 시제품

성분	50%의 당 감소	50%의 당 감소 + DM31
우유	54-66(g)	54-66(g)
크림	22-28(g)	22-28(g)
당	2-3(g)	2-3(g)
옥수수 가루	5-6(g)	5-6(g)
장미수	1-2(g)	1-2(g)
DM31(15.88 mg/ml)	-	0.08-0.1(ml)
물	5-6(g)	5-6(g)

[0433]

[0434] 우유, 크림, 당, 및 장미수를 100℃로 가열하였다. 한편, 옥수수 가루를 물과 혼합하였다. 액체가 100℃에 도달하였을 때, 옥수수 가루를 첨가하고, 혼합하였다. 온도가 60℃로 떨어질 때, DM31을 첨가하고, 혼합하였다. 디저트를 서빙 접시 내에 붓고, 냉각시켰다.

[0435] **결과**

[0436] 도 29에 나타낸 바와 같이, 50%의 첨가된 당 감소 + DM31을 갖는 말라비는 50%의 첨가된 당 감소를 갖는 말라비와 비교하여 더 달다.

[0437] **실시예 13: 시험관내 소화율 연구**

[0438] 소화율 연구의 목적은 소화 이후 위장관에서의 감미료로 사용된 DM 단백질의 거동을 결정하기 위한 것이었다. 시험된 단백질은 대장균(*E. Coli*) BL21(DE3)에서의 정밀 발효에 의해 생성된 DM31 단백질이었다.

[0439] 시험관내 소화율 정적 모델은 INFOGEST 프로토콜(문헌[Nature Protocols 14, 991-1014 (2019)])에 따라 실시하였다.

[0440] 인실리코 알레르기유발성 분석을 소화 모델의 말단에서 얻은 소화된 펩타이드에 대해 수행하였다.

[0441] 소화율 사이클은 경구 소화(M), 위내 소화(G), 및 십이지장 소화관 소화(D)를 포함한다. 사용된 소화 효소: 위 펩신(모의 위액(SGF) - (2,000 U/ml SGF)으로 제조됨), 소화 십이지장 효소는 모의 십이지장액(SDF) - 트립신(100 U/mL SDF) 및 키모트립신(25 U/mL SDF)으로 제조하였다. 양성 대조군은 알려진, 완전히 소화 가능한 단백질, α-락트알부민이었다. 음성 대조군은 단백질이 존재하지 않았다.

[0442] 사용된 샘플 분석: 각각의 소화율 단계에서 단백질 SDS 겔 - 단백질 샘플을 쿠마시 블루를 사용하여 염색된 16.5% SDS PAGE 트리신 단백질 겔 상에서 실행하였다.

[0443] 질량 분석법 펩타이드 식별: 각각의 사이클, G 및 D의 두 번의 반복을 Q-Exactive plus(Thermo)를 사용하여 Smoller Proteomics Center(Technion)에서 LC-MS/MS에 의해 분석하고, DM 서열 및 숙주 미생물(대장균) 데이터베이스에 대해서는 Discover 소프트웨어에 의해 식별하였다.

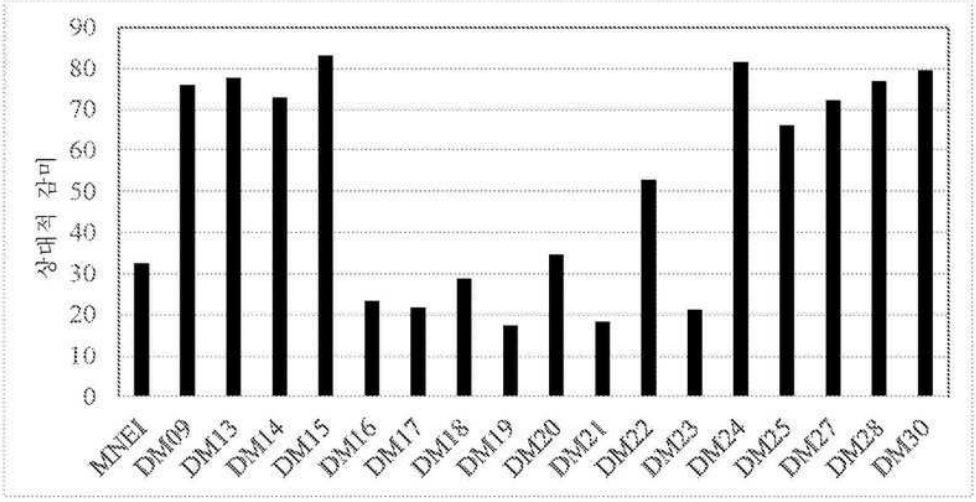
[0444] **결과**

[0445] 도 34에 나타낸 바와 같이, DM31 단백질은 위 단계의 말단에서 부분적으로 소화되고, 십이지장 단계의 말단에서 완전히 소화된다. INFOGEST 프로토콜을 사용한 정적 모델에 의해 얻은 결과는 생리학적 소화율 과정 동안 DM 단백질의 소화율을 분명하게 입증한다.

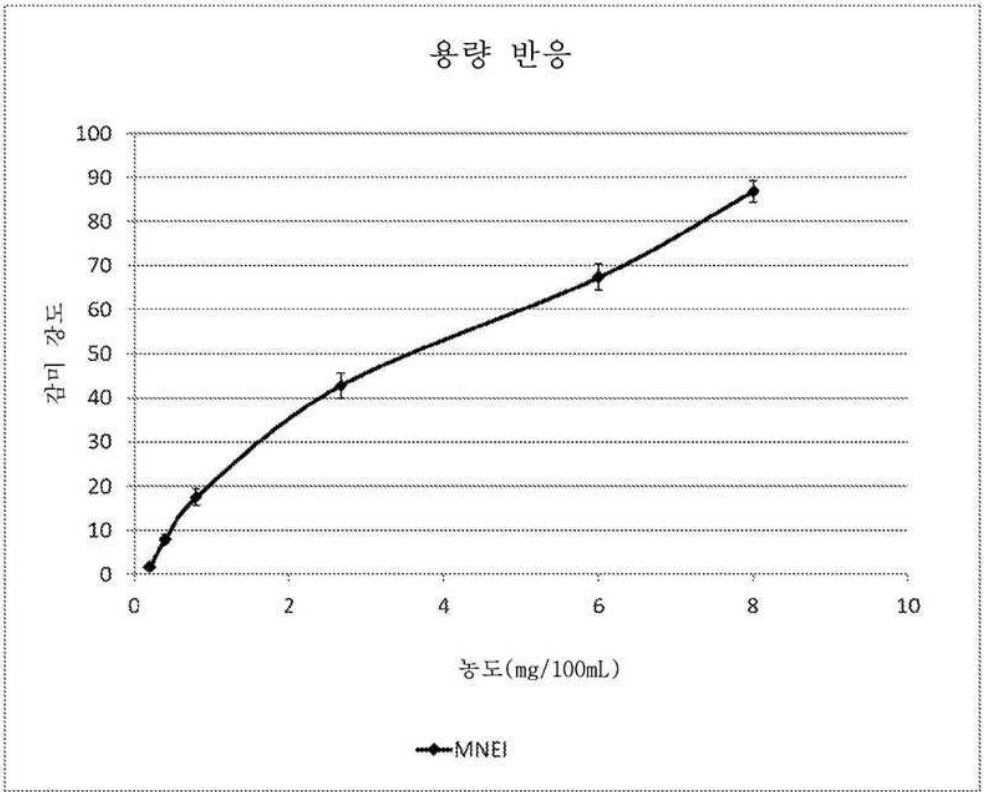
[0446] DM-31 소화 동안, 장 트랙 내에 발생되는 펩타이드는 알레르기유발성 위험을 갖지 않는다. 결과는 DM-31 소화가 임의의 안전 우려와 연관되지 않음을 입증한다.

도면

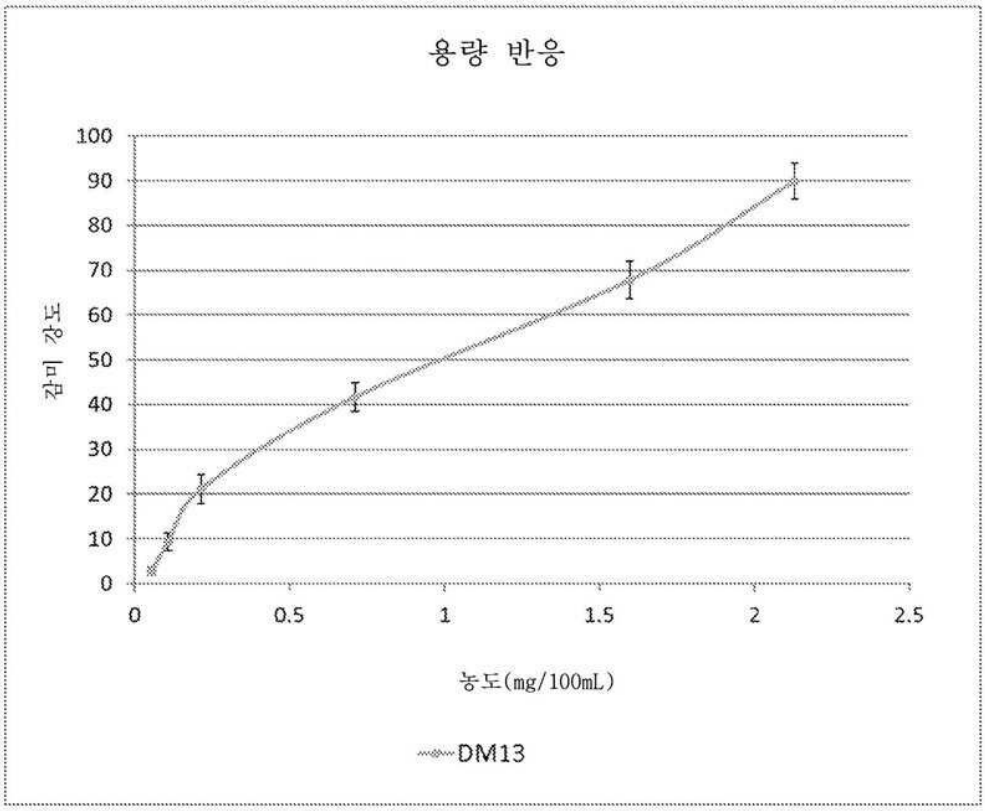
도면1


상대적 감미
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
MNEI
DM09
DM13
DM14
DM15
DM16
DM17
DM18
DM19
DM20
DM21
DM22
DM23
DM24
DM25
DM27
DM28
DM30

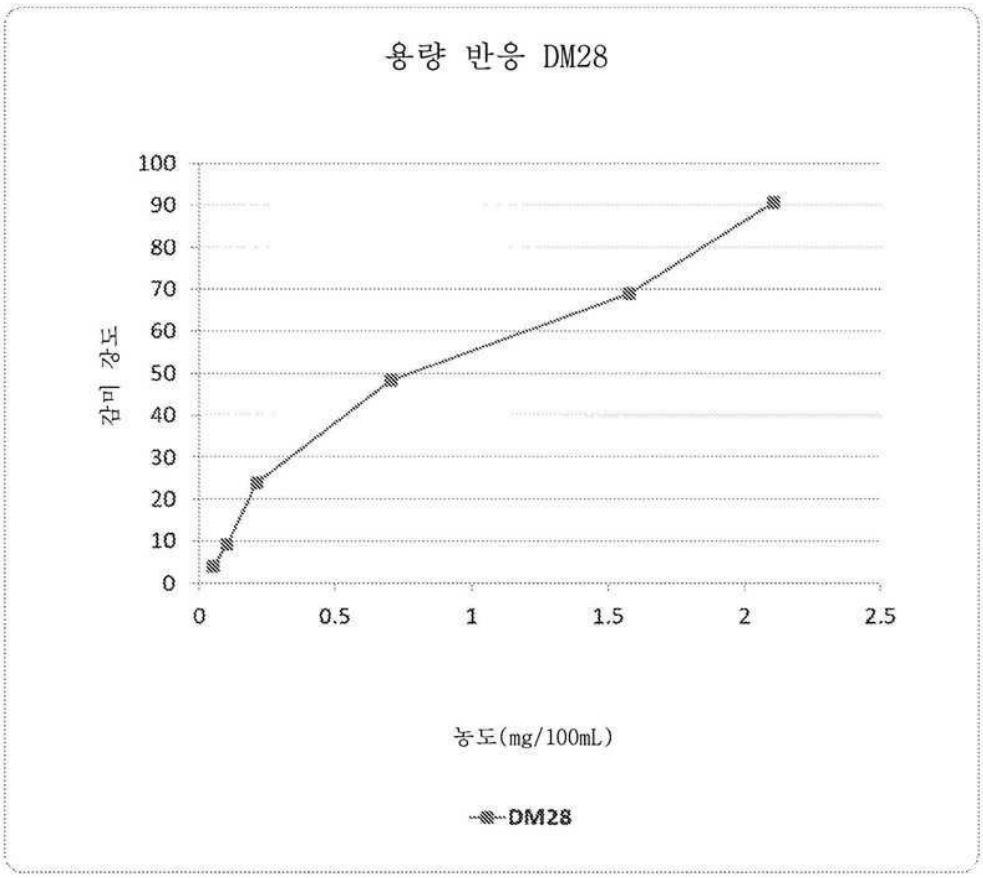
도면2a


용량 반응
감미 강도
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
농도(mg/100mL)
MNEI

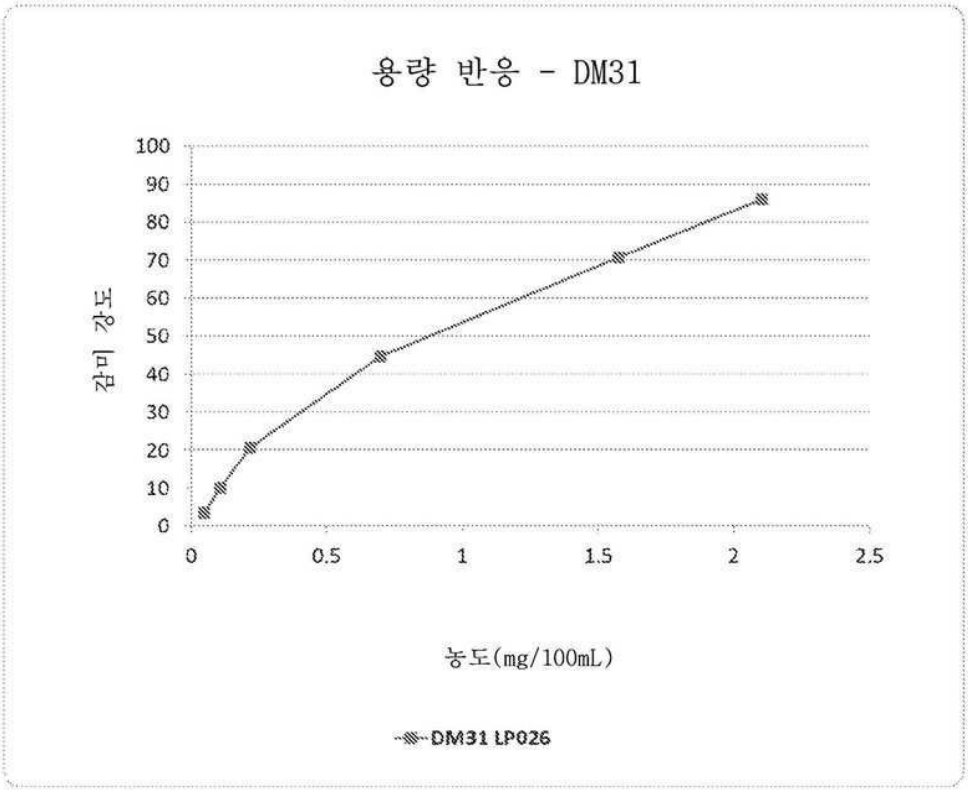
도면2b


용량 반응
감미 강도
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.5
1
1.5
2
2.5
농도(mg/100mL)
DM13

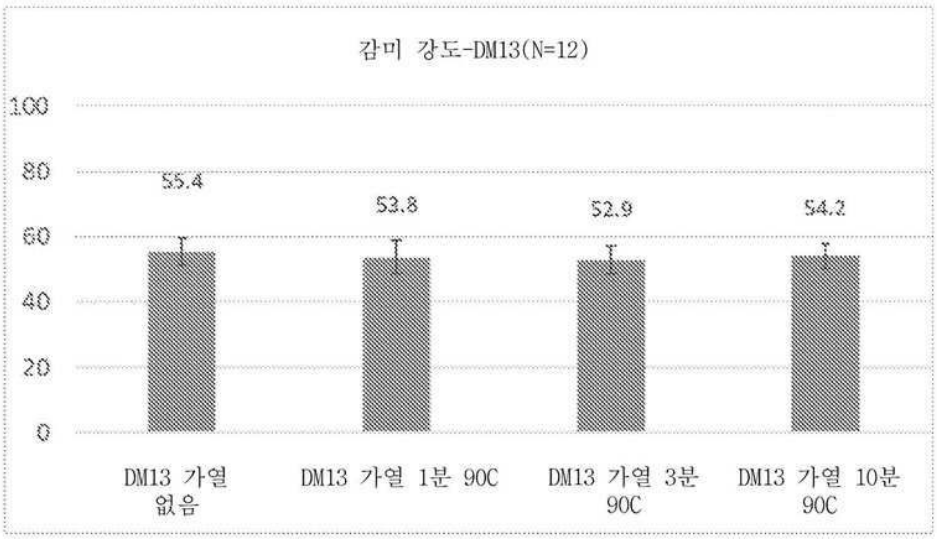
도면2c


용량 반응 DM28
감미 강도
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.5
1
1.5
2
2.5
농도(mg/100mL)
DM28

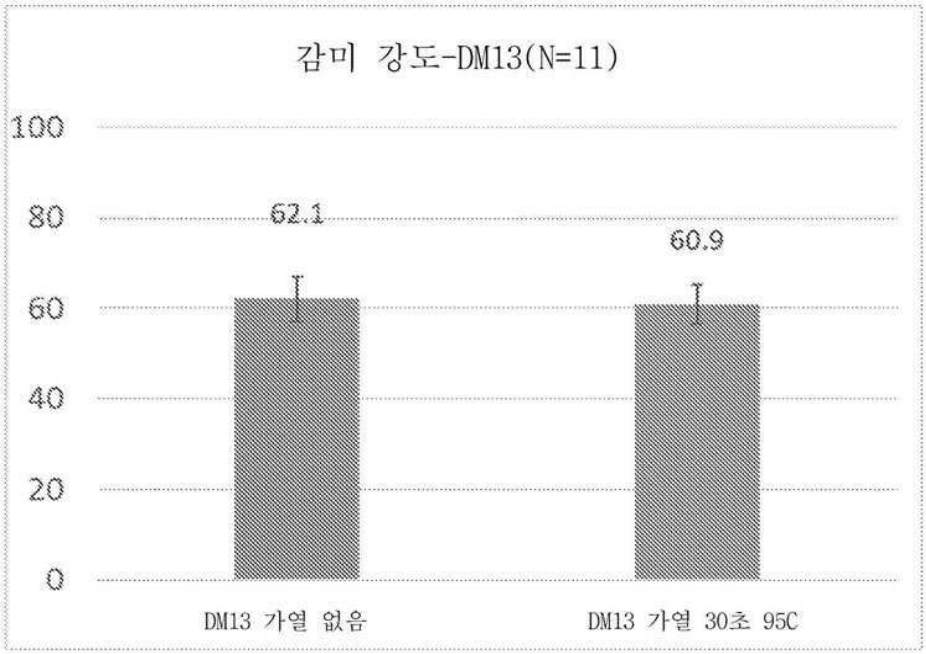
도면2d


용량 반응 - DM31
감미 강도
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.5
1
1.5
2
2.5
농도(mg/100mL)
DM31 LP026

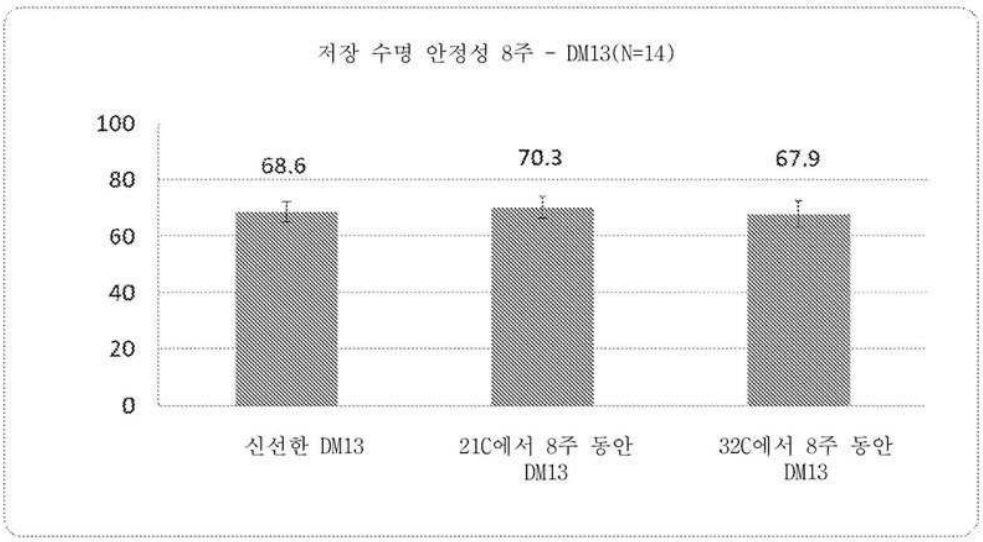
도면3


감미 강도-DM13(N=12)
100
80
60
40
20
0
55.4
53.8
52.9
54.2
DM13 가열 없음
DM13 가열 1분 90C
DM13 가열 3분 90C
DM13 가열 10분 90C

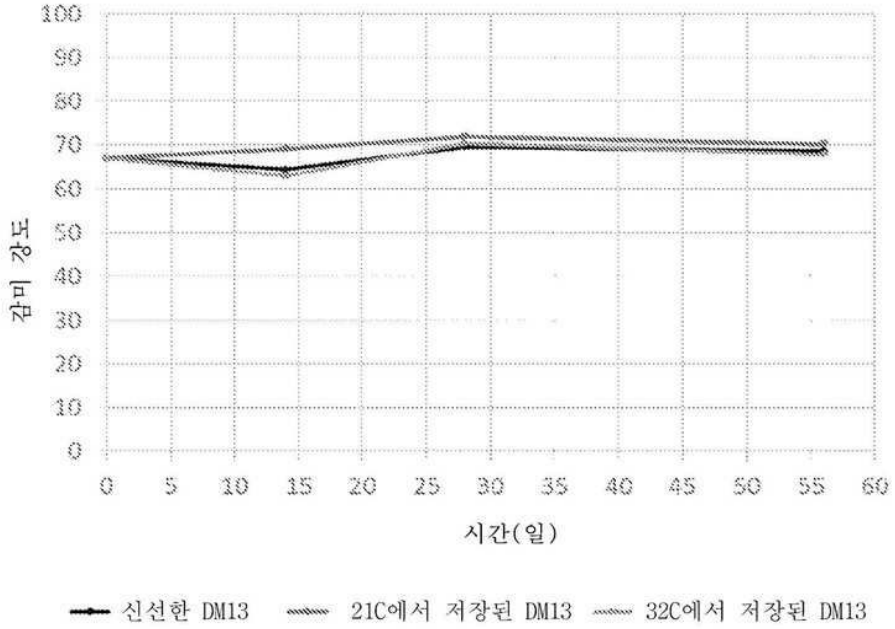
도면4


감미 강도-DM13(N=11)
100
80
60
40
20
0
62.1
60.9
DM13 가열 없음
DM13 가열 30초 95C

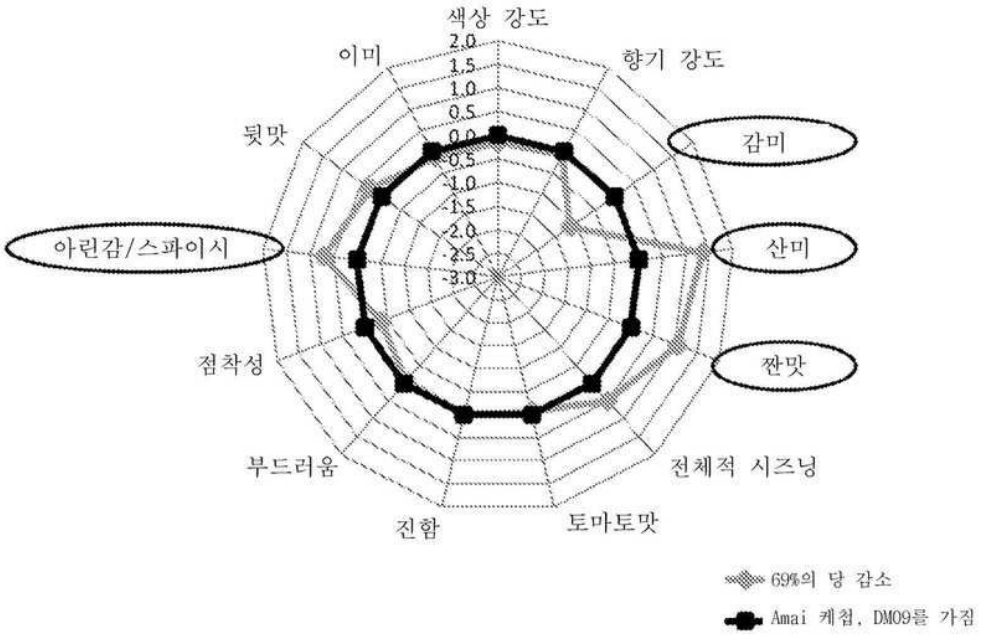
도면5a


저장 수명 안정성 8주 - DM13(N=14)
100
80
60
40
20
0
68.6
70.3
67.9
신선한 DM13
21C에서 8주 동안 DM13
32C에서 8주 동안 DM13

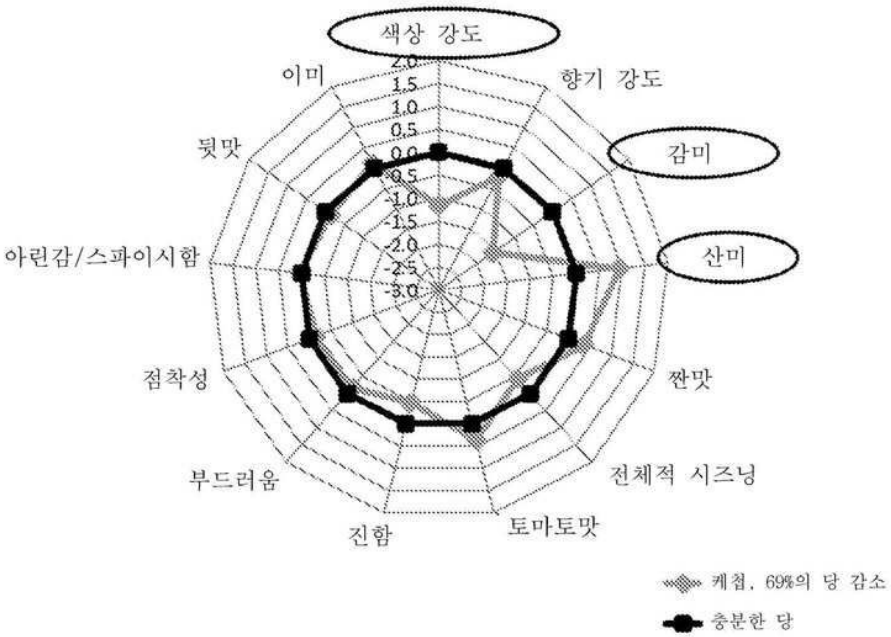
도면5b


감미 강도
시간(일)
신선한 DM13
21C에서 저장된 DM13
32C에서 저장된 DM13

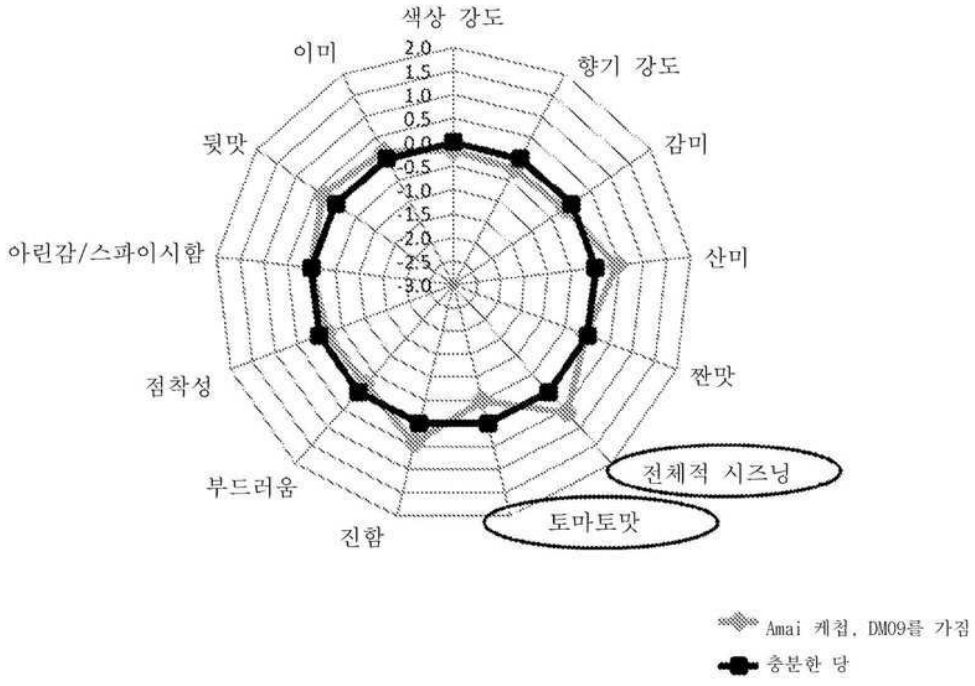
도면6


색상 강도
향기 강도
감미
산미
짠맛
전체적 시즈닝
토마토맛
진함
부드러움
점착성
아린감/스파이시
뒷맛
이미
69%의 당 감소
Amai 케첩, DM09를 가짐

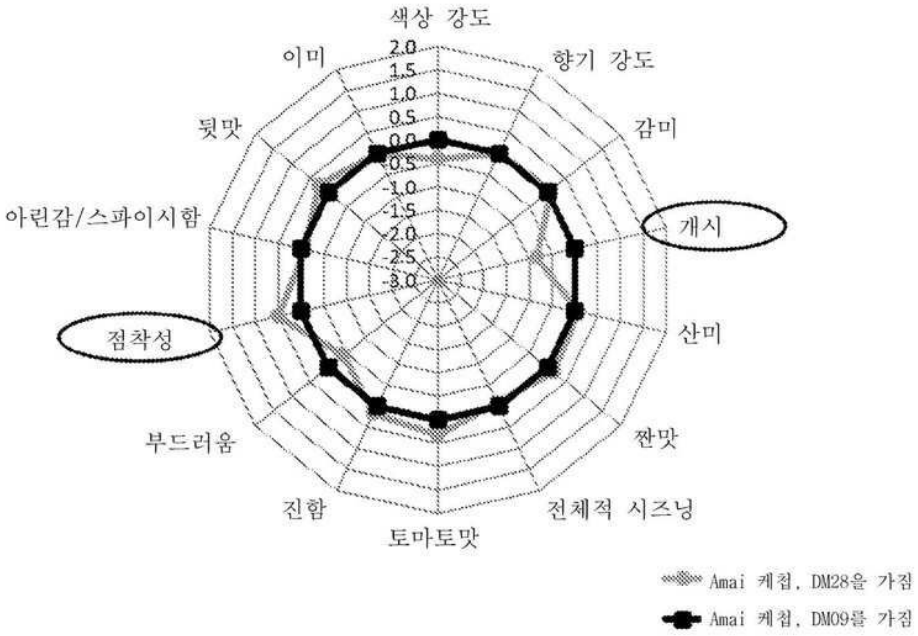
도면7


색상 강도
향기 강도
감미
산미
짠맛
전체적 시즈닝
토마토맛
진함
부드러움
점착성
아린감/스파이시함
뒷맛
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
케첩, 69%의 당 감소
충분한 당

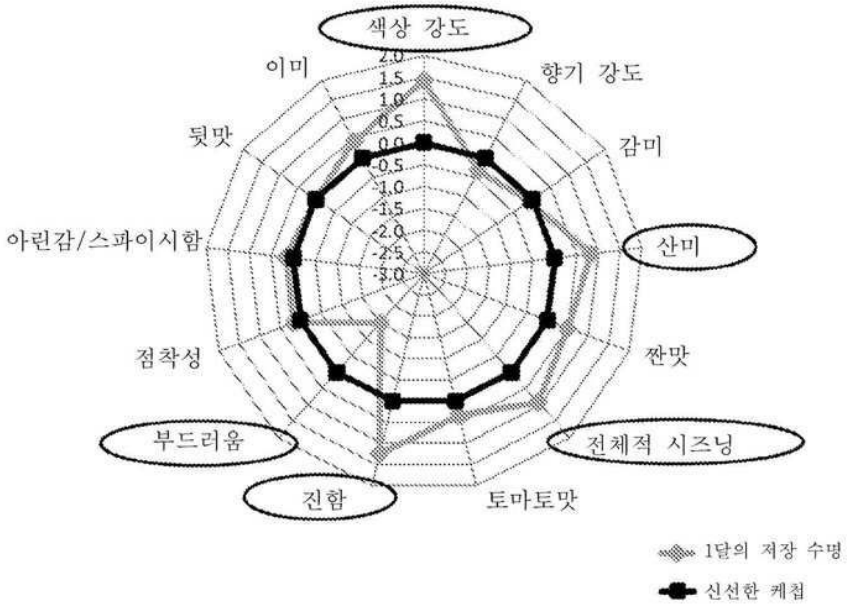
도면8


색상 강도
향기 강도
감미
산미
짠맛
전체적 시즈닝
토마토맛
진함
부드러움
점착성
아린감/스파이시함
뒷맛
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
Amai 케첩, DM09를 가짐
충분한 당

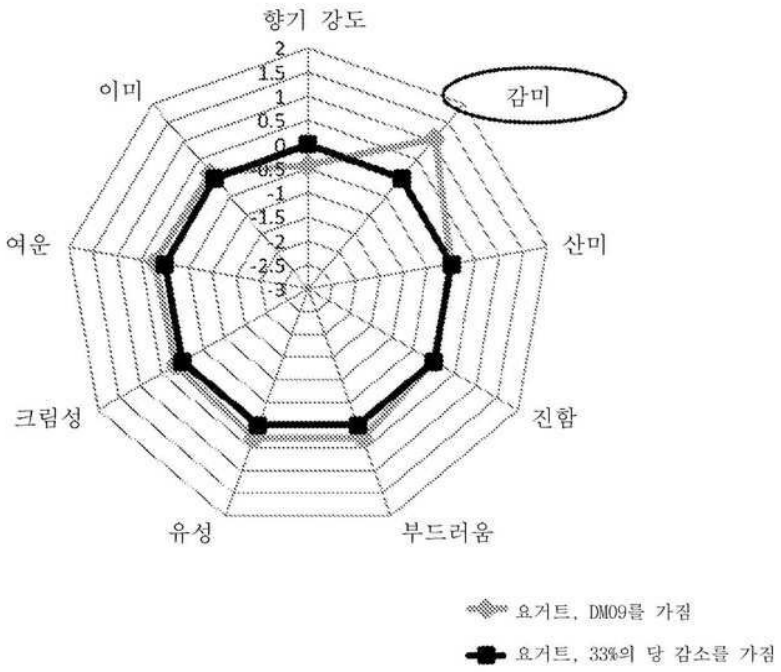
도면9


색상 강도
향기 강도
감미
개시
산미
짠맛
전체적 시즈닝
토마토맛
진함
부드러움
점착성
아린감/스파이시함
뒷맛
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
Amai 케첩, DM28을 가짐
Amai 케첩, DM09를 가짐

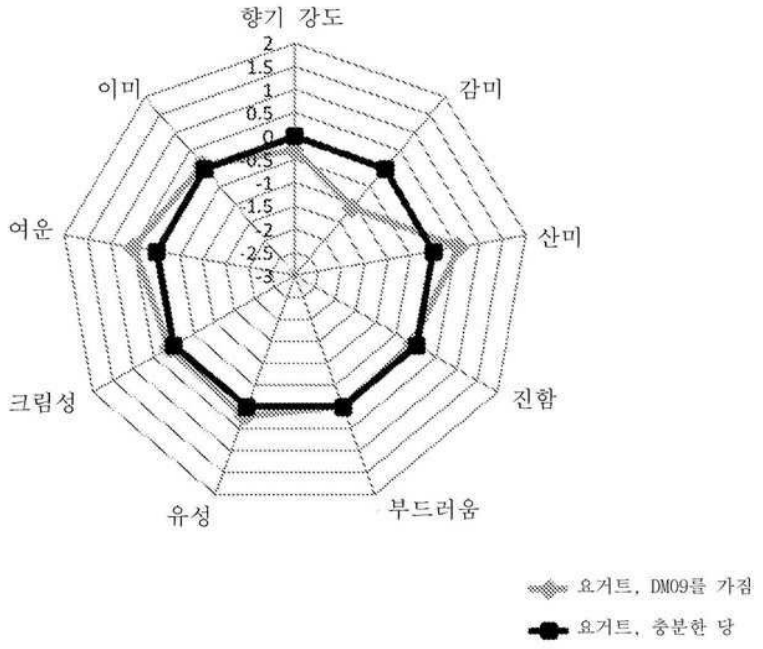
도면10


색상 강도
향기 강도
감미
산미
짠맛
전체적 시즈닝
토마토맛
진함
부드러움
점착성
아린감/스파이시함
뒷맛
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
1달의 저장 수명
신선한 케첩

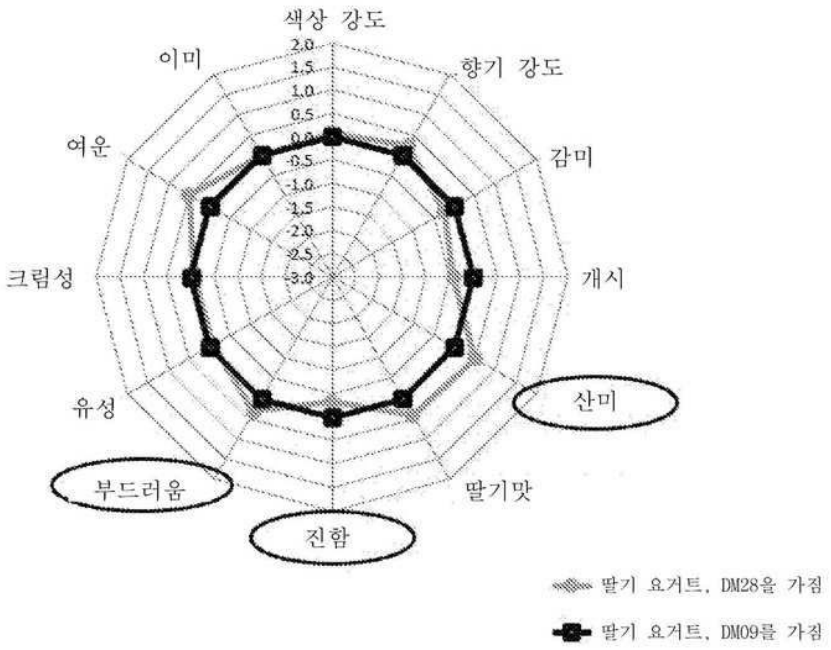
도면11


향기 강도
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
-2.5
-3
이미
감미
산미
진함
부드러움
유성
크림성
여운
요거트, DM09를 가짐
요거트, 33%의 당 감소를 가짐

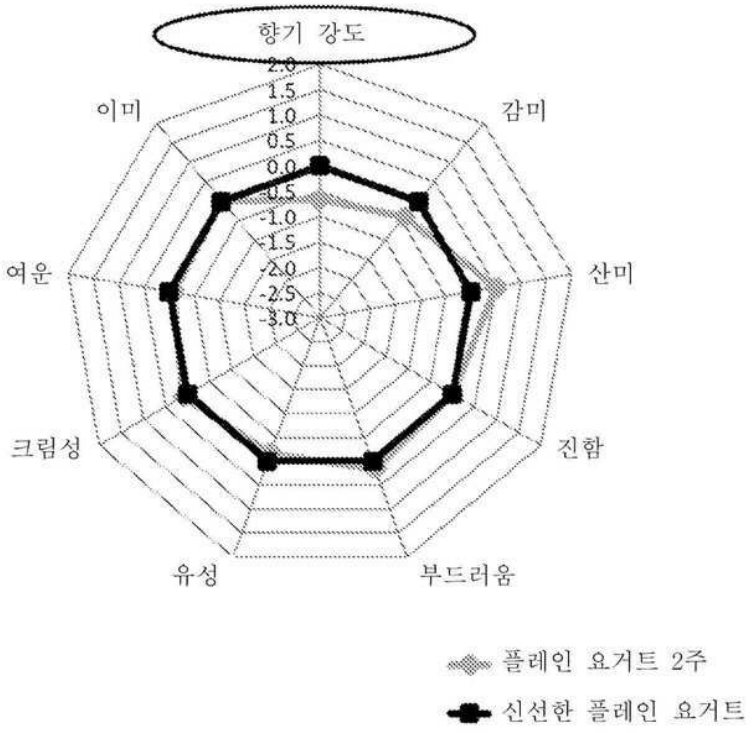
도면12


향기 강도
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
-2.5
-3
이미
감미
산미
진함
부드러움
유성
크림성
여운
요거트, DM09를 가짐
요거트, 충분한 당

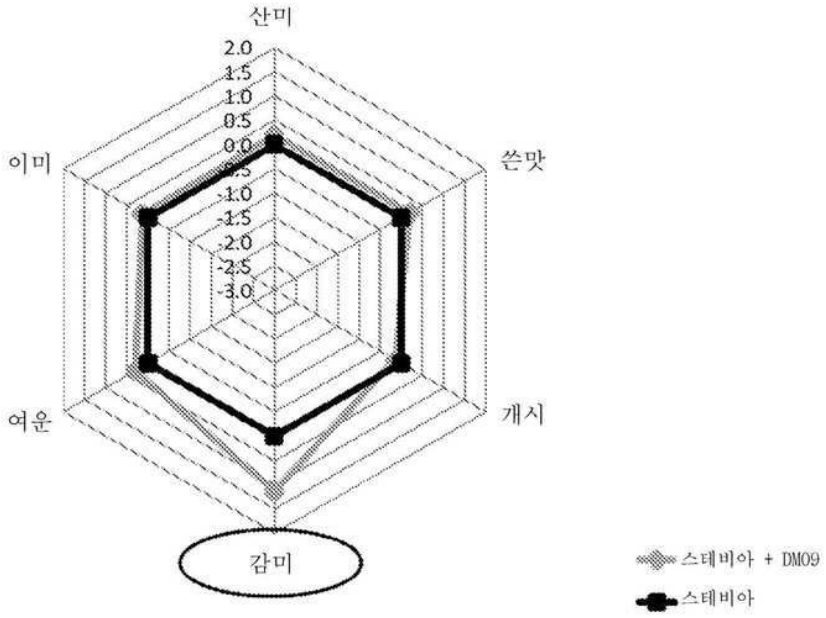
도면13


색상 강도
향기 강도
감미
개시
산미
딸기맛
진함
부드러움
유성
크림성
여운
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
딸기 요거트, DM28을 가짐
딸기 요거트, DM09를 가짐

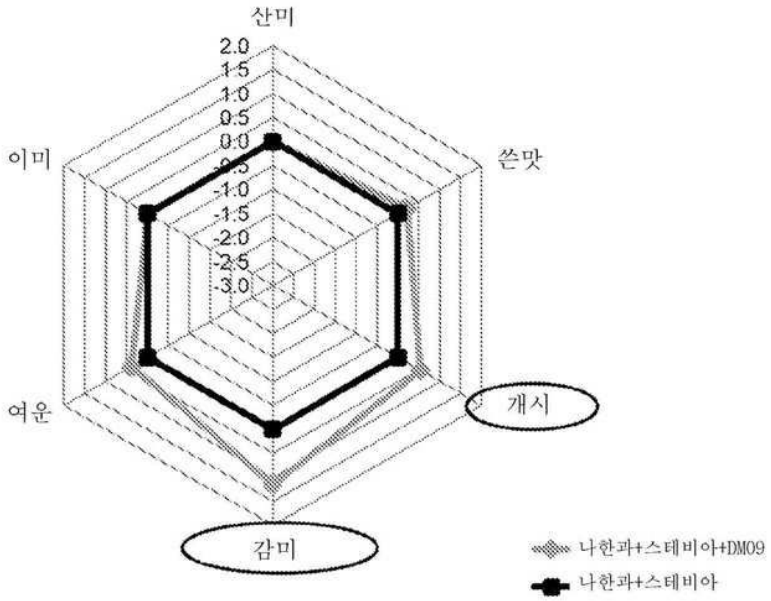
도면14


향기 강도
감미
산미
진함
부드러움
유성
크림성
여운
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
플레인 요거트 2주
신선한 플레인 요거트

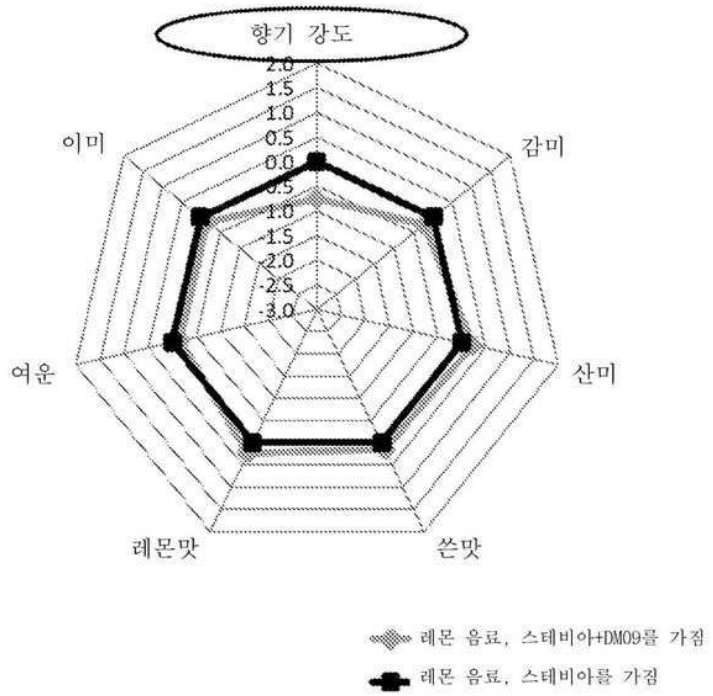
도면15


산미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
이미
쓴맛
여운
개시
감미
스테비아 + DMO9
스테비아

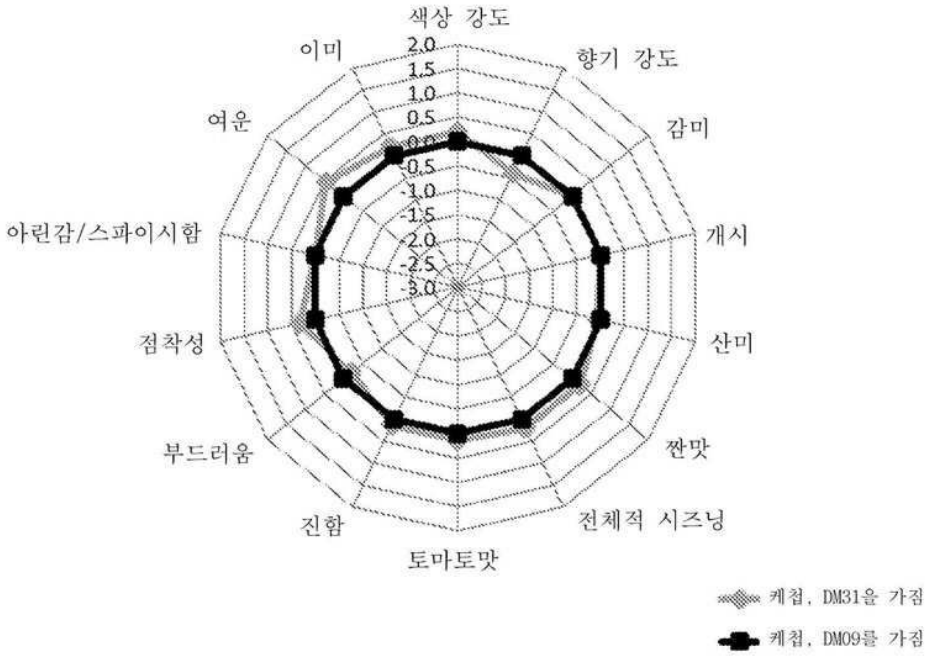
도면16


산미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
이미
쓴맛
여운
개시
감미
나한과+스테비아+DMO9
나한과+스테비아

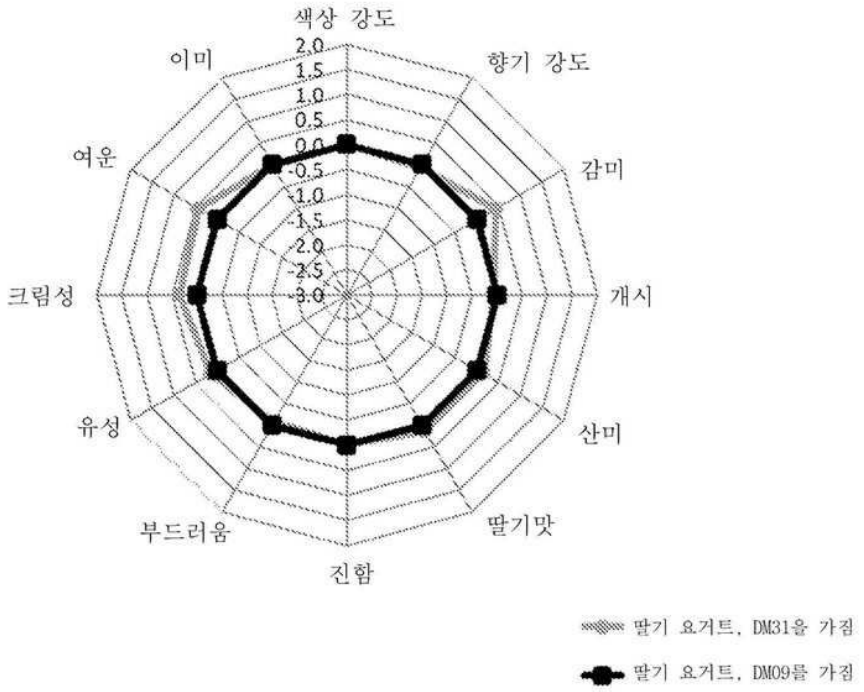
도면17


향기 강도
감미
산미
쓴맛
레몬맛
여운
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
레몬 음료, 스테비아+DM09를 가짐
레몬 음료, 스테비아를 가짐

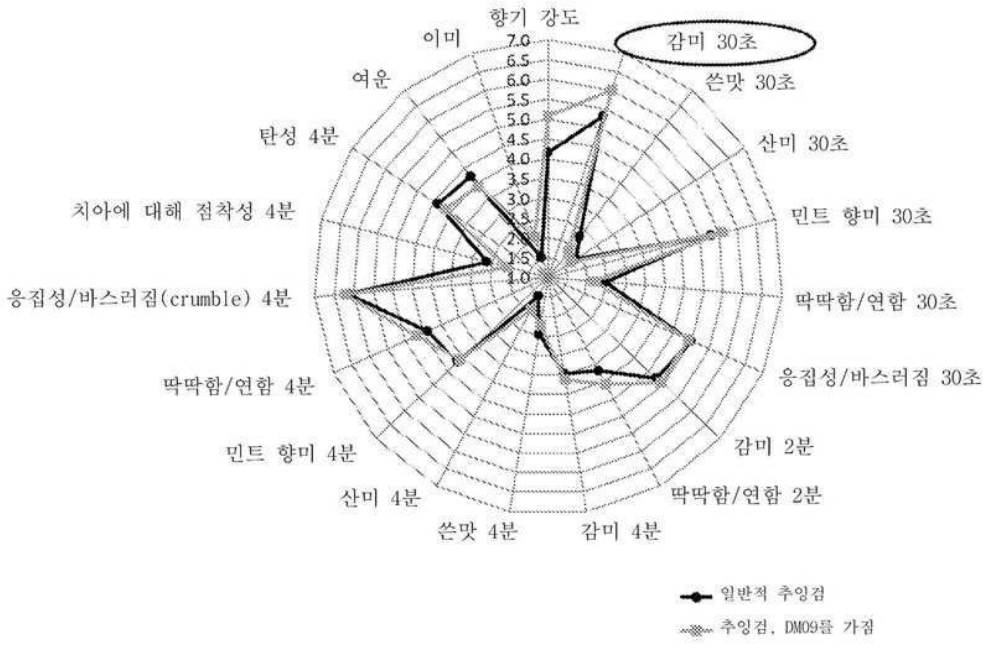
도면18


색상 강도
향기 강도
감미
개시
산미
짠맛
전체적 시즈닝
토마토맛
진함
부드러움
점착성
아린감/스파이시함
여운
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
케첩, DM31을 가짐
케첩, DM09를 가짐

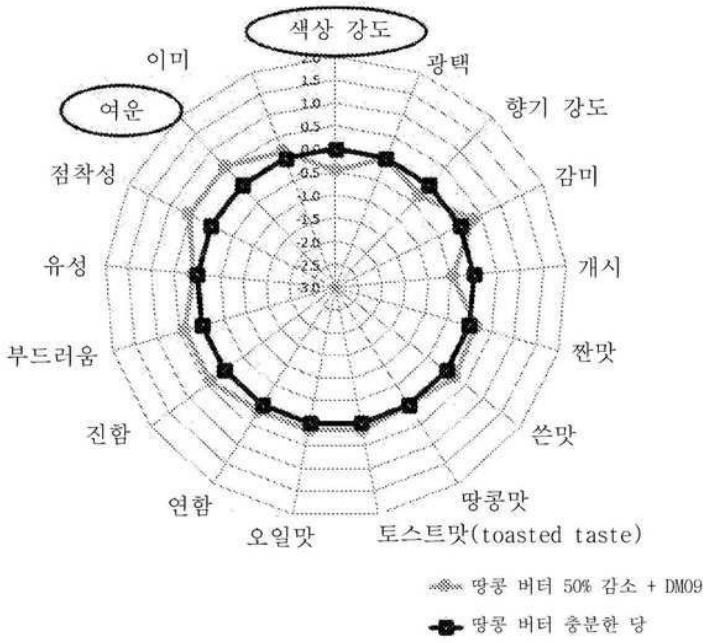
도면19


색상 강도
향기 강도
감미
개시
산미
딸기맛
진함
부드러움
유성
크림성
여운
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
딸기 요거트, DM31을 가짐
딸기 요거트, DM09를 가짐

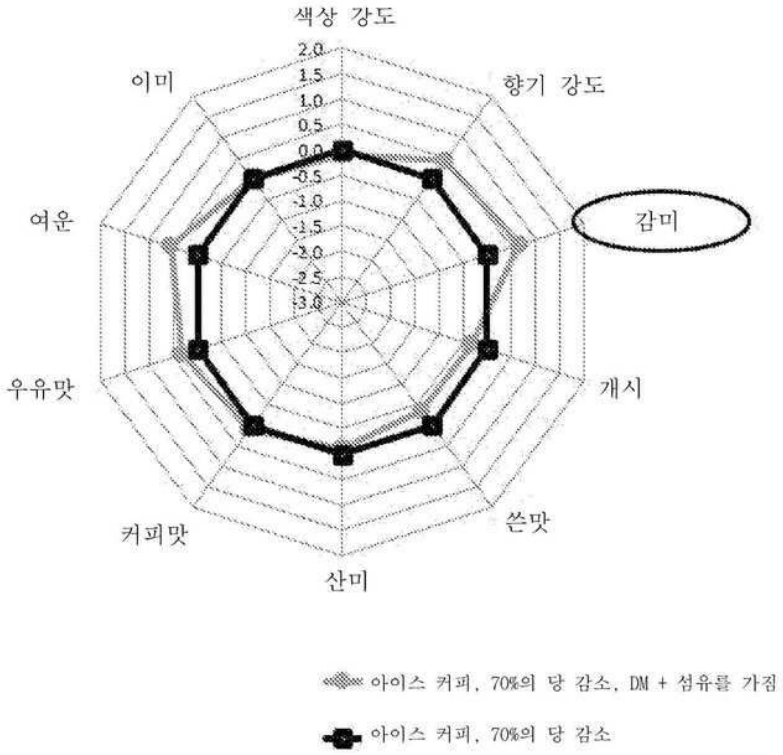
도면20


향기 강도
감미 30초
쓴맛 30초
산미 30초
민트 향미 30초
딱딱함/연함 30초
응집성/바스러짐 30초
감미 2분
딱딱함/연함 2분
감미 4분
쓴맛 4분
산미 4분
민트 향미 4분
딱딱함/연함 4분
응집성/바스러짐(crumble) 4분
치아에 대해 점착성 4분
탄성 4분
여운
이미
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
일반적 추잉검
추잉검, DM09를 가짐

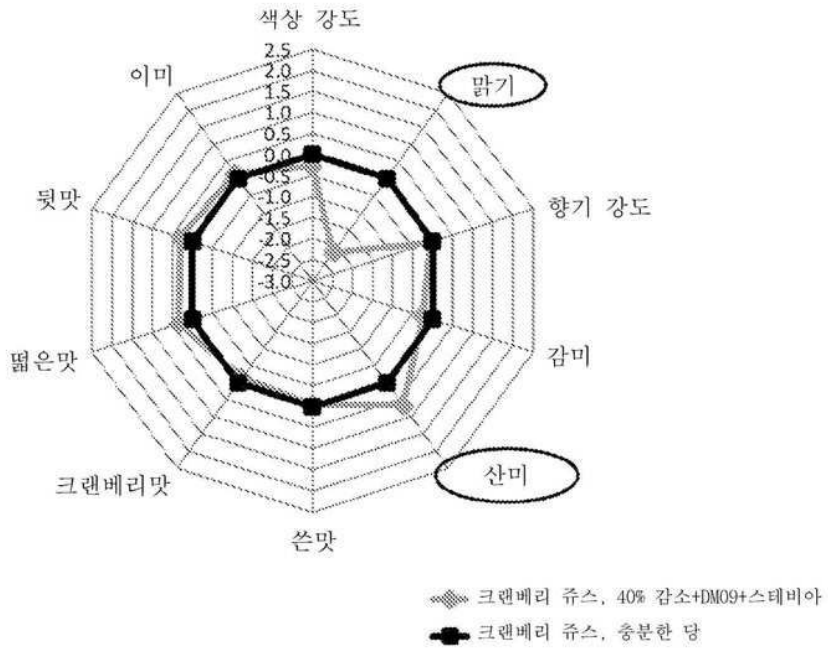
도면21


색상 강도
광택
향기 강도
감미
개시
짠맛
쓴맛
땅콩맛
토스트맛(toasted taste)
오일맛
연함
진함
부드러움
유성
점착성
여운
이미
땅콩 버터 50% 감소 + DM09
땅콩 버터 충분한 당

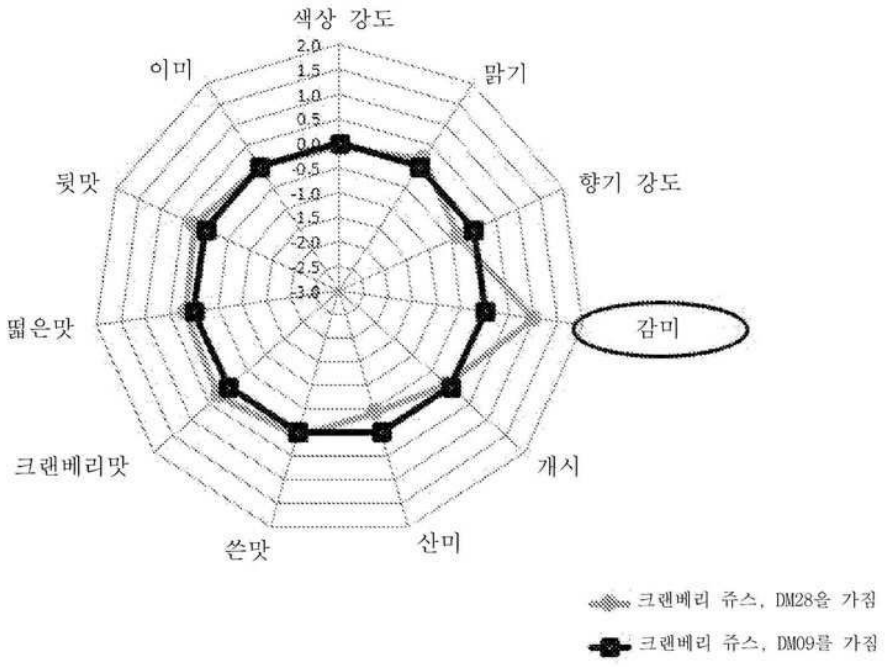
도면22


색상 강도
향기 강도
감미
개시
쓴맛
산미
커피맛
우유맛
여운
이미
아이스 커피, 70%의 당 감소, DM + 섬유를 가짐
아이스 커피, 70%의 당 감소

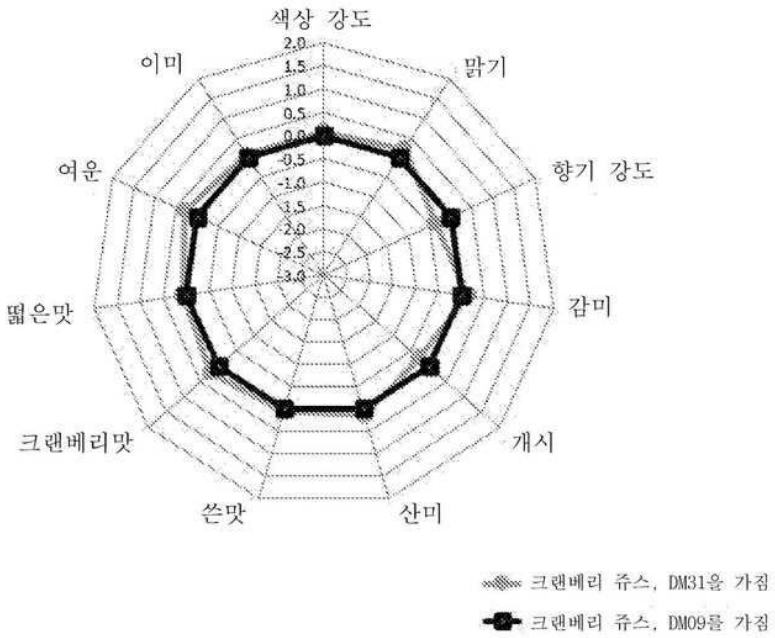
도면23


색상 강도
맑기
향기 강도
감미
산미
쓴맛
크랜베리맛
떫은맛
뒷맛
이미
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
크랜베리 쥬스, 40% 감소+DM09+스테비아
크랜베리 쥬스, 충분한 당

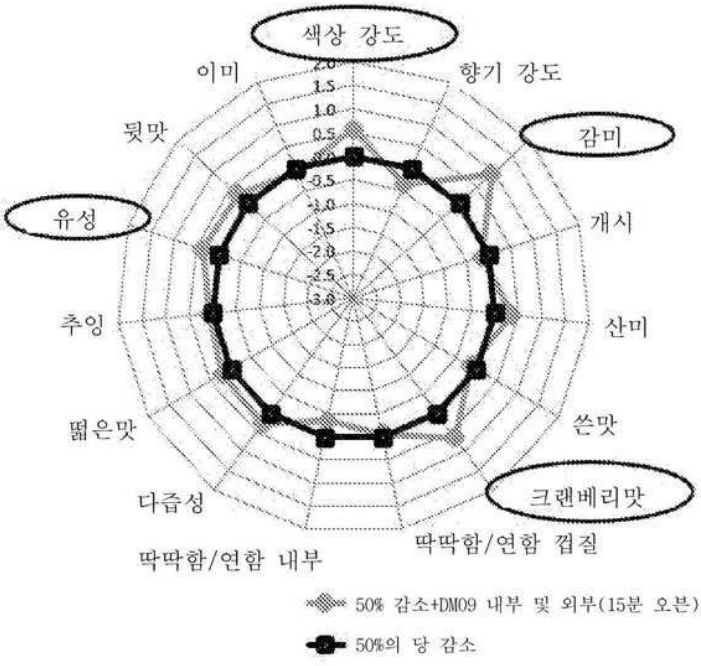
도면24


색상 강도
맑기
향기 강도
감미
개시
산미
쓴맛
크랜베리맛
떫은맛
뒷맛
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
크랜베리 쥬스, DM28을 가짐
크랜베리 쥬스, DM09를 가짐

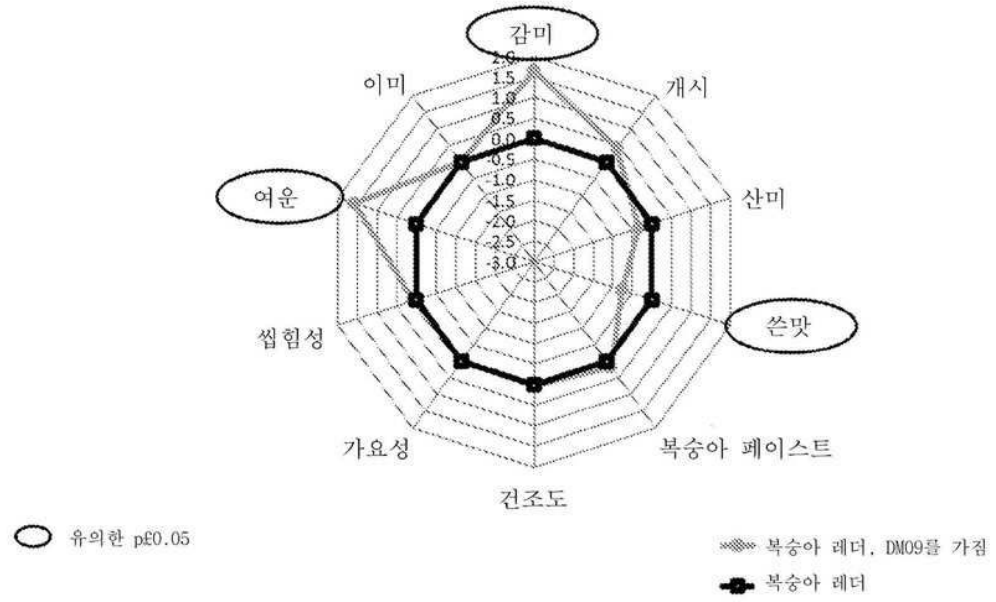
도면25


색상 강도
맑기
향기 강도
감미
개시
산미
쓴맛
크랜베리맛
떫은맛
여운
이미
크랜베리 쥬스, DM31을 가짐
크랜베리 쥬스, DM09를 가짐

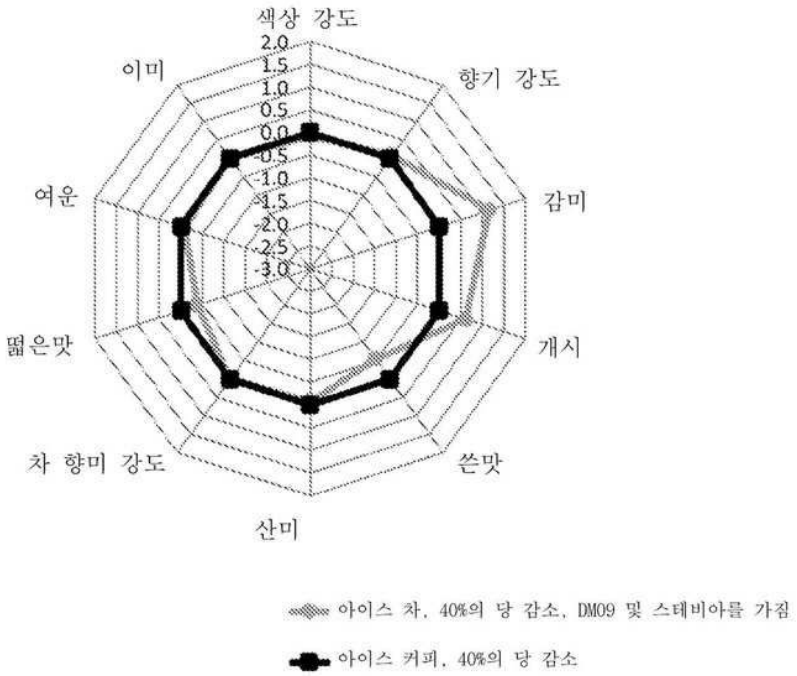
도면26


색상 강도
향기 강도
감미
개시
산미
쓴맛
크랜베리맛
딱딱함/연함 껍질
딱딱함/연함 내부
다즙성
떫은맛
추잉
유성
뒷맛
이미
50% 감소+DM09 내부 및 외부(15분 오븐)
50%의 당 감소

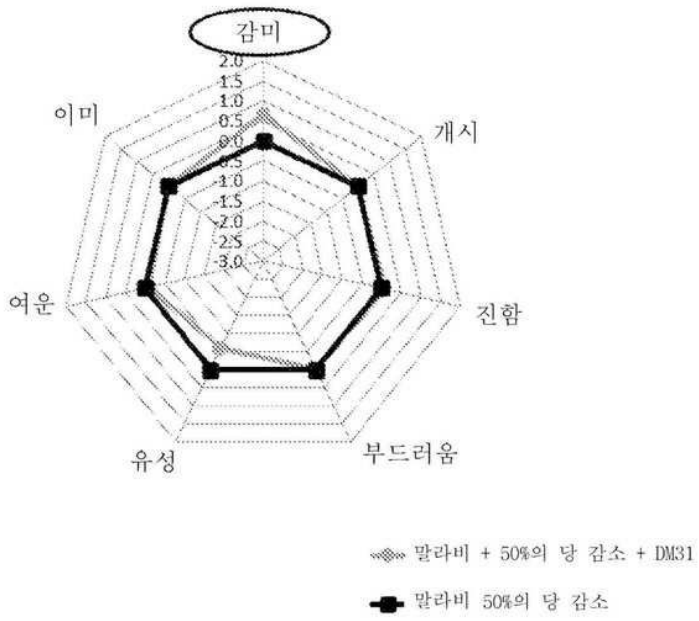
도면27


감미
개시
산미
쓴맛
복숭아 페이스트
건조도
가요성
씹힘성
여운
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
유의한 p£0.05
복숭아 레더, DM09를 가짐
복숭아 레더

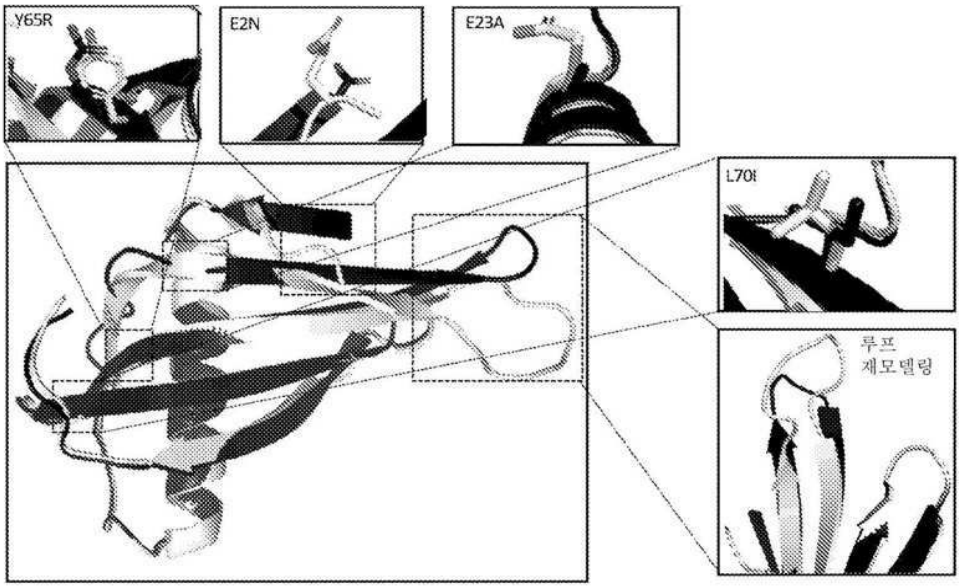
도면28


색상 강도
향기 강도
감미
개시
쓴맛
산미
차 향미 강도
떫은맛
여운
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
아이스 차, 40%의 당 감소, DM09 및 스테비아를 가짐
아이스 커피, 40%의 당 감소

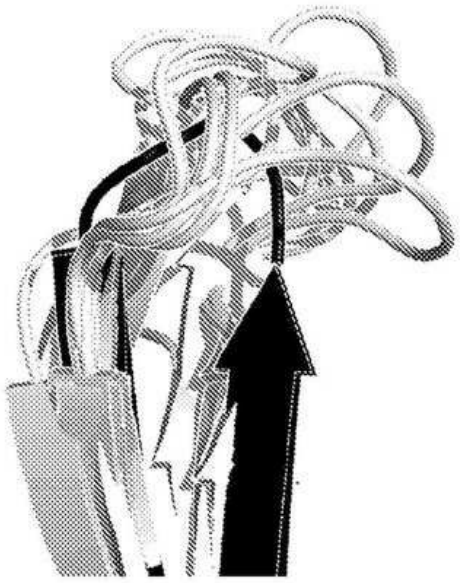
도면29


감미
개시
진함
부드러움
유성
여운
이미
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
말라비 + 50%의 당 감소 + DM31
말라비 50%의 당 감소

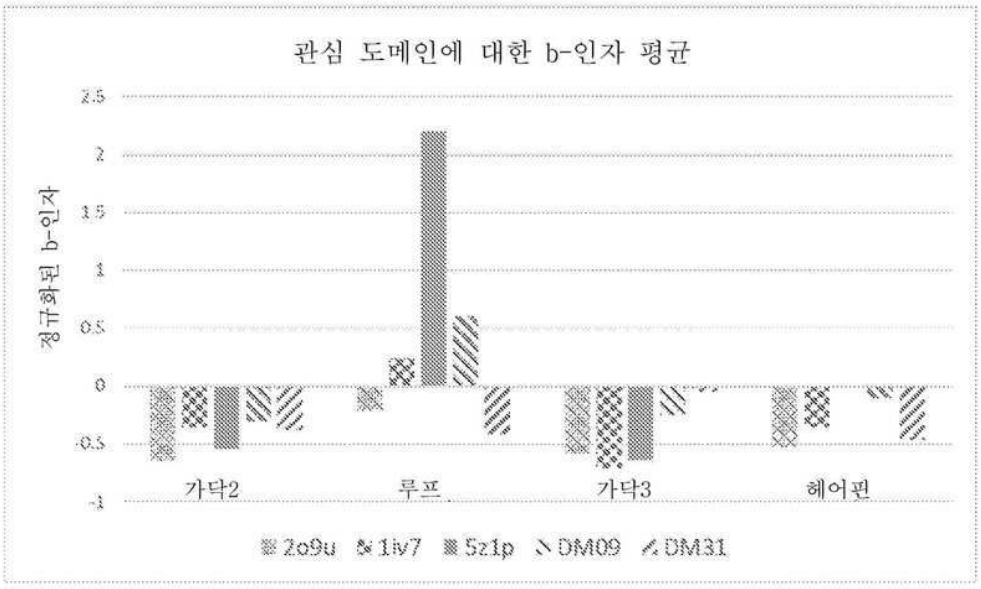
도면30a


Y65R
E2N
E23A
L70I
루프
재모델링

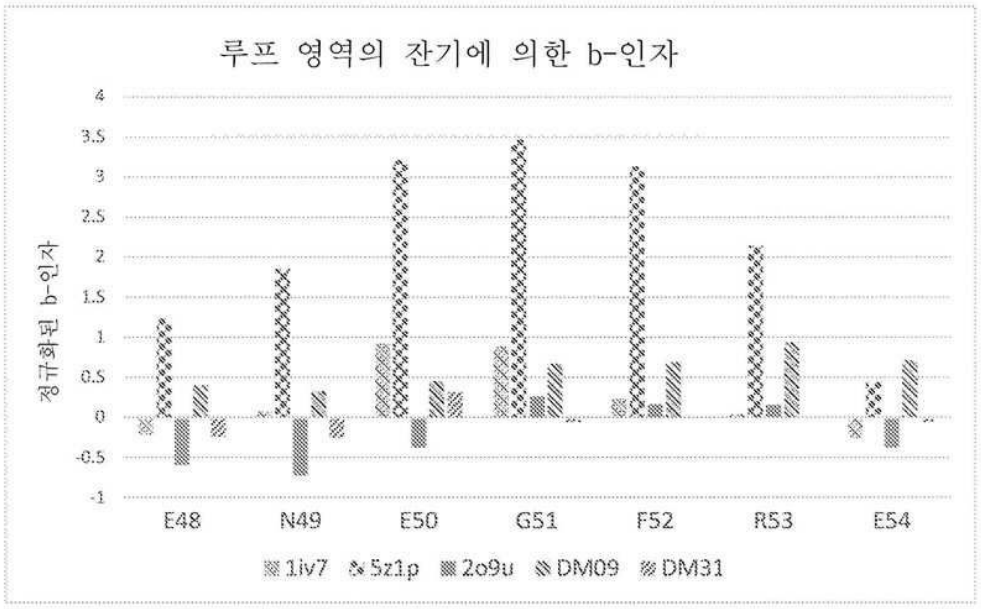
도면30b



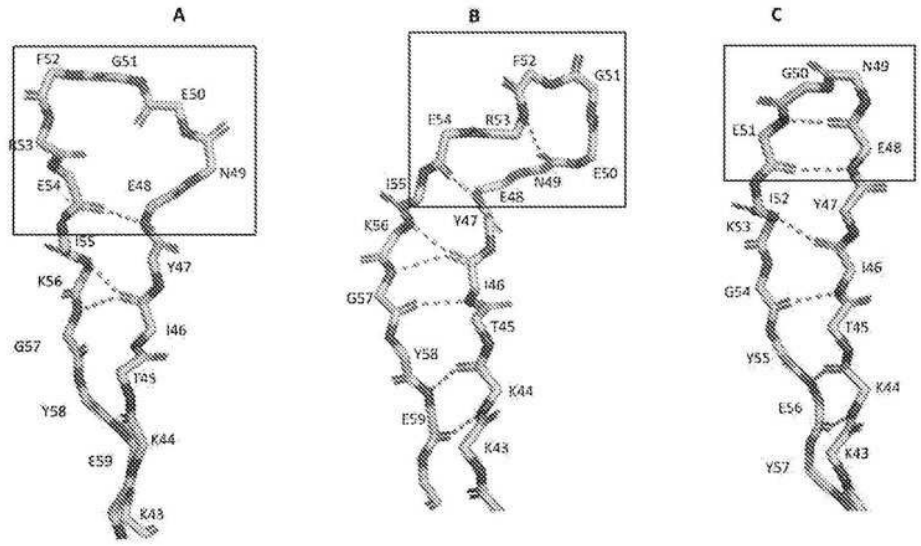
도면31a


관심 도메인에 대한 b-인자 평균
정규화된 b-인자
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
-1
가닥2
루프
가닥3
헤어핀
2o9u
1lv7
5z1p
DM09
DM31

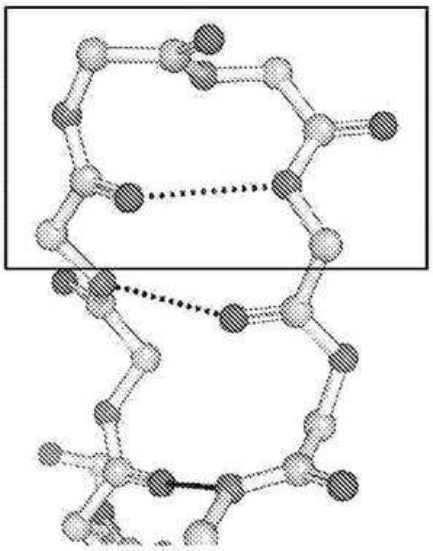
도면31b


루프 영역의 잔기에 의한 b-인자
정규화된 b-인자
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
-1
E48
N49
E50
G51
F52
R53
E54
1iv7
5z1p
2o9u
DM09
DM31

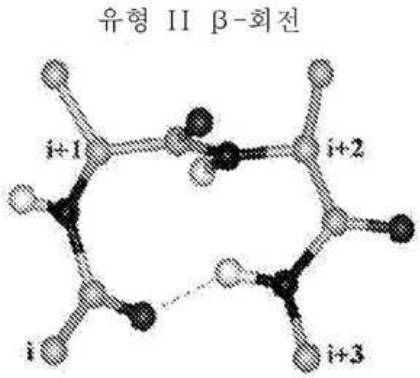
도면32


A
F52
G51
E50
R53
E54
E48
N49
I55
Y47
K56
I46
G57
T45
Y58
K44
E59
K43
B
F52
G51
E54
R53
I55
N49
E50
E48
K56
Y47
I46
G57
T45
Y58
K44
E59
K43
C
G50
N49
E51
E48
I52
Y47
K53
I46
G54
T45
Y55
K44
E56
K43
Y57

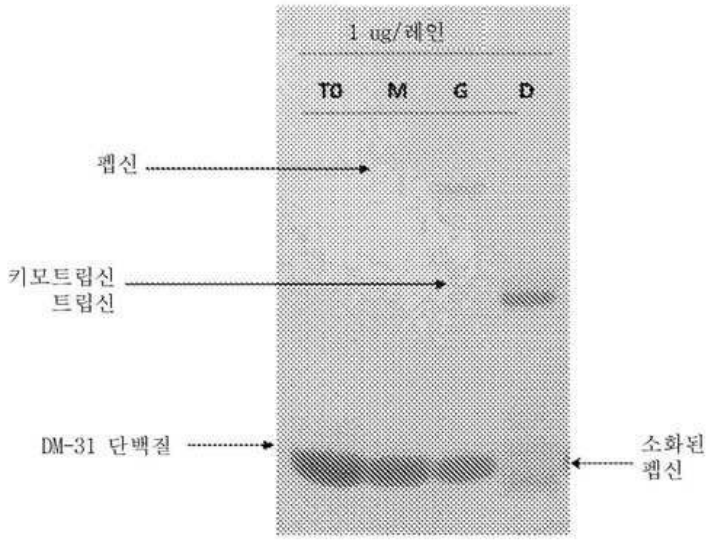
도면33a



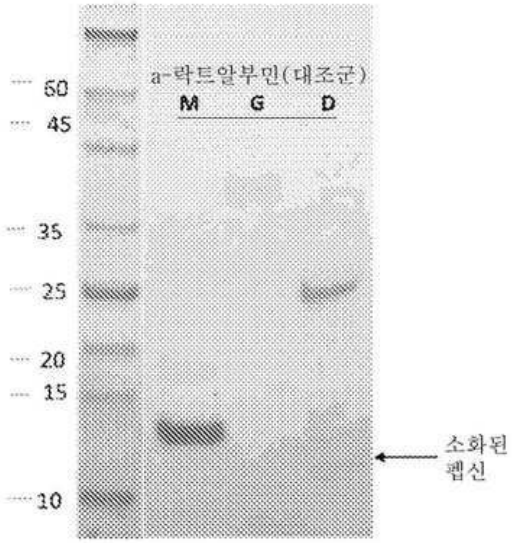
도면33b



도면34a


1 ug/레인
TO
M
G
D
펩신
키모트립신
트립신
DM-31 단백질
소화된
펩신

도면34b


a-락트알부민(대조군)
M
G
D
60
45
35
25
20
15
10
소화된
펩신