



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108697100 B

(45) 授权公告日 2022.07.08

(21) 申请号 201780013449.3

(22) 申请日 2017.02.15

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108697100 A

(43) 申请公布日 2018.10.23

(30) 优先权数据  
62/297,582 2016.02.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.08.20

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2017/017904 2017.02.15

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/142904 EN 2017.08.24

(73) 专利权人 巴斯夫欧洲公司  
地址 德国莱茵河畔路德维希港

(72) 发明人 C·波普 A·赫斯顿达文波特  
M·里兹卡 谭叙秋 J·库切尔  
A·冯克 S·黑夫纳  
M·F·H·赛特

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

专利代理师 凌立 黄革生

(51) Int.Cl.  
C12N 9/20 (2006.01)  
A21D 8/02 (2006.01)  
A21D 10/02 (2006.01)

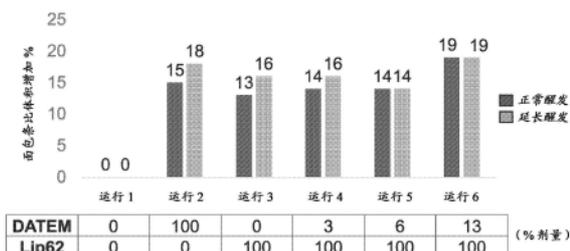
(56) 对比文件  
US 2008305531 A1, 2008.12.11  
US 2009053362 A1, 2009.02.26  
US 2011262591 A1, 2011.10.27  
US 2003180418 A1, 2003.09.25  
US 2011003031 A1, 2011.01.06  
CN 102160562 A, 2011.08.24  
US 2012164272 A1, 2012.06.28  
张峦等. 重组华根霉脂肪酶的酶学性质及其  
对面团热机械学和烘焙特性的影响.《食品科  
学》.2010,第31卷(第13期),第158-163页.

审查员 赵建民

权利要求书2页 说明书15页  
序列表11页 附图2页

(54) 发明名称  
烘焙脂肪酶

(57) 摘要  
脂肪酶及在烘焙中用该脂肪酶来改善烘焙  
产品的体积、稳定性、耐受性,和/或减少和减少  
或消除DATEM的使用的方法。



1. 用于增加烘焙产品体积的方法,其包括:

- (a) 提供面团;
- (b) 提供脂肪酶,其中脂肪酶是氨基酸序列为SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的多肽;
- (c) 将(b)的脂肪酶与(a)的面团组合,并烘焙该组合以产生体积增加的烘焙产品。

2. 权利要求1的方法,其中面团是包含面粉、盐、水和酵母的组合物。

3. 权利要求2的方法,其中面粉选自杏仁粉、椰粉、芡欧鼠尾草粉、玉米粉、大麦粉、二粒小麦粉、大豆粉、大麻粉、马铃薯粉、昆诺阿藜、埃塞俄比亚画眉草粉、黑麦粉、苋菜粉、竹芋根粉、鹰嘴豆粉、腰果粉、亚麻籽饼粉、夏威夷果粉、稷粉、高粱粉、米粉、木薯粉及其任意组合。

4. 权利要求2的方法,其中酵母选自面包酵母、酵母浆、压缩酵母、压块酵母、活性干酵母、即发酵母、耐渗透酵母、速发酵母、灭活酵母、营养酵母、啤酒酵母、酒糟和酒酵母。

5. 权利要求1的方法,其中脂肪酶是由核酸序列SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8编码的多肽。

6. 权利要求1的方法,其进一步包括添加第二种酶。

7. 权利要求6的方法,其中第二种酶包含第二种脂肪酶、 $\alpha$ -淀粉酶、葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽四糖水解酶、外切-麦芽四糖水解酶、G4-淀粉酶、葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽糖水解酶、产麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶、环糊精葡聚糖转移酶、CGT酶、葡糖淀粉酶、内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶、木聚糖酶、纤维素酶、氧化还原酶、磷脂酶A1、磷脂酶A2、磷脂酶C、磷脂酶D、半乳糖脂酶、三酰甘油酯酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、转谷氨酰胺酶、果胶酶、果胶酸裂合酶、蛋白酶或其任意组合。

8. 权利要求1的方法,其中脂肪酶在pH 4.0至pH 12.0的范围内具有活性。

9. 权利要求1的方法,其中脂肪酶在20°C至60°C的温度范围内具有活性。

10. 用于在不添加DATEM的情况下增加烘焙产品体积的方法,其包括:

- (a) 提供面团;
- (b) 提供脂肪酶,其中脂肪酶是氨基酸序列为SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的多肽;
- (c) 将(b)的脂肪酶与(a)的面团组合而不添加DATEM,并烘焙该组合以产生体积增加的烘焙产品。

11. 权利要求10的方法,其中面团是包含面粉、盐、水和酵母的组合物。

12. 权利要求11的方法,其中面粉选自杏仁粉、椰粉、芡欧鼠尾草粉、玉米粉、大麦粉、二粒小麦粉、大豆粉、大麻粉、马铃薯粉、昆诺阿藜、埃塞俄比亚画眉草粉、黑麦粉、苋菜粉、竹芋根粉、鹰嘴豆粉、腰果粉、亚麻籽饼粉、夏威夷果粉、稷粉、高粱粉、米粉、木薯粉及其任意组合。

13. 权利要求11的方法,其中酵母选自面包酵母、酵母浆、压缩酵母、压块酵母、活性干酵母、即发酵母、耐渗透酵母、速发酵母、灭活酵母、营养酵母、啤酒酵母、酒糟和酒酵母。

14. 权利要求10的方法,其中脂肪酶是由核酸序列SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8编码的多肽。

15. 权利要求10的方法,其进一步包括添加第二种酶。

16. 权利要求10的方法,其中第二种酶包含第二种脂肪酶、 $\alpha$ -淀粉酶、葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽四糖水解酶、外切-麦芽四糖水解酶、G4-淀粉酶、葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽糖水解酶、产麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶、环糊精葡聚糖转移酶、CGT酶、葡糖淀粉酶、内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶、木聚糖酶、纤

纤维素酶、氧化还原酶、磷脂酶A1、磷脂酶A2、磷脂酶C、磷脂酶D、半乳糖脂酶、三酰甘油酯酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、转谷氨酰胺酶、果胶酶、果胶酸裂合酶、蛋白酶或其任意组合。

17. 权利要求10的方法,其中脂肪酶在pH 4.0至pH 12.0的范围内具有活性。

18. 权利要求10的方法,其中脂肪酶在20°C至60°C的温度范围内具有活性。

## 烘焙脂肪酶

[0001] 序列表

[0002] 本申请包含氨基酸序列表,其以计算机可读形式在ASC II text (.txt)文件中列出,在此以其整体和为了所有目的引入本申请的说明书作为参考。

文件名	创建日期	大小(字节)
150300_SequenceListing	2016年1月26日	26.3KB (27,009字节)

### 技术领域

[0004] 面包数千年来一直是人类营养的主食。面包通常这样制作:组合面粉、水、盐、酵母和/或其他食品添加剂制成面团(dough)或浆糊(paste);然后烘焙面团制成面包。已知酶可用于烘焙,因为酶对烘焙过程的影响可类似于或好于化学替代品。若干不同酶可用于制作面包,例如已知脂肪酶改善面包的稳定性和体积;但是,该产业仍需要改善体积、稳定性、耐受性,减少或消除添加剂二乙酰酒石酸单甘油酯(diacetyl tartaric acid esters of monoglycerides,DATEM)的脂肪酶。本公开涉及符合或超出这些产业需求的脂肪酶。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明的一个实施方案是:用于增加烘焙产品体积的方法,其包括:(a)提供面团;(b)提供脂肪酶,其中脂肪酶是具有氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的多肽;(c)将(b)的脂肪酶与(a)的面团组合并烘焙该组合以产生体积增加的烘焙产品。

[0007] 在另一实施方案中,该面团是包含面粉、盐、水和酵母的组合物。

[0008] 在另一实施方案中,该面粉选自杏仁粉、椰粉、苋欧鼠尾草(chia)粉、玉米粉、大麦芽粉、二粒小麦粉、大豆粉、大麻粉、马铃薯粉、昆诺阿藜、埃塞俄比亚画眉草粉、黑麦粉、苋菜粉、竹芋根粉、鹰嘴豆粉、腰果粉、亚麻籽饼粉(flax meal)、夏威夷果粉、稷粉、高粱粉、米粉、木薯粉及其任意组合。

[0009] 在另一实施方案中,该酵母选自面包酵母、酵母浆(cream yeast)、压缩酵母、压块酵母、活性干酵母、即发酵母、耐渗压酵母、速发酵母、灭活酵母、营养酵母、啤酒酵母、酒糟(distill' s)和酒酵母。

[0010] 在另一实施方案中,该脂肪酶是变体多肽,该变体多肽与选自氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11中所示多肽的氨基酸序列至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一,且该变体多肽具有脂肪酶活性。

[0011] 在另一实施方案中,该脂肪酶是由选自核酸序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12的编码该氨基酸序列的编码核酸序列编码的多肽。

[0012] 在另一实施方案中,该方法进一步包括添加第二种酶。在另一实施方案中,该第二种酶包含第二种脂肪酶、 $\alpha$ -淀粉酶、葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽四糖水解酶(Glucan 1,4- $\alpha$ -maltotetrahydrolase)、外切-麦芽四糖水解酶、G4-淀粉酶、葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽糖水解酶、

产麦芽糖 (maltogenic)  $\alpha$ -淀粉酶、环糊精葡聚糖转移酶、CGT酶、葡糖淀粉酶、内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶、木聚糖酶、纤维素酶、氧化还原酶、磷脂酶A1、磷脂酶A2、磷脂酶C、磷脂酶D、半乳糖脂酶、三酰甘油脂酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、转谷氨酰胺酶、果胶酶、果胶酸裂合酶、蛋白酶或其任意组合。

[0013] 在另一实施方案中,该脂肪酶在pH 4.0至pH 12.0的范围内具有活性。

[0014] 在另一实施方案中,该脂肪酶在20°C至60°C的温度范围内具有活性。

[0015] 在本发明的另一实施方案是用于在不添加DATEM的情况下增加烘焙产品体积的方法,其包括:(a)提供面团;(b)提供脂肪酶,其中脂肪酶是具有氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的多肽;(c)将(b)的脂肪酶与(a)的面团组合而不添加DATEM,并烘焙该组合以产生体积增加的烘焙产品。

[0016] 在另一实施方案中,该面团是包含面粉、盐、水和酵母的组合物。

[0017] 在另一实施方案中,该面粉选自杏仁粉、椰粉、芡欧鼠尾草粉、玉米粉、大麦粉、二粒小麦粉、大豆粉、大麻粉、马铃薯粉、昆诺阿藜、埃塞俄比亚画眉草粉、黑麦粉、苋菜粉、竹芋根粉、鹰嘴豆粉、腰果粉、亚麻籽饼粉、夏威夷果粉、稷粉、高粱粉、米粉、木薯粉及其任意组合。

[0018] 在另一实施方案中,该酵母选自面包酵母、酵母浆、压缩酵母、压块酵母、活性干酵母、即发酵母、耐渗压酵母、速发酵母、灭活酵母、营养酵母、啤酒酵母、酒糟和酒酵母。

[0019] 在另一实施方案中,该脂肪酶是具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11的氨基酸序列的多肽。

[0020] 在另一实施方案中,该脂肪酶是变体多肽,该变体多肽与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11的氨基酸序列至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一,且该变体多肽具有脂肪酶活性。

[0021] 在另一实施方案中,该脂肪酶是由编码选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11的氨基酸序列的核酸序列编码的多肽。

[0022] 在另一实施方案中,该方法进一步包括添加第二种酶。在另一实施方案中,该第二种酶包含第二种脂肪酶、 $\alpha$ -淀粉酶、葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽四糖水解酶、外切-麦芽四糖水解酶、G4-淀粉酶、葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽糖水解酶、产麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶、环糊精葡聚糖转移酶、CGT酶、葡糖淀粉酶、内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶、木聚糖酶、纤维素酶、氧化还原酶、磷脂酶A1、磷脂酶A2、磷脂酶C、磷脂酶D、半乳糖脂酶、三酰甘油脂酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、转谷氨酰胺酶、果胶酶、果胶酸裂合酶、蛋白酶或其任意组合。

[0023] 在另一实施方案中,该脂肪酶在pH 4.0至pH 12.0的范围内具有活性。

[0024] 在另一实施方案中,该脂肪酶在20°C至60°C的温度范围内具有活性。

[0025] 附图简述

[0026] 图1.脂肪酶对溶液中天然底物的特异性。

[0027] 图2.Pistolet测试的脂肪酶和DATEM剂量。

[0028] 发明详述

[0029] 面包包括但不限于面包卷、小奶油面包、糕点、蛋糕、小面包干、比萨面包、比塔面包、薄饼、派皮、lavish、pitta、佛卡恰、发酵面团、面条、曲奇饼、玉米粉圆饼、薄煎饼、小薄

煎饼、烤碎面包片和饼干。烘焙面包通常涉及混合成分形成面团、揉面、发面、成型、烘焙、冷却和保存。用于制作面团的成分通常包括面粉、水、盐、酵母和其他食品添加剂。

[0030] 面粉通常由小麦制成,可以为不同目的而研磨,如制作面包、糕点、蛋糕、饼干面团和面条。小麦粉的替代品包括但不限于杏仁粉、椰粉、芡欧鼠尾草粉、玉米粉、大麦粉、二粒小麦粉、大豆粉、大麻粉、马铃薯粉、昆诺阿藜、埃塞俄比亚画眉草粉、黑麦粉、苋菜粉、竹芋根粉、鹰嘴豆粉、腰果粉、亚麻籽饼粉、夏威夷果粉、稷粉、高粱粉、米粉、木薯粉及其任意组合。已知全世界范围内面粉类型在不同区域和不同国家间不同。

[0031] 酵母将糖分解为二氧化碳和水。多种面包酵母(通常源自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))为本领域已知,包括但不限于酵母浆、压缩酵母、压块酵母、活性干酵母、即发酵母、耐渗透压酵母、速发酵母、灭活酵母。其他类型的酵母包括营养酵母、啤酒酵母、酒糟和酒酵母。

[0032] 甜味剂包括但不限于液态糖、糖浆、白(砂)糖、棕(粗)糖、蜂蜜、果糖、右旋糖、葡萄糖、高果糖玉米糖浆、糖蜜和人工甜味剂。

[0033] 乳化剂包括但不限于二乙酰酒石酸单甘油酯(DATEM)、硬脂酰乳酸钠(SSL)、硬脂酰乳酸钙(CSL)、乙氧基化单酰和二酰甘油(EMG)、聚山梨酯(PS)和琥珀酰化单酰甘油(SMG)。

[0034] 其他可用于本公开的方法的食品添加剂包括:脂质、油、黄油、人造黄油、起酥油、乳脂、甘油、蛋、膳食、非膳食替代品、增稠剂、防腐剂、着色剂和酶。

[0035] 酶是包含氨基酸序列的生物分子,其中酶可以催化反应。根据国际生物化学和分子生物学(IUBMB)联合会命名委员会的建议,酶名称为本领域技术人员已知。酶名称包括:EC(酶学委员会)号、建议名称、别名(若有)、催化活性和其他因子。酶也称为多肽、蛋白质、肽、氨基酸序列,或通过SEQ ID NO标识。在本公开中,酶的别名可互换使用。

[0036] 已知不同种类的酶可用于烘焙,包括: $\alpha$ -淀粉酶(E.C.3.2.1.1);葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽四糖水解酶(E.C.3.2.1.60),也称为外切-麦芽四糖水解酶、G4-淀粉酶;葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽糖水解酶(E.C.3.2.1.133),也称为产麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶;内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶(E.C.3.2.1.8);氧化还原酶;磷脂酶A1(E.C.3.1.1.32);磷脂酶A2(E.C.3.1.1.4);磷脂酶C(E.C.3.1.4.3);磷脂酶D(E.C.3.1.4.4);半乳糖脂酶(E.C.3.1.1.26);和蛋白酶。酶可用作食品成分、食品添加剂和/加工助剂。

[0037] 脂肪酶(E.C.3.1.1.3)是已知切割脂质中的酯键的水解酶。脂肪酶包括磷脂酶、三酰甘油酯酶和半乳糖脂酶。已从植物、哺乳动物及包括但不限于以下的微生物鉴定了脂肪酶:假单胞菌属(*Pseudomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、色杆菌属(*Chromobacterium*),来自腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)的角质酶(FSC),南极假丝酵母(*Candida antarctica*) A(CalA)、米根霉(*Rhizopus oryzae*) (ROL)、疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*) (TLL)、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*) (RML)、黑曲霉(*Aspergillus Niger*)、异孢镰刀菌(*Fusarium heterosporum*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、大刀镰刀菌(*Fusarium culmorum*)脂肪酶。

[0038] 此外,专利和公开的专利申请中已公开了许多脂肪酶、磷脂酶和半乳糖脂酶,包括但不限于W01993/000924、W02003/035878、W02003/089620、W02005/032496、W02005/086900、W02006/031699、W02008/036863和W02011/046812。

[0039] 用于食品加工和烘焙的市售脂肪酶包括但不限于:LIPOPAN<sup>TM</sup>、NOOPAZYME(可获自Novozymes);PANAMORE、CAKEZYME和BAKEZYME(可获自DSM);及GRINDAMYL EXEL 16、GRINDAMYLPOWERBAKE和TS-E 861(可获自Dupont/Danisco)。

[0040] 本公开的脂肪酶是分离的、合成的或重组的氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11中所示多肽。

[0041] 本公开的脂肪酶是分离的、合成或重组的由核酸序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12中所示多核苷酸编码的多肽。

[0042] 具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的脂肪酶由具有核酸序列SEQ ID NO:2的多核苷酸或SEQ ID NO:2的编码氨基酸序列SEQ ID NO:1的多核苷酸变体编码。具有氨基酸序列SEQ ID NO:3的脂肪酶由具有核酸序列SEQ ID NO:4的多核苷酸或SEQ ID NO:4的编码氨基酸序列SEQ ID NO:3的变体编码。具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的脂肪酶由具有核酸序列SEQ ID NO:6的多核苷酸或SEQ ID NO:6的编码氨基酸序列SEQ ID NO:5的变体编码。具有氨基酸序列SEQ ID NO:7的脂肪酶由具有核酸序列SEQ ID NO:8的多核苷酸或SEQ ID NO:8的编码氨基酸序列SEQ ID NO:7的变体编码。具有氨基酸序列SEQ ID NO:9的脂肪酶由具有核酸序列SEQ ID NO:10的多核苷酸或SEQ ID NO:10的编码氨基酸序列SEQ ID NO:9的变体编码。具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的脂肪酶由具有核酸序列SEQ ID NO:12的多核苷酸或SEQ ID NO:12的编码氨基酸序列SEQ ID NO:11的变体编码。

[0043] 本公开的脂肪酶是分离的、合成的或重组的变体多肽,其包含与含有或选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:11的氨基酸序列的全长酶活性多肽至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列,其中变体多肽具有脂肪酶活性。

[0044] 本公开的脂肪酶是分离的、合成的或重组的变体多肽,其包含含有或选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:11的氨基酸序列的酶活性多肽及氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失或其任意组合,其中变体多肽具有脂肪酶活性。

[0045] 在另一实施方案中,具有氨基酸取代的变体多肽可以是保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是指,与亲本氨基酸序列相比,在同一位置用具有相似特性的不同氨基酸残基替换氨基酸序列中的一个氨基酸残基。保守氨基酸取代的一些实例包括但不限于用不同的带正电荷氨基酸残基替换带正电荷的氨基酸残基;用不同的极性氨基酸残基替换极性氨基酸残基;用不同的非极性氨基酸残基替换非极性氨基酸残基,用不同的碱性氨基酸残基替换碱性氨基酸残基,或用不同的芳香族氨基酸残基替换芳香族氨基酸残基。

[0046] 在另一实施方案中,具有氨基酸取代的变体多肽可以用任意其他氨基酸残基替换一个氨基酸残基,其中变体多肽具有脂肪酶活性。

[0047] 在另一实施方案中,具有脂肪酶活性的变体多肽是“成熟多肽”。成熟多肽指处于其最终形式的酶,包括任何翻译后修饰、糖基化、磷酸化、截短、N端修饰、C端修饰、信号序列删除。成熟多肽可取决于表达系统、载体、启动子和/或产生方法而不同。

[0048] 在另一实施方案中,脂肪酶在宽pH范围内,在约pH 4.0至约pH 12.0范围内的任意单个点具有活性。在一个实施方案中,脂肪酶在pH 4.0至pH 11.0、pH 4.0至pH 10.0、pH

4.0至pH 9.0、pH 4.0至pH 8.0、pH 4.0至pH 7.0、pH 4.0至pH 6.0或pH 4.0至pH 5.0的范围内具有活性。在另一实施方案中,脂肪酶在pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5、pH 9.0、pH 9.5、pH 10.0、pH 10.5、pH 11.0、pH 11.5、pH 12.0和pH 12.5具有活性。

[0049] 在另一实施方案中,脂肪酶在烘焙过程中任意时间所用的宽温度范围内具有活性,其中温度是约20°C至约60°C范围内的任意点。在另一实施方案中,脂肪酶在20°C至55°C、20°C至50°C、20°C至45°C、20°C至40°C、20°C至35°C、20°C至30°C或20°C至25°C温度范围内具有活性。在另一实施方案中,脂肪酶在至少19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C、50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C的温度或更高温度具有活性。“序列同一性”指第一氨基酸序列与第二种氨基酸序列的比较,或第一核酸序列与第二种核酸序列的比较,且基于该比较计算为百分比。

[0050] 通常,可以用所创建的比对通过两种不同方法之一计算序列同一性。在第一种方法中,在最终序列同一性计算中将单个位置的错配和单个位置的缺口都计数为非同一位置。在第二种方法中,在最终序列同一性计算中将单个位置的错配计数为非同一位置;但是,在最终序列同一性计算中不将单个位置的缺口计数(忽略)为非同一位置。换言之,在第二种方法中,在最终序列同一性计算中忽略缺口。这两种方法之间的差异(在单个位置将缺口计数为非同一位置对忽略缺口)可导致两个序列间序列同一性值的变异。

[0051] 在本公开的一个实施方案中,通过程序测定序列同一性,该程序产生比对,并在最终序列同一性计算中将单个位置的错配和单个位置的缺口都计数为非同一位置来计算同一性。例如程序(EMBOSS),其执行Needleman和Wunsch(Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453)的算法,其这样计算序列同一性:首先产生第一序列和第二种序列之间的比对,然后计数比对长度内相同位置的数目,然后将相同残基的数目除以比对长度,然后将此数乘以100来产生%序列同一性[%序列同一性=(相同残基数/比对长度)x100]。

[0052] 在本公开的另一实施方案中,可以从配对比对计算序列同一性,该配对比对在全长范围内显示两个序列,所以以其全长显示第一序列和第二种序列(“总体序列同一性”)。例如,程序Needle(EMBOSS)产生这类比对;%序列同一性=(相同残基数/比对长度)x100。

[0053] 在本公开的另一实施方案中,可以从仅显示第一序列或第二种序列的局部区域的配对比对计算序列同一性(“局部同一性”)。例如,程序Blast(NCBI)产生这类比对;%序列同一性=(相同残基数/比对长度)x100。

[0054] 在本公开的一个实施方案中,脂肪酶可以与至少一种其他酶或第二种酶组合使用。在另一实施方案中,该第二种酶包含或选自: $\alpha$ -淀粉酶;葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽四糖水解酶,也称为外切-麦芽四糖水解酶、G4-淀粉酶;葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽糖水解酶,也称为产麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶、环糊精葡聚糖转移酶、葡糖淀粉酶;内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶;木聚糖酶、纤维素酶、氧化还原酶;磷脂酶A1、磷脂酶A2、磷脂酶C、磷脂酶D;半乳糖脂酶、三酰甘油酯酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、转谷氨酰胺酶、果胶酶、果胶酸裂合酶、蛋白酶或其任意组合。在另一实施方案中,该酶组合是本文公开的脂肪酶和产麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶,或者该酶组合是本文公开的脂肪酶、

产麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶和木聚糖酶。

[0055] 在本公开的另一实施方案中,该脂肪酶可以是一种以上脂肪酶的杂合体。“杂合体”或“嵌合”或“融合蛋白质”指将本公开的第一脂肪酶的结构域与第二种脂肪酶的结构域组合形成杂合脂肪酶,且该杂合体具有脂肪酶活性。在一个实施方案中,将本公开的脂肪酶的结构域与市售脂肪酶如LIPOPAN(可获自Novozymes)或PANAMORE(可获自DSM)的结构域组合形成杂合脂肪酶,且该杂合脂肪酶具有脂肪酶活性。

[0056] 工业酶通常是用细菌、真菌或酵母表达系统产生的重组蛋白质。“表达系统”还指宿主微生物、表达宿主、宿主细胞、产生生物或产生菌株,对于本公开,这些术语中的每一个可互换使用。表达系统的实例包括但不限于:黑曲霉、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、疏绵状嗜热丝孢菌、尖孢镰刀菌、异孢镰刀菌、大肠杆菌(*Escherichia coli*),芽孢杆菌属(*Bacillus*),优选枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),假单胞杆菌属(*Pseudomonas*),优选荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*),巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)(也称为*Komagataella phaffii*),嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)(C1),粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*),木霉属(*Trichoderma*),优选里氏木霉(*Trichoderma reesei*)。在一个实施方案中,用上文所列表达系统产生本公开的脂肪酶。

[0057] 已知脂肪酶可用于其他工业应用。在本公开的一个实施方案中,该脂肪酶用于去垢剂。在本公开的一个实施方案中,该脂肪酶用于个人护理产品,如隐形眼镜溶液。在另一实施方案中,本公开的脂肪酶用于织物加工,如制革。在另一实施方案中,本公开的脂肪酶可用于纸浆和纸张加工。在另一实施方案中,该纸浆和纸张加工是树脂控制(pitch control)或脱墨。在另一个实施方案中,本公开的脂肪酶可用于制造生物柴油。在另一实施方案中,本公开的脂肪酶可用于干酪成熟。在另一实施方案中,本公开的脂肪酶可用于制备肉味和/或香气。在另一实施方案中,本公开的脂肪酶可用于改性油和脂肪。在另一实施方案中,本公开的脂肪酶可用于酶促油脱胶。在另一实施方案中,本公开的脂肪酶可用于产生乙醇。

[0058] 本文所用的术语“烘焙产品”包括诸如面包、脆皮卷、三明治面包、小奶油面包、长棍面包、夏巴塔、羊角面包,以及精细烘焙食品,如炸面圈、奶油鸡蛋卷、葡萄干甜面包、蛋糕、小松饼等。

[0059] 本文所用的术语“面团”定义为面粉、盐、酵母和水的混合物,其可在烘焙前揉和、模制、成型或碾压。此外,也可以使用其他成分,如糖、人造黄油、蛋、乳等。该术语包括用于制备烘焙商品如面包、面包卷、三明治面包、长棍面包、夏巴塔、羊角面包、甜酵母面团等的面团。

[0060] 本文所用的术语“面包体积”是通过用激光扫描仪(例如Volscan Profiler ex Micro Stable System)测量体积以及比体积而测定的烘焙商品的体积。该术语还包括通过测量某些烘焙商品的长度、宽度和高度而测定的体积。

[0061] 本文所用的术语“包含”与“包括”、“含有”或“表征为”同义,且是包容性的或开放性的,不排除其他未引用的要素或方法步骤。

[0062] 应理解,本文所述的本发明的方面和实施方案包括“由方面和实施方案组成”和/或“基本由方面和实施方案组成”。

[0063] 本公开通篇中,多种方面以范围型式呈现。应理解,范围型式的描述仅仅是为了方便和简洁,不应解释为对本公开的范围的僵化限制。因此,范围的描述应视为已明确公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,如1至6的范围描述应视为已明确公开了如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等的子范围,以及该范围内的单个数字,例如1、2、3、4、5和6。无论范围的宽度如何,这都适用。

[0064] 本公开的其他目的、优势和特征将从以下说明书结合附图变得显而易见。

[0065] 在以下描述中,给出许多具体细节以提供对本公开的更充分理解。但是,对本领域技术人员而言,显而易见的是,可以在没有一个或多个这些具体细节的情况下实施本公开的方法。在其他情况下,为了避免模糊本公开,未描述本领域技术人员公知的公知特征和方法。

[0066] 实施例1:脂肪酶表达和纯化

[0067] 表达

[0068] 通过构建含有编码多核苷酸序列的表达质粒、转化入巴斯德毕赤酵母 (*Komagataella phaffii*) 并按以下方式培养所得到的表达菌株来获得酶。通过将序列经确认的菌株的甘油原种涂布在含Zeocin的酵母提取物蛋白胨葡萄糖 (YPD) 琼脂平板上来获得表达菌株的新鲜巴斯德毕赤酵母细胞。2天后,用来自这些平板的细胞将产生菌株的起子种子培养物接种入100mL缓冲甘油复合培养基 (BMGY),并在30°C、225-250转/分钟培养20-24小时。通过适量转入折流反应器中的2-4L BMMY培养基来放大种子培养物。在30°C和平桨叶搅拌浆提供的1100转/分钟搅拌下进行发酵48-72小时。发酵的起始批次期之后,无论何时培养物中溶解氧水平下降至30%以下,加入经除菌过滤的甲醇作为补料。备选地,每3小时按起始批次培养物的0.5% v/v加入补料。最终发酵液在4°C 7000xg离心30分钟以获得无细胞上清。

[0069] 纯化

[0070] 过滤通过纱布 (cheese-cloth) 后,用截留分子量5kD的实验室规模切向流过滤 (TFF) 系统 (SpectrumLabs) 超滤无细胞上清。样品首先浓缩10-20X,然后缓冲液交换5X入50mM HEPES pH 7.5。得到的截留物27000xg离心1小时,然后通过0.2 $\mu$ m滤器除菌过滤,以去除任何产生微生物或颗粒物质。用Bradford测定法测定最终样品的总蛋白质含量。脂肪酶-20°C保存在溶液中,或冷冻干燥形成粉末。在一些情况下,将脂肪酶溶液按0.5mg脂肪酶/g面粉喷雾在全谷物面粉上,然后40°C干燥。

脂肪酶	MW, kDa	pI	来源
Lip24	50.73	4.38	假单胞菌属物种( <i>Pseudomonas sp</i> )
Lip49	35.6	4.58	<i>Moritella marina</i>
Lip61	34.12	7.06	腐皮镰刀菌
Lip62	34.13	7.06	腐皮镰刀菌 Jallouli 等 “The galactolipase activity of <i>Fusarium solani</i> (phospho)lipase.” <i>Biochim Biophys Acta</i> . 2015 年 3 月;1851(3):282-9. doi: 10.1016/j.bbali.2014.12.010. Epub 2014 年 12 月 18 日 PMID: 25529980
Lip70	34.05	4.37	<i>Colletotrichum fiorinae</i>
Lip88	34.19	7.12	腐皮镰刀菌 US6645749-SEQ ID NO:2
PANAMORE GOLDEN (DSM) 2.2	36.9	5.19	大刀镰刀菌 WO2009106575-SEQ ID NO:2
LIPOPAN F (Novozymes)	36.56	6.85	尖孢镰刀菌 WO1998026057-SEQ ID NO:2

[0071] 实施例2:脂肪酶活性

[0072] 人工底物

[0073] 使用人工底物对硝基苯辛酸酯 (C8-PNP, Sigma 21742), 通过分光光度计检测生色产物对硝基苯基 (PNP) 来测定脂肪酶活性。将 C8-PNP 按 8mM 溶解在 2-乙氧基乙醇 (Alfa Aesar) 中, 然后在 50mM Hepes pH 7.5, 0.1M NaCl (底物测定缓冲液) 中稀释至 0.4mM。按 0.1-1 $\mu$ g/mL 之间的终浓度将脂肪酶原液加至底物测定缓冲液, 然后立即在酶标仪 (plate reader) 中通过 405nm 吸光度在 30 $^{\circ}$ C 监测 PNP 形成 15 分钟。用 A405 值对时间的线性斜率和标准 PNP 曲线来计算每  $\mu$ g 酶的酶活性。类似地, 用相同的测定来测量活性: a) 在不同 pH 值 (4.0-12.0), 使用适当 pH 缓冲液和该 pH 值下的 PNP 标准曲线; b) 在不同温度 (25 $^{\circ}$ C - 65 $^{\circ}$ C); c) 在不同辅因子或盐浓度 (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, EDTA) 存在下; d) 用多种脂肪酸链长的不同 PNP 底物 (C4-C18, Sigma)。结果显示在下表中。

脂肪酶	最适			
	pH	温度 $^{\circ}$ C	辅因子	脂肪酸链长
Lip24	7.5-8.0	30-35	Ca <sup>2+</sup>	C8~C14~C16>C4>C18
Lip49	8.5-10.5	35-40	Mg <sup>2+</sup>	C8>C14>C16~C18>C4
Lip61	8.5-10.0	30-50	无	C8~C14>C16>C4~C18
Lip62	8.5-10.5	25-40	无	C8>C14>C16>C4~C18
Lip70	7.0	25	无	C14>C16~C8>C4~C18
Lip88	8.0-10.5	37-55	无	C8>C14>C16>C4~C18
PANAMORE GOLDEN 2.2	8.5-10.0	30.0	无	C10

[0074] 天然脂质底物

[0075] 备选地, 用天然脂质底物和检测水解期间游离脂肪酸累积引起的 pH 变化的荧光 pH 指示剂测定脂肪酶活性。天然底物分离自下文所述面粉 (MGDG = 单半乳糖甘油二酯, DGDG = 双半乳糖甘油二酯, TAG = 三酰甘油) 或来自大豆卵磷脂的 PC (PC = 磷脂酰胆碱)。按 5mM 终浓度在 0.25% 脱氧胆酸钠中配制天然底物母液, 用超声 (1-5 分钟) 均匀分散脂质。为了在 pH 7.0-7.5 测量活性, 将脂肪酶按 0.1-1 $\mu$ g/mL 稀释在 2mM 底物、0.1% 脱氧胆酸钠、125ng/mL

荧光素、5mM CaCl<sub>2</sub>、0.5mM Hepes pH 7.5中,然后在30℃在488nm激发后测量520nm荧光发射15分钟。用荧光对时间的线性斜率的负值来计算每μg酶的脂肪酶活性。为了在pH 7.5-8.0测量活性,将脂肪酶按0.1-1μg/mL稀释在2mM底物、0.1%脱氧胆酸钠、250ng/mL SNARF-1 (ThermoScientific S22801)、5mM CaCl<sub>2</sub>、1mM Tris pH8.0中,然后在30℃在514nm激发后记录580nm荧光发射15分钟。用荧光对时间的线性斜率来计算每μg酶的脂肪酶活性。

[0078] 从面粉或大豆卵磷脂提取天然底物

[0079] 将550型面粉 (Vogtmühlen Illertissen) (1000g) 连同2500mL甲醇加至6L四颈圆底烧瓶。然后在室温下用机械搅拌桨搅拌烧瓶内容物1.5小时。此时期后,使混合物沉降,倒出溶剂,通过真空过滤通过硅胶/Celite垫过滤。然后按前述用另一2500mL甲醇再次提取剩余小麦面粉。

[0080] 提取后,按前述通过硅胶/Celite过滤烧瓶的全部内容物,并用甲醇充分洗涤,以最小化脂质产物损失。将两份提取物组合,并用旋转蒸发器浓缩产生金棕色糖浆。然后通过装入烧结玻璃漏斗的硅胶垫纯化组合的提取物,以从极性组分分离脂肪、非极性组分,即MGDG和DGDG。通过将硅胶装入500mL烧结玻璃漏斗并应用真空确保垫子完全装填来制备硅胶垫。然后用巴斯德吸管小心地将原料加至硅胶垫以确保样品的均匀分布。然后用正庚烷-丙酮(1:1,2L)、正庚烷-丙酮(1:4,2L)、丙酮(1L)和丙酮-甲醇(4:1,1L)洗脱样品。收集级分(1L),从TLC分析可知,级分2包含大部分非极性组分(甘油三酯、甘油二酯、甘油一酯),而观察到级分3-4包含MGDG,级分5-6包含DGDG。用旋转蒸发器分别浓缩这些级分并进一步纯化。进行快速层析纯化级分2的剩余部分(甘油三酯、甘油二酯、甘油一酯)。

[0081] 柱层析首先用正庚烷然后用正庚烷:丙酮(4:1)和正庚烷:丙酮(1:1)进行。通过TLC分析监测柱层析的进展,相应地提高用于洗脱的溶剂系统的极性。然后对从柱回收的级分进行TLC分析,以评价可以组合哪些级分来产生甘油三酯、甘油二酯、甘油一酯的纯样品。用旋转蒸发器浓缩组合的级分。进行快速层析纯化级分3-4的剩余部分(含MGDG的级分)。首先用正庚烷然后用正庚烷:丙酮(1:1)进行柱层析。通过TLC分析监测柱层析的进展,相应地提高用于洗脱的溶剂系统的极性。然后对从柱回收的级分进行TLC分析,以评价浓缩前可以组合哪些级分。进行快速层析纯化级分5-6的剩余部分(含DGDG的级分)。用正庚烷:丙酮(1:1)、正庚烷:丙酮(1:4)和最后仅用丙酮进行柱层析。通过TLC分析监测柱层析的进展,相应地改变溶剂系统。然后对从柱回收的级分进行TLC分析,以评价浓缩前可以组合哪些级分。

[0082] 通过丙酮提取纯化磷脂,以从大豆卵磷脂去除甘油三酯和游离脂肪酸。将大豆卵磷脂(10g)与丙酮(30ml)在50ml管中混合,并混匀10分钟。将得到的浆液4000xg离心5分钟,取出并废弃丙酮相。用新鲜丙酮再提取不可溶磷脂3次。

缩写	脂肪酶天然底物和产物
TAG	三酰甘油
MGDG	单半乳糖甘油二酯
DGDG	双半乳糖甘油二酯
NAPE	N-酰基磷脂酰乙醇胺
PC	磷脂酰胆碱
MAG	单酰甘油
DAG	二酰甘油
FFA	游离脂肪酸
MGMG	单半乳糖甘油一酯
DGMG	双半乳糖甘油一酯

脂肪酶名称	氨基酸 SEQ ID No.	核酸 SEQ ID No.	活性
LIP24	1	2	三酰甘油脂肪酶
LIP49	3	4	三酰甘油脂肪酶
LIP61	5	6	半乳糖脂酶> 磷脂酶> 三酰甘油脂肪酶
LIP62	7	8	半乳糖脂酶> 磷脂酶>三酰甘油脂肪酶
LIP70	9	10	磷脂酶> 半乳糖脂酶
LIP88	11	12	半乳糖脂酶> 磷脂酶> 三酰甘油脂肪酶
PANAMORE GOLDEN 2.2	N/A	N/A	三酰甘油脂肪酶> 半乳糖脂酶>磷脂酶

[0085] 通过HPLC评估面团中的脂解活性

[0086] 用简化面团来测试脂肪酶同时及在希望条件下对若干底物的活性。从10g面粉 (US King Arthur面包面粉)、200mg盐和5.9ml水制备面团,按每个面团4或40 $\mu$ g酶补加酶。通过磁力混合混匀面团10分钟,然后在湿度控制室中30 $^{\circ}$ C孵育总计60分钟。在第10分钟和60分钟从每个面团取分析样品。对于脂质分析,将2g面团样品加至含有2ml 0.1N HCl和10ml 1-丁醇的小瓶中。使面团分散在溶剂中,以通过剪切匀浆 (VWR 250Homogenizer, 20x200mm探头) 提取脂质30秒。然后通过室温下4000xg离心5分钟来分离未溶解的脂质。取出有机相,并通过离心蒸发 (Savant SpeedVac SC210A&Trap RVT5105) 来蒸发,将得到的固体按1/10原体积重新溶解在异辛烷:丙酮:异丙醇 (2:1:1) 中用于分析。通过硅胶柱 (Chromolith Performance Si 100-4.6mm,Merck) HPLC分离脂质,并通过ELSD (Agilent 1260Infinity) 分析。

[0087] 用于脂质分离的层析方法源自Gerits等“Single run HPLC separation coupled to evaporative light scattering detection unravels wheat flour endogenous lipid redistribution during bread dough making”LWT-Food Science and Technology, 53 (2013) 426-433。用每种酶的四个样品 (即两个时间点和两种酶剂量) 来确定单个脂质种类是否由于酶处理而增加、减少或显示无变化。所测试的若干酶对宽范围的脂质种类显示活性,如下表和图1中所示。

符号释义								
-	化合物消耗							
+	化合物产生							
0	化合物无变化							
脂肪酶	TAG	MAG	FFA	MGDG	MGMG	DGDG	DGMG	NAPE
[0088] Lip24	-	+	+	0	0	0	0	0
Lip49	-	+	+	0	0	0	0	0
Lip61	-	-	+	-	+	-	0	-
Lip62	-	+	+	-	+	-	+	-
Lip70	0	-	+	-	+	-	+	-
Lip88	-	+	+	-	+	-	+	-
PANAMORE GOLDEN 2.2	-	-	+	-	+	-	+	-

[0089] 实施例4:烘焙试验Pistolet测试

[0090] 在快速直接面团系统Pistolet测试中测试了PANAMOREGOLDEN2.2、LIPOPAN F、LIP62、LIP61、LIP24、LIP49干脂肪酶和DATEM (LAMETOP 552) 以及溶液中的PANAMORE GOLDEN2.2、LIPOPAN F、LIP62、LIP61、LIP24、LIP49、LIP88脂肪酶和DATEM (LAMETOP 552) 的烘焙性能。将550型面粉 (Vogtmühlen Illertissen) (2000g)、120g压缩酵母、40g盐、30g葡萄糖、22g小麦淀粉、120ppm抗坏血酸、5ppm **Nutriline**<sup>®</sup> AM 100 (真菌 $\alpha$ -淀粉酶)、200ppm **Nutriline**<sup>®</sup> CS 30 (真菌木聚糖酶、纤维素酶、真菌 $\alpha$ -淀粉酶) 和1180g水在Kemper SP 15螺旋式混合器中按速度1混合5.5分钟并按速度2混合0.5分钟,最终面团温度28℃。静置12分钟后,将面团按比例变大(scale)至1500g的团块,滚圆,并再醒发12分钟。然后,通过使用自动面团分块机和滚圆机来将面团分块和滚圆为每个50g的30个团块。然后将面团团块在85%相对湿度下在35℃醒发35分钟(正常醒发)和45分钟(延长醒发)。12分钟醒发时间后,在面团团块中央压出凹槽。在柜式烤炉中240℃烘焙经醒发的面团团块12分钟,添加蒸汽15秒。

[0091] 将对面团特性和对最终烘焙商品的影响与阴性对照及与包含0.4% (基于面粉重量) DATEM (**Lametop**<sup>®</sup> 552) 的参考相比较。PANAMOREGOLDEN2.2按14ppm加入,LIPOPAN F按40ppm加入。

[0092] 通过相对于重量测量15个面包卷的长度、宽度和高度,来测定体积效应。阴性对照定义为0%。由烘焙师手工评价面团特性,并与阴性对照相比较进行描述。

[0093] 干脂肪酶和溶液中的脂肪酶的结果显示在下表中。

剂量 ( $\mu\text{g}$ 脂肪酶/g 面粉)	面包条比体积的%增加 正常醒发和干脂肪酶(Pistolet)						
	Lip62	Lip61	Lip24	Lip49	LIPOPAN F	PANAMORE GOLDEN 2.2	DATEM LT552
0.17			6				
0.33	6	5	9	1			
0.67	10	12	8	3	6	9	
1.34	11	10	5	3			
2.67				6			
5.34							
0.40%				3			11

剂量 ( $\mu\text{g}$ 脂肪酶/g 面粉)	面包条比体积的%增加 延长醒发和干脂肪酶(Pistolet)						
	Lip62	Lip61	Lip24	Lip49	LIPOPAN F	PANAMORE GOLDEN 2.2	DATEM LT552
0.167			13				
0.334	10	7	8	3			
0.668	14	13	10	5	10	12	
1.336	13	10	6	6			
2.672				6			
5.344							
0.40%				1			14

剂量 ( $\mu\text{g}$ 脂肪酶/g 面粉)	面包条比体积的%增加 正常醒发和作为溶液的脂肪酶(Pistolet)							
	Lip62	Lip61	Lip88	Lip49	Lip70	LIPOPAN F	PANAMORE GOLDEN 2.2	DATEM LT552
0.17	4							
0.33	9	4		3				
0.67	14	12	4	3		6	13	
1.34	13	11	6	6				
2.67	10	7	7	6	0			
3.33			9					
5.34		7		6	5			
0.40%								14

剂量 ( $\mu\text{g}$ 脂肪酶/g 面粉)	面包条比体积的%增加 延长醒发和作为溶液的脂肪酶(Pistolet)							
	Lip62	Lip61	Lip88	Lip49	Lip70	LIPOPAN F	PANAMORE GOLDEN 2.2	DATEM LT552
0.17	3							
0.33	7	6		8				
0.67	13	9	3	10		10	15	
1.34	12	12	7	10				
2.67	13	8	12	14	4			
3.33			13					
5.34		6		11	12			
0.40%								20

Lip62 的剂量 ( $\mu\text{g/g}$ 面粉)	DATEM (面粉的%)	面包条比体积增加% (Pistolet)	
		正常醒发	延长醒发
0	0	0	0
0	0.4	15	18
0.67	0	13	16
0.67	0.012	14	16
0.67	0.024	14	14
0.67	0.05	19	19

Lip62 的剂量 ( $\mu\text{g/g}$ 面粉)	DATEM (面粉的%)	面包条比体积增加% (Pistolet)	
		正常醒发	正常醒发
0	0	0	0
0	0.4	16	17
0.088	0.4	17	13
0.167	0.4	16	14
0.67	0.4	20	15

[0100] 实施例5:烘焙试验-长棍面包

[0101] 在法式长棍面包中测试了PANAMORE GOLDEN 2.2、LIPOPAN F、LIP62酶和DATEM (Lametop 552) 的烘焙性能。在烘焙试验之前,测试每种酶的活性(其在不同酶之间可以不同),然后测试每种酶来确定该酶的最适剂量,最后按最适剂量加入该酶。将面粉(参见下文面粉类型)(1000g)、25g压缩酵母、20g盐、60ppm抗坏血酸、3ppmNutrilife<sup>®</sup> AM 100(真菌 $\alpha$ -淀粉酶)、150ppmNutrilife<sup>®</sup> CS 30(真菌木聚糖酶、纤维素酶、真菌 $\alpha$ -淀粉酶)和650g水在Kemper SP 15螺旋式混合器中按速度1混合8分钟并按速度2混合4分钟,最终面团温度27 $^{\circ}\text{C}$ 。静置35分钟后,将面团分为350g的团块,滚圆,并醒发15分钟。然后,对面团团块进行模制,并在75%相对湿度下在27 $^{\circ}\text{C}$ 醒发120分钟(正常醒发)和150分钟(延长醒发)。切开经醒发的面团团块,在柜式烤炉中255 $^{\circ}\text{C}$ 烘焙25分钟,30秒后添加蒸汽。

[0102] 将对面团特性和对最终烘焙商品的影响与阴性对照及与包含0.4%(基于面粉重量)DATEM(Lametop<sup>®</sup> 552)的参考相比较。其他对照是PANAMORE GOLDEN2.2(14ppm)和LIPOPAN F(40ppm)。LIP62按60ppm或1.26 $\mu\text{g}$ 脂肪酶/g面粉加入。

[0103] 通过经激光扫描仪(Micro Stable Systems Volscan)测量面包条来测定体积效应。阴性对照定义为0%。由烘焙师手工评价面团特性,并与阴性对照相比较进行描述。

[0104] 使用德国面粉(550型Vogtmühlen Illertissen)和土耳其面粉的长棍面包烘焙试验的结果显示在下表中。

长棍面包烘焙试验	德国面粉的面包条比体积增加%	
	正常醒发	延长醒发
PANAMORE GOLDEN 2.2	15	20
LIPOPAN F	11	19
Lip62	17	20
DATEM (LT552)	16	21

长棍面包烘焙试验	土耳其面粉的面包条比体积增加%	
	正常醒发	延长醒发
PANOMORE GOLDEN 2.2	10	15
LIPOPAN F	19	19
Lip62	5	7
DATEM (LT552)	19	20

[0107] 实施例6:烘焙试验-甜酵母面团

[0108] 在甜酵母面团中测试了PANAMORE GOLDEN 2.2、LIPOPAN F、LIP62酶和DATEM (Lametop 552) 的烘焙性能。在烘焙试验之前,测试每种酶的活性(其不同酶之间可以不同),然后测试每种酶来确定该酶的最适剂量,最后按最适剂量加入该酶。将550型面粉(Vogtmühlen Illertissen) (2000g)、140g压缩酵母、30g盐、200g糖、200g人造黄油、100g蛋、50ppm抗坏血酸、200ppm **Nutriline**<sup>®</sup> CS 30(真菌木聚糖酶、纤维素酶、真菌 $\alpha$ -淀粉酶)和900g水在Kemper SP 15螺旋式混合器中按速度1混合6.5分钟并按速度2混合1.5分钟,最终面团温度26℃。静置25分钟后,将面团按比例变大至1500g的团块,滚圆,并再醒发20分钟。然后,通过使用自动面团分块机和滚圆机来将面团分块和滚圆为每个50g的30个团块。然后将8个面团团块放入烘焙模子,并在85%相对湿度下在35℃醒发50分钟。在柜式烤炉中210℃/255℃下方和上方加热烘焙经醒发的面团团块35分钟,添加蒸汽15秒。

[0109] 将对面团特性和对最终烘焙商品的影响,与阴性对照及与包含0.4%(基于面粉重量)DATEM (**Lametop**<sup>®</sup> 552) 的参考相比较。其他对照是PANAMORE GOLDEN2.2 (4ppm) 和LIPOPAN F (25ppm)。LIP62按25ppm (0.52 $\mu$ g脂肪酶/g面粉) 加入。

[0110] 通过经激光扫描仪(Micro Stable Systems Volscan) 测量面包条来测定体积效应。阴性对照定义为0%。由烘焙师手工评价面团特性,并与阴性对照相比较进行描述。

[0111] 甜面团和生发面块&面团烘焙试验的结果显示在下表中。

应用类型	德国面粉的面包条比体积增加%			
	PANAMORE GOLDEN 2.2	LIPOPAN F	Lip62	DATEM (LT552)
甜酵母面团	11	13	13	20

[0113] 实施例7:烘焙试验-生发面块(sponge)&面团

[0114] 在生发面块&面团方法中测试了PANAMORE GOLDEN 2.2、LIPOPAN F、LIP62酶和DATEM (Lametop 552) 的烘焙性能。在烘焙试验之前,测试每种酶的活性(其不同酶之间可以不同),然后测试每种酶来确定该酶的最适剂量,最后按最适剂量加入该酶。将550型面粉(Vogtmühlen Illertissen) (1000g)、5g压缩酵母和1000g水混匀,并在4℃或室温保存16小时。然后,将1000g 550型面粉(Vogtmühlen Illertissen)、55g压缩酵母、40g盐、40g糖、40g人造黄油、600ppm抗坏血酸、150ppm **Nutriline**<sup>®</sup> CS 30(真菌木聚糖酶、纤维素酶、真菌 $\alpha$ -淀粉酶)和160g水在Kemper SP 15螺旋式混合器中按速度1混合5.5分钟并按速度2混合0.5分钟,最终面团温度27℃。静置15分钟后,将面团分为450g的团块,滚圆,并醒发10分钟。然后,对面团团块进行模制,放入烘焙模子,并在85%相对湿度下在35℃醒发80分钟。在柜式烤炉中240℃/250℃下方和上方加热烘焙经醒发的面团团块30分钟,添加蒸汽15秒。

[0115] 将对面团特性和对最终烘焙商品的影响与阴性对照及与包含0.4%(基于面粉重

量) DATEM (**Lametop**<sup>®</sup> 552) 的参考相比较。其他对照是 PANAMORE GOLDEN 2.2 (7ppm) 和 LIPOPAN F (50ppm)。LIP62按1.2 $\mu$ g脂肪酶/g面粉加入。

[0116] 通过经激光扫描仪 (Micro Stable Systems Volscan) 测量面包条来测定体积效应。阴性对照定义为0%。由烘焙师手工评价面团特性, 并与阴性对照相比较进行描述。

生发面块&面团试验	德国面粉的面包条比体积增加%	
	4°C	室温
Panamore Golden 2.2	2	-1
Lipopan F	7	2
LIP62	4	1
DATEM (LT552)	12	9

[0118] 实施例8: 烘焙试验-Chorleywood面包方法

[0119] 在Chorleywood面包方法中测试了PANAMORE GOLDEN 2.2、LIPOPAN F、LIP62酶和DATEM (Lametop 552) 的烘焙性能。在烘焙试验之前, 测试每种酶的活性 (其不同酶之间可以不同), 然后测试每种酶来确定该酶的最适剂量, 最后按最适剂量加入该酶。在压力真空混合器 (Pentagon K5) 中混合英国面粉 (Heygates Standard) (3000)、240g压缩酵母、45g盐、60g改良物 (小麦面粉、硫酸钙、大豆粉、抗坏血酸、细菌木聚糖酶、真菌 $\alpha$ 淀粉酶) 和2010g水, 直至达到58.3kW/h的能量输入, 最终面团温度30°C。将面团分为450g团块 (无静置时间), 滚圆, 并醒发2分钟。然后, 对面团团块进行模制, 放入两个烘焙模子, 并在85%相对湿度下在35°C醒发55分钟。在烘焙之前, 用烘焙模子之一进行跌落测试, 其中烘焙模子从确定的高度跌落。然后, 在柜式烤炉中255°C/240°C下方和上方加热烘焙经醒发的面团团块25分钟, 添加蒸汽15秒。

[0120] 将对面团特性和对最终烘焙商品的影响与阴性对照及与包含0.4% (基于面粉重量) DATEM (**Lametop**<sup>®</sup> 552) 的参考相比较。其他对照是PANAMORE GOLDEN 2.2 (18ppm) 和 LIPOPAN F (30ppm)。LIP62按40ppm或0.8 $\mu$ g脂肪酶/g面粉加入。

[0121] 通过经激光扫描仪 (Micro Stable Systems Volscan) 测量面包条来测定体积效应。阴性对照定义为0%。由烘焙师手工评价面团特性, 并与阴性对照相比较进行描述。

Chorleywood 面包方法	英国面粉的面包条比体积增价%	
	正常醒发	跌落测试后
Panamore Golden 2.2	15	3
Lipopan F	17.5	-7
LIP62	16	37
DATEM (LT552)	34	23.5

## 序 列 表

<110> 巴斯夫欧洲公司(BASF SE )  
 <120> 烘焙脂肪酶  
 <130> 150300  
 <150> US 62/297582  
 <151> 2016-02-19  
 <160> 12  
 <170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1  
 <211> 474  
 <212> PRT  
 <213> 假单胞菌属(Pseudomonas)  
 <400> 1

Met Gly Val Phe Asp Tyr Lys Asn Leu Gly Ala Glu Gly Ser Lys Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Phe Ala Asp Ala Met Ala Ile Thr Leu Tyr Thr Tyr His Asn Leu  
                   20                   25                   30  
 Asp Asn Gly Phe Ala Val Gly Tyr Gln His Asn Gly Leu Gly Val Gly  
                   35                   40                   45  
 Leu Pro Ala Thr Leu Val Gly Ala Leu Leu Gly Ser Thr Asp Ser Gln  
                   50                   55                   60  
 [0001] Gly Val Ile Pro Gly Ile Pro Trp Asn Pro Asp Ser Glu Lys Ala Ala  
 65                   70                   75                   80  
 Leu Glu Ala Val Gln Lys Ala Gly Trp Thr Pro Ile Ser Ala Ser Thr  
                   85                   90                   95  
 Leu Gly Tyr Thr Gly Lys Val Asp Ala Arg Gly Thr Phe Phe Gly Glu  
                   100                   105                   110  
 Lys Ala Gly Tyr Thr Thr Ala Gln Val Glu Val Leu Gly Lys Tyr Asp  
                   115                   120                   125  
 Asp Ala Gly Gln Leu Gln Glu Ile Gly Ile Gly Phe Arg Gly Thr Ser  
                   130                   135                   140  
 Gly Pro Arg Glu Thr Leu Ile Thr Asp Ser Ile Gly Asp Leu Val Ser  
 145                   150                   155                   160  
 Asp Leu Leu Ala Ala Leu Gly Pro Lys Asp Tyr Ala Lys Asn Tyr Ala  
                   165                   170                   175  
 Gly Glu Ala Phe Gly Gly Leu Leu Lys Ser Val Ala Glu Tyr Ala Ala  
                   180                   185                   190  
 Ala His Gly Leu Ser Gly Gln Asp Val Leu Val Ser Gly His Ser Leu  
                   195                   200                   205  
 Gly Gly Leu Ala Val Asn Ser Met Ala Asp Leu Ser Asp Ala Lys Trp  
                   210                   215                   220  
 Ser Gly Phe Tyr Lys Asp Ala Asn Tyr Leu Ala Tyr Ala Ser Pro Thr  
 225                   230                   235                   240  
 Gln Ser Ala Ser Asp Lys Val Leu Asn Ile Gly Tyr Glu Asn Asp Pro

	245	250	255
Val Phe Arg Ala Leu Asp Gly Ser Ser Ala Asn Leu Ser Thr Leu Gly			
	260	265	270
Val His Asp Lys Pro His Glu Ser Thr Thr Asp Asn Ile Val Ser Phe			
	275	280	285
Asn Asp His Tyr Ala Ser Thr Leu Trp Asn Val Leu Pro Phe Ser Ile			
	290	295	300
Ala Asn Leu Pro Thr Trp Ile Ser His Leu Pro Thr Gly Tyr Gly Asp			
305	310	315	320
Gly Met Gly Arg Ile Leu Glu Ser Gly Phe Tyr Glu Gln Met Thr Arg			
	325	330	335
Asp Ser Thr Ile Ile Val Ala Asn Leu Ser Asp Pro Ala Arg Ala Thr			
	340	345	350
Thr Trp Val Gln Asp Leu Asn Arg Asn Ala Glu Pro His Thr Gly Asp			
	355	360	365
Thr Phe Ile Ile Gly Ser Asp Gly Asp Asp Leu Ile Leu Gly Gly Lys			
	370	375	380
Gly Ala Asp Phe Ile Glu Gly Gly Lys Gly Asn Asp Thr Ile Arg Asp			
385	390	395	400
Ser Ser Gly His Asn Thr Phe Leu Phe Ser Gly Gln Phe Gly Gln Asp			
	405	410	415
Arg Ile Ile Gly Tyr Gln Pro Thr Asp Lys Leu Val Phe Gln Gly Val			
	420	425	430
Ala Gly Ser Gly Asp Tyr Arg Asp His Ala Lys Val Val Gly Gly Asp			
	435	440	445
Thr Val Ile Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Thr Leu Val Gly Val Ser			
	450	455	460
Gly Val Leu Gly Glu Gly Val Val Ile Gly			
465	470		

[0002]

<210> 2  
 <211> 1422  
 <212> DNA  
 <213> 假单胞菌属  
 <400> 2

atgggtgtgt ttgactataa aaaccttggg gccgaggctt ccaaggcctt gtttgccgat	60
gccatggcga tcacttgta tacctaccac aaacctggata acggctttgc cgtgggctac	120
cagcacaatg gcctggcgt cggttgcg gctactctgg tcggcgcatt gctcggcagt	180
acggactccc aggggtgat cccaggcatt ccctggaacc cggattcgga gaaggccgcg	240
ctegaagcgg tgcagaaggc cggtggacg cccatcagcg ccagcacctt cgggtatacc	300
ggcaaggtcg acgccgggg cacgttcttc ggcgaaaagg cggctacac cacggcccag	360
gtcaggtgc tgggcaagta cgatgacgcg ggccagttgc aggaaatcgg catcggtttt	420
cgcgccacgt ctggcccaag gaaacactg atcaccgact ccatcggcga tctggtcagc	480
gacctgcttg ctgcctggg tcccaaggat tacgcaaaga actacgccg cgaagcattc	540
ggcgcttgc tcaagagcgt cgccgagtat gcggcgccc acggtctcag cggccaggat	600

```

gtgctgggtca gcggccatag cctcggcggc ctggcgggtca acagcatggc cgacttgagc      660
gacgccaagt ggtccgggtt ctataaggac gccaactact tggcctacgc ctcaccgacc      720
cagagtgccca gcgacaaggt gcttaatatc ggctacgaaa acgaccgggt gttccgcgcc      780
ctggacggct catccgcaa cctgtcgcag ctcgggtgttc acgacaaacc ccacgagtc      840
accactgaca acattgtcag cttcaacgat cactacgcct cgaccctgtg gaatgtgctg      900
ccgttttcca tcgccaatct gccgacttgg atctcgcact tgccgaccgg ctacggcgac      960
ggcatggggc gcattctgga gtccgggttc tatgaacaga tgaccgggga ctcgacgatt     1020
atcgtggcca atctatccga cccggcacgg gccaccactt gggttcagga cctgaaccgc     1080
aacgccgaac cgcacacagg cgacactttc atcattggca gcgatggcga tgatctgac     1140
ctgggcggca agggcgcgga ctttatcgaa ggcggcaagg gcaatgacac gatccgcgac     1200
agcagcgggc ataacacctt tttgttcagc ggccagtttg ggcaggatcg gattatcgg     1260
tatcagccga cggataaact cgtgttccag ggtgtggcgg gcagcgggga ttaccgtgat     1320
cacgccaagg tgggtgggtg ggatacgtg atcagtttcg gggcggattc ggtgacgtta     1380
gtgggcgtta gcggggtgtt gggggagggg gttgtgatcg gc      1422

```

<210> 3  
 <211> 334  
 <212> PRT  
 <213> *Moritella marina*  
 <400> 3

[0003]

```

Met Phe Lys Ile Asn Arg Ile Leu Phe Ser Val Phe Val Ala Ile Met
1           5           10           15
Cys Phe Met Val Ala Pro Ala Gln Ala Asp Ser Ser Gly Ile Asp Arg
           20           25           30
Ser Gly Lys Thr Lys Tyr Pro Val Val Leu Val His Gly Leu Ser Gly
           35           40           45
Phe Asp Ser Val Phe Ala Asp Tyr Phe Tyr Gly Val Lys Gly Ala Leu
           50           55           60
Ala Ser Val Gly Ser Thr Glu Val Tyr Thr Pro Leu Ile Thr Gly Phe
65           70           75           80
Asn Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Ser Tyr Leu Glu Asp
           85           90           95
Leu Lys Ala Val Thr Gly Ala Gln Lys Phe Asn Leu Ile Gly His Ser
           100          105          110
Gln Gly Gly Ile Asp Ala Arg Tyr Val Ala Ser Val Arg Pro Asp Leu
           115          120          125
Val Ala Ser Val Thr Ser Val Gly Ser Pro His Phe Gly Ser Gly Thr
           130          135          140
Ala Asp Leu Val Lys Asp Ser Pro Leu Glu Gly Ala Ala Met Asp Ile
145          150          155          160
Gly Asn Ala Val Gly Ala Leu Leu Ala Ala Val Thr Gly Asp Thr Ser
           165          170          175
Gln Gln Val Asp Ala Met Gly Ala Leu Glu Ala Leu Asn Ser Ala Asp
           180          185          190

```

Ala Ala Val Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Glu Gly Leu Arg Gln Gly Asp  
 195 200 205  
 Cys Gln Glu Thr Pro Arg Tyr Asn Ala Gly Ser Trp Trp Trp Pro Asn  
 210 215 220  
 Trp Val Tyr Asp Tyr Ser Val Asn Asp Gly Glu His Asn Val Asn Gly  
 225 230 235 240  
 Val Ala Tyr Tyr Ser Trp Gly Gly Thr Tyr Asn Pro Val Phe Asn Ser  
 245 250 255  
 Asn Val Leu Asp Leu Ala Asp Gly Leu Leu Ala Ala Ala Tyr Leu Thr  
 260 265 270  
 Ile Asp Glu Ser Asn Asp Gly Val Val Gly Arg Cys Ser Thr His Leu  
 275 280 285  
 Gly Gln Val Ile Arg Asp Asp Tyr Thr Met Asn His Ala Asp Glu Ile  
 290 295 300  
 Asn Gly Met Phe Gly Leu Arg Gly Leu Gly Thr Thr Ser Pro Leu Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Tyr Val Glu His Ala Arg Arg Leu Thr Arg Ala Gly Leu  
 325 330

<210> 4

<211> 1005

<212> DNA

[0004]

<213> *Moritella marina*

<400> 4

atgtttaaaa taaatcggat tttattctca gtctttgtcg ccatcatgtg ttttatggtt 60  
 gcaccggcac aagcagatag ttcaggaata gatagatcag gaaaaacaaa ataccgggta 120  
 gttttagtac atggcctttc aggttttgac agcgtgtttg cagattatit ttatggcgta 180  
 aaaggcgcgt tagccagtgt tggttctacc gaggtatata caccactgat tacgggattt 240  
 aatacagagt aagtacgtgg agagcaattg ctgagttatc tggaggattt gaaagcggtc 300  
 accggtgcgc aaaaatttaa cctaataggc cattctcaag gtggtatcga tgcacgttac 360  
 gtggcttccg ttcgaccaga cttagtcgcg tgggttactt ctgtttggtc tccccatttt 420  
 ggctctggca ctgcagattt agttaaagat tcgccactcg aagggtgcagc tatggatata 480  
 ggtaatgctg tgggtgcact tttagcggct gttaccgggg atacatcgca gcaggtagat 540  
 gccatggggg ctcttgaagc attaaattca gcggatgcgg cggttttcaa tgctaaatat 600  
 cctgaagggt tacgicaggg ggattgtcag gaaaccctc gttataatgc cggttcttgg 660  
 tgggtggccaa attgggttta tgattactct gttaatgatg gtgagcacia cgtaaattgt 720  
 gtggettatt actcatgggg aggaacttac aaccctgtgt ttaattcaaa tgtgctggat 780  
 ctggctgatg gtttgttagc ggcagcctat ttgactatcg atgagtcaaa cgatgggtgc 840  
 gttggccgct gctcaacgca tctgggccag gttatctgtg atgactatac catgaatcac 900  
 gcagacgaga taaatggaat gtttggttta cgtggtttgg gtacaacgag cccattacct 960  
 ttatatgtgg agcatgcaag acgtctgact cgtgcggggt tgtaa 1005

<210> 5

<211> 317

<212> PRT

<213> 腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani*)

<400> 5

Ala Ile Thr Ala Ser Thr Leu Asp Tyr Glu Asn Phe Lys Phe Tyr Ile  
1 5 10 15

Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Thr Ala Ser Gly Glu  
20 25 30

Lys Ile Thr Cys Ser Asp Ser Ala Cys Lys Val Val Glu Ala Asn Asn  
35 40 45

Val Val Val Val Ala Ser Phe Val Gly Thr Gly Thr Gly Ile Gly Gly  
50 55 60

Tyr Val Ser Thr Asp Asp Ile Arg Lys Glu Ile Val Leu Ser Ile Arg  
65 70 75 80

Gly Ser Ser Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Val Asp Phe Gly Gln  
85 90 95

Ser Gly Cys Ser Tyr Val Lys Asp Cys Gly Val His Thr Gly Phe Arg  
100 105 110

Asn Ala Trp Asp Glu Ile Ala Gln Arg Ala Arg Asp Ala Ile Ala Lys  
115 120 125

Ala Arg Ala Lys Asn Pro Ser Tyr Lys Val Ile Ala Thr Gly His Ser  
130 135 140

[0005]

Leu Gly Gly Ala Val Ala Thr Leu Gly Gly Ala Asp Leu Arg Ser Lys  
145 150 155 160

Gly Thr Ala Val Asp Ile Phe Thr Phe Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn  
165 170 175

Ala Glu Leu Ser Ala Phe Ile Thr Ser Gln Ala Gly Gly Glu Phe Arg  
180 185 190

Val Thr His Gly Arg Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Ile Val Phe  
195 200 205

Gly Tyr Arg His Thr Ser Pro Glu Tyr Trp Leu Ala Gly Gly Ala Ser  
210 215 220

Thr Lys Ile Asp Tyr Ser Val Asn Asp Ile Glu Val Cys Glu Gly Ser  
225 230 235 240

Ala Asn Leu Ala Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Val Ala  
245 250 255

His Leu Arg Tyr Phe Gln Asn Thr Asp Ala Cys Thr Ala Gly Gly Ile  
260 265 270

Ser Trp Lys Arg Gly Asp Lys Ala Lys Arg Asn Glu Ile Pro Lys Arg  
275 280 285

Arg Asp Ser Met Thr Asp Glu Glu Leu Glu Arg Lys Leu Asn Asp Tyr  
290 295 300

Val Ala Met Asp Lys Glu Tyr Val Glu Ser Asn Lys Met  
305 310 315

<210> 6

<211> 954  
 <212> DNA  
 <213> 腐皮镰刀菌  
 <400> 6  
 gccattactg cttctacttt agattatgaa aatttcaaat tttacatcca acacggtgcc 60  
 gctgcttact gtaattctga gactgcctct ggagaaaaga taacttggtc cgactccgct 120  
 tgtaaggttg ttgaggccaa caacgctggt gttgtggcct ccttcggttg tactggtact 180  
 ggaattgggtg gttacgtttc tactgatgac attcgtaaag aaatcgttct atccattaga 240  
 ggtagtctta acattagaaa ctggttaact aacgctgatt tcggtcaatc tggttgttct 300  
 tacgtcaagg attgtggtgt tcacactggt ttcagaaacg catgggacga aatcgctcag 360  
  
 agagcccgtg atgctattgc aaaggccaga gctaaaaacc catcttaca ggttattgca 420  
 actggtcact ctctaggagg tgcagttgct actttagggt gtgccgactt gcgatcaaag 480  
 ggtaccgceg ttgacatctt taccttcgga gctcctcgtg tcgggaacgc cgagcttagc 540  
 gctttcatca caagcaagc tgggtggtgaa ttcagagtga ctcacggtag agaccctgtt 600  
 cctagactgc ctccaatcgt gtttggttac agacatactt ccccagagta ctggctagcc 660  
 ggtggtgcct ccactaagat cgattattct gttaatgata tcgaagtctg tgagggttcc 720  
 gccaaacttg cttgtaatgg tggtagcttg ggtctagata ttgtcgtcct cttgagatac 780  
 tttcaaaaca ccgatgcctg taccgctggt ggaatttctt ggaagagagg agataaggct 840  
 aaacgtaacg agattcctaa gagaagagac tccatgaccg atgaggagtt agagagaaaag 900  
 ctcaacgact acgtggctat ggacaaggag tacgtagaat ccaacaagat gtaa 954

[0006]

<210> 7  
 <211> 317  
 <212> PRT  
 <213> 腐皮镰刀菌  
 <400> 7  
 Ala Ile Thr Ala Ser Gln Leu Asp Tyr Glu Asn Phe Lys Phe Tyr Ile  
 1 5 10 15  
 Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Thr Ala Ser Gly Gln  
 20 25 30  
 Lys Ile Thr Cys Ser Asp Asn Gly Cys Lys Gly Val Glu Ala Asn Asn  
 35 40 45  
 Ala Ile Ile Val Ala Ser Phe Val Gly Lys Gly Thr Gly Ile Gly Gly  
 50 55 60  
 Tyr Val Ser Thr Asp Asn Val Arg Lys Glu Ile Val Leu Ser Ile Arg  
 65 70 75 80  
 Gly Ser Ser Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Val Asp Phe Gly Gln  
 85 90 95  
 Ser Ser Cys Ser Tyr Val Arg Asp Cys Gly Val His Thr Gly Phe Arg  
 100 105 110  
 Asn Ala Trp Asp Glu Ile Ala Gln Arg Ala Arg Asp Ala Val Ala Lys  
 115 120 125  
 Ala Arg Thr Met Asn Pro Ser Tyr Lys Val Ile Ala Thr Gly His Ser  
 130 135 140

Leu Gly Gly Ala Val Ala Thr Leu Gly Ala Ala Asp Leu Arg Ser Lys  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Ala Val Asp Ile Phe Thr Phe Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn  
 165 170 175  
 Ala Glu Leu Ser Ala Phe Ile Thr Ala Gln Ala Gly Gly Glu Phe Arg  
 180 185 190  
 Val Thr His Gly Arg Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Ile Val Phe  
 195 200 205  
 Gly Tyr Arg His Thr Ser Pro Glu Tyr Trp Leu Ala Gly Gly Ala Ser  
 210 215 220  
 Thr Lys Thr Asp Tyr Thr Val Asn Asp Ile Lys Val Cys Glu Gly Ala  
 225 230 235 240  
 Ala Asn Leu Ala Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ile Ala  
 245 250 255  
 His Leu Arg Tyr Phe Gln Asp Thr Asp Ala Cys Thr Ala Gly Gly Ile  
 260 265 270  
 Ser Trp Lys Arg Gly Asp Lys Ala Lys Arg Asp Glu Ile Pro Lys Arg  
 275 280 285  
 Gln Glu Gly Met Thr Asp Glu Glu Leu Glu Gln Lys Leu Asn Asp Tyr  
 290 295 300  
 Val Ala Met Asp Lys Glu Tyr Val Glu Ser Asn Lys Met  
 305 310 315

[0007]

<210> 8  
 <211> 954  
 <212> DNA  
 <213> 腐皮镰刀菌  
 <400> 8  
 gccattactg ettctcaatt ggactacgaa aacttcaagt tttacatcca gcacggtgcc 60  
 gctgcttact gtaactccga aactgcctct ggtcaaaaga tcaactgttc cgacaacggt 120  
 tgcaaagggtg tcgaagetaa caacgctatt attgtgcct ctttcgttgg aaaagggtact 180  
 ggtattgggtg gttacgtttc tactgataac gttagaaagg agatcgtttt gtctattaga 240  
 ggttcttcca acattcgtaa ctggttgact aacgtcgact tcggacaatc ctcttgttct 300  
 tacgtagag attgtggagt tcacactggt ttcagaaatg cttgggacga gattgcccaa 360  
 agagctagag acgctgtcgc taaagctaga actatgaacc catcttaca ggttatcgt 420  
 actggtcact ctttgggtgg tgctgttgc actttgggtg ctgctgattt gagatccaag 480  
 ggtactgccg tcgatatctt tacttttggg gccccaagag ttggtaacgc tgagttgtcc 540  
 gctttcatca ctgctcaggc tgggtgtgag ttcagagtta ctcacggacg tgatccagtt 600  
 ccacgtttgc cacctatcgt ctctcggttac agacacacct ctccagagta ctggttggt 660  
 ggtggtgctt ccaccaagac tgattatact gttaacgata tcaaggtttg tgaagggtgcc 720  
 gctaacttgg cctgtaatgg tggtactttg ggattggata tcattgctca tttgagatac 780  
 ttccaagaca ctgaagcctg tactgctggt ggtatctcct ggaagagagg tgacaaagct 840  
 aagagagatg agattccaaa aagacaagaa ggaatgactg atgaggagt ggaacaaaa 900  
 ctgaacgact atgtgccat ggataaggag tacgttgagt ccaacaagat gtaa 954

<210> 9  
 <211> 322  
 <212> PRT  
 <213> Colletotrichum fiorinae  
 <400> 9  
 Ser Pro Leu Leu Asp Ala Arg Ala Pro Val Ala Ala Leu Asp Glu Arg  
 1                   5                   10                   15  
 Ala Val Thr Val Ser Ser Ala Asp Leu Ser Asn Phe Glu Tyr Tyr Val  
                   20                   25                   30  
 Gln Met Val Ala Ala Thr Ser Cys Asn Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ala  
                   35                   40                   45  
 Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Ala Cys Pro Asp Val Thr Ala Asn Gly  
                   50                   55                   60  
 Gly Lys Ile Val Gly Thr Phe Ser Gly Leu Val Ser Gly Leu Glu Gly  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Val Ala Thr Asp Pro Val Arg Lys Asn Ile Val Ile Ala Ile Arg  
                   85                   90                   95  
 Gly Ser Ser Asn Val Arg Asn Trp Ile Thr Asn Ile Leu Phe Gly Phe  
                   100                   105                   110  
 Asp Asp Cys Asp Phe Val Asp Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Ala  
                   115                   120                   125  
 Asn Gly Trp Asp Glu Ile Lys Asp Ser Leu Leu Ala Ser Val Lys Ser  
 [0008]           130                   135                   140  
 Ala Lys Ala Ala Asn Pro Ser Tyr Thr Ile Val Gly Thr Gly His Ser  
 145                   150                   155                   160  
 Leu Gly Gly Ala Val Val Thr Ile Ala Ala Ala Asp Leu Arg Arg Asp  
                   165                   170                   175  
 Gly Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn  
                   180                   185                   190  
 Ala Ala Phe Thr Asn Phe Val Thr Ala Gln Ala Gly Ala Glu Tyr Arg  
                   195                   200                   205  
 Val Thr His Val Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Ile Leu Phe  
                   210                   215                   220  
 Gly Tyr Arg His Thr Ser Pro Glu Tyr Trp Leu Ser Thr Gly Asn Ala  
 225                   230                   235                   240  
 Thr Thr Val Asp Tyr Ala Val Ala Asp Ile Lys Val Cys Glu Gly Ala  
                   245                   250                   255  
 Ala Asn Thr Lys Cys Asn Gly Gly Thr Phe Gly Leu Asp Val Asp Ala  
                   260                   265                   270  
 His Leu Tyr Tyr Leu Arg Arg Thr Gly Ala Cys Ser Thr Asp Gly Phe  
                   275                   280                   285  
 Gly Ile Lys Glu Arg Glu Glu Asp Ile Ser Asp Glu Asp Leu Ala Ala  
                   290                   295                   300  
 Arg Leu Thr Ala Trp Ala Gln Gln Asp Ile Glu Tyr Ala Ala Ser Leu  
 305                   310                   315                   320

Glu Glu

<210> 10

<211> 966

<212> DNA

<213> Colletotrichum fiorinae

<400> 10

```
tctccattgt tggatgcccg tgccccagtc gctgctctgg atgaacgtgc tgttactgtt      60
tcttctgctg atctttccaa ttttgagtac tacgtccaga tggttgctgc tacctcttgt      120
aattctgaag ctgccgccgg tgcttctatt acctgttctg ctgacgcttg tcttgacggt      180
actgctaatt gtggaaagat cgtttggtacc ttctccggat tggtttctgg tcttgagggt      240
ttcgtcgcca ctgaccctgt tagaaagaat attggtattg ctattagagg ttctctaat      300
gtagaaaatt ggattactaa tatcttgctc ggttttgacg actgtgactt cgttgacggt      360
tgtaaggctc ataccggatt cgctaacggt tgggacgaaa tcaaggactc cttgttggtc      420
tccgtcaagt ctgctaaggc tgccaaccct tcttacacta tcgttggtac cggacactct      480
ttgggtgggt ccgttgttac tattgctgct gccgattga gaagagacgg ttaccctgtc      540
gacatctaca cttatggate tccaagagtt ggtaacgctg ctttcaccaa cttgtttacc      600
gctcaggctg gtgctgagta cagagttacc cacgtcgatg acccagttcc aagactgcca      660
cctatcttgt tcggatacag acacacctcc ccagagtact ggctgtccac cggaaacgct      720
actactgtcg actacgctgt cgccgacatt aaggtctgtg aaggtgctgc taacaccaag      780
tgtaacgggt gtacttttgg tttggacgtc gacgctcacc ttactactt gcgtagaact      840
[0009] ggtgectgtt ccaactgatg atteggtatt aaagagcgtg aggaagatat ttctgacgag      900
gacttgcccg ctagactgac tgcttgggcc caacaggaca ttgaatatgc tgcttcttgg      960
gaggag                                             966
```

<210> 11

<211> 317

<212> PRT

<213> 腐皮镰刀菌

<400> 11

```
Ala Ile Thr Ala Ser Gln Leu Asp Tyr Glu Asn Phe Lys Phe Tyr Ile
1           5           10           15
Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Thr Ala Ser Gly Gln
           20           25           30
Lys Ile Thr Cys Asn Asp Asn Gly Cys Lys Gly Ile Glu Ala Asn Asn
           35           40           45
Ala Ile Ile Val Ala Ser Phe Val Gly Thr Gly Thr Gly Ile Gly Gly
           50           55           60
Tyr Val Ser Thr Asp Asn Val Arg Lys Glu Ile Val Leu Ser Ile Arg
65           70           75           80
Gly Ser Ser Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Val Asp Phe Gly Gln
           85           90           95
Ser Ser Cys Ser Tyr Val Arg Asp Cys Gly Val His Thr Gly Phe Arg
           100          105          110
```

Asn Ala Trp Asp Glu Ile Ala Gln Arg Ala Arg Asp Ala Val Ala Lys  
 115 120 125  
 Ala Arg Ala Met Asn Pro Ser Tyr Lys Val Ile Ser Thr Gly His Ser  
 130 135 140  
 Leu Gly Gly Ala Val Ala Thr Leu Gly Ala Ala Asp Leu Arg Ser Lys  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Ala Val Asp Ile Phe Thr Phe Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn  
 165 170 175  
 Ala Glu Leu Ser Ala Phe Ile Thr Ala Gln Ala Gly Gly Glu Phe Arg  
 180 185 190  
 Val Thr His Gly Arg Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Ile Val Phe  
 195 200 205  
 Gly Tyr Arg His Thr Ser Pro Glu Tyr Trp Leu Ala Gly Gly Ala Ser  
 210 215 220  
 Thr Lys Ile Asp Tyr Ser Val Asn Asp Ile Lys Val Cys Glu Gly Ala  
 225 230 235 240  
 Ala Asn Leu Ala Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ile Ala  
 245 250 255  
 His Leu Arg Tyr Phe Gln Asn Thr Asp Ala Cys Thr Ala Gly Gly Ile  
 260 265 270  
 Ser Trp Lys Arg Gly Asp Lys Ala Lys Arg Asp Glu Ile Pro Lys Arg  
 275 280 285  
 [0010] Gln Glu Gly Met Thr Asp Glu Glu Leu Glu Gln Lys Leu Asn Asp Tyr  
 290 295 300  
 Val Ala Met Asp Lys Glu Tyr Val Asp Ser His Lys Ile  
 305 310 315

<210> 12  
 <211> 952  
 <212> DNA  
 <213> 腐皮镰刀菌  
 <400> 12  
 gctattactg cctctcaatt ggattacgaa aacttcaagt tctacatcca acatggtgct 60  
 gcagcatatt gtaactcaga aactgcatct ggacagaaga tcacctgtaa cgataacgga 120  
 tgtaagggta tcgaagctaa taacgcaatt atagtggcca gtttcgttgg tacaggtacc 180  
 ggtatcggag gttatgtatc tactgacaat gttagaaaag agattgtcett gtccatccgt 240  
 ggatcctcta acattagaaa ctggttaacc aacgttgatt tcggatcaatc atctttagt 300  
 tacgtcaggg attgcggtgt tcatacagga tttaggaatg cttgggatga gattgcccaa 360  
 agagctcgtg atgcagttgc taaggccaga gctatgaacc caagttacaa ggtgatttct 420  
 actggtcatt cacttggggg agctgttgct actttgggtg ctgctgattt gcgttctaaa 480  
 ggcacagccg tcgacatctt cacttttggg gccccaagag tcggaaacgc tgaattgtcc 540  
 gcccttatta ccgctcaagc tggagtgtaa tttagggtta ctcacggacg agatcctgtt 600  
 ccaagactgc ctccaattgt ttttggttac agacatacgt ctcctgaata ctggttggt 660  
 ggaggtgctt ccaccaagat tgattactca gttaacgaca ttaaagtgtg tgaaggtgct 720  
 gctaaccttg cctgtaatgg aggtaccttg ggtttgaca ttattgctca tcttagatac 780

---

	ttccagaaca ctgacgcttg cactgctggc ggtatttctt ggaagagagg tgataaggct	840
[0011]	aagagagacg aaatcccaaa gcgtcaagaa ggcatgactg atgaagaact ggagcaaaaag	900
	ttgaatgatt atgtcgccat ggataaagag tacgttgact ctcacaagat cg	952

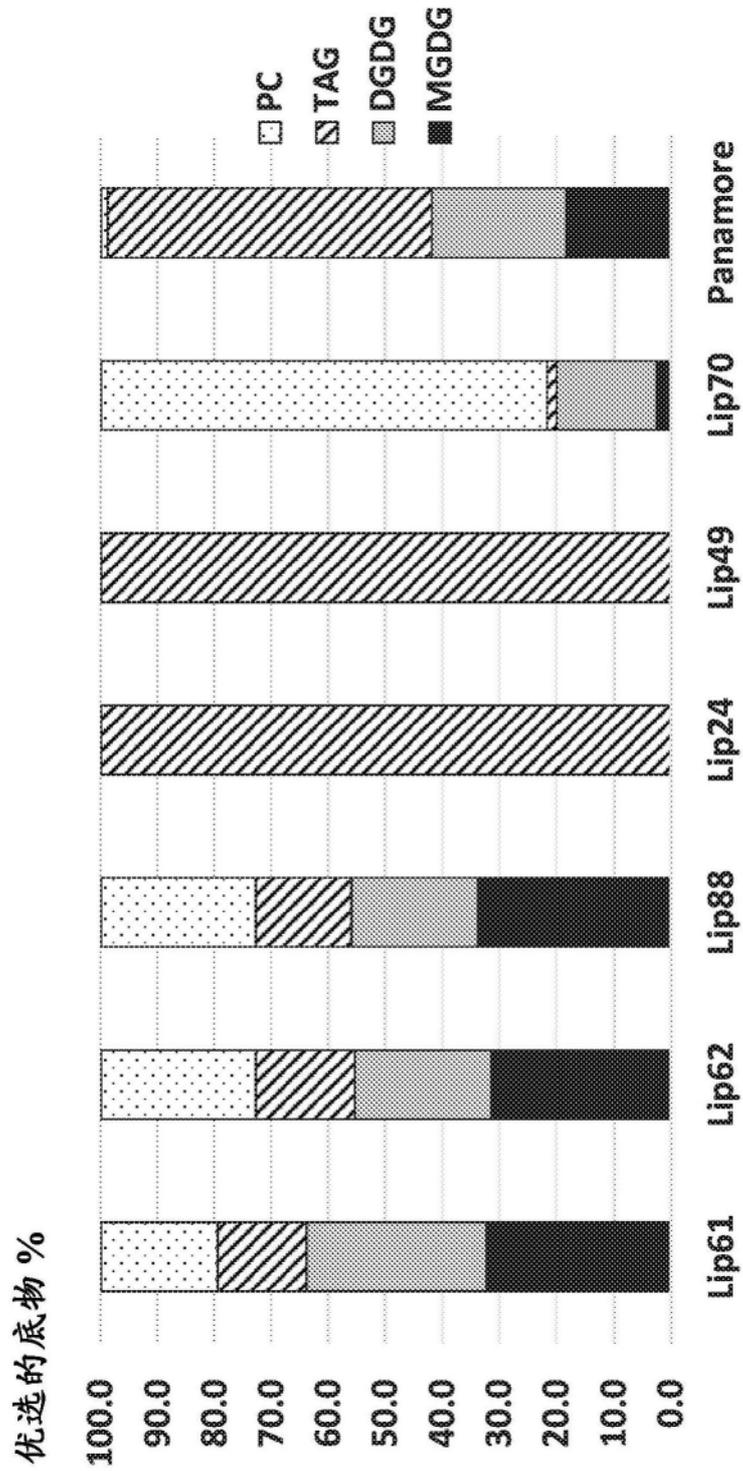


图1

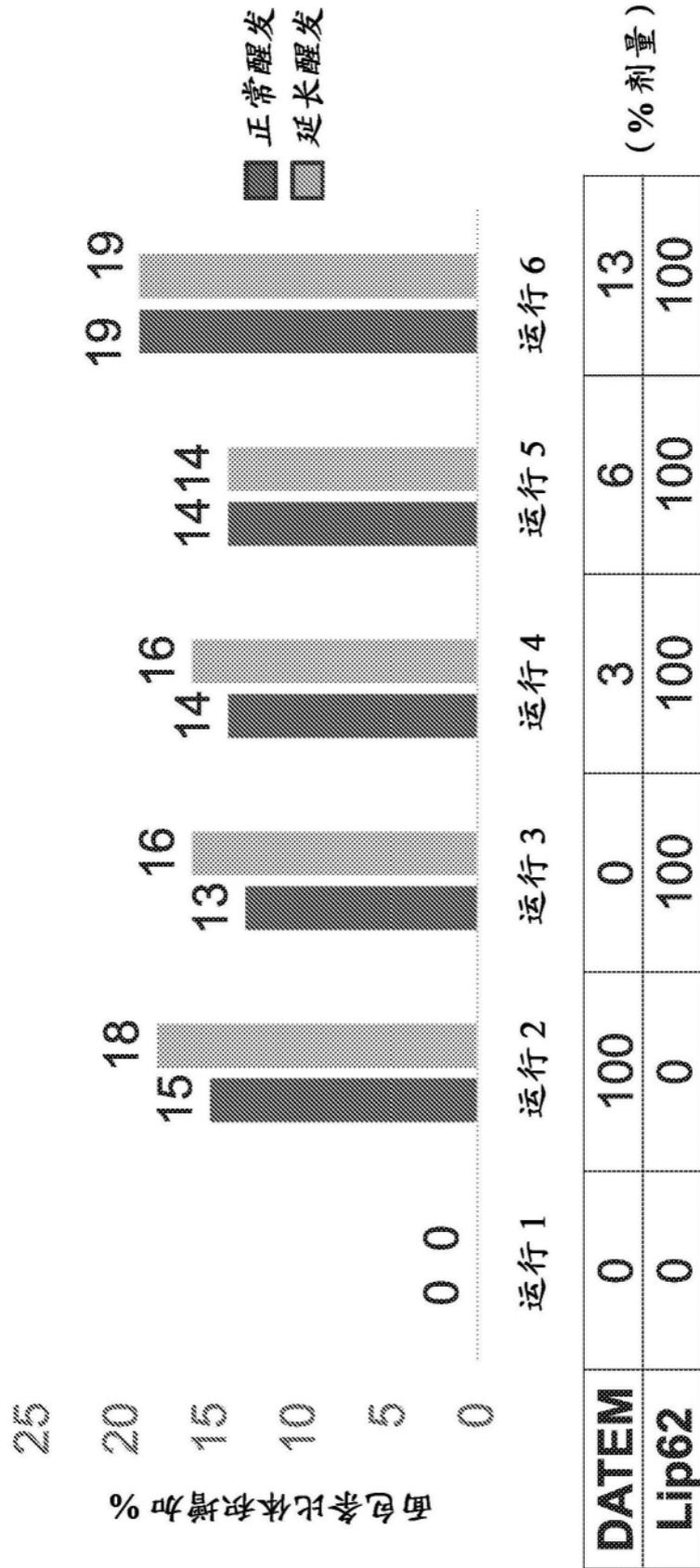


图2