(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0046572
(43) 공개일자 2024년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/04 (2006.01) *A23L 33/21* (2022.01)
C08B 37/00 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/04 (2013.01)
A23L 33/21 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2024-7008944
(22) 출원일자(국제) 2022년08월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년03월18일
(86) 국제출원번호 PCT/FR2022/051595
(87) 국제공개번호 WO 2023/026010
국제공개일자 2023년03월02일
(30) 우선권주장
FR21 08822 2021년08월23일 프랑스(FR)

(71) 출원인
호케트프레르
프랑스공화국, 에프-62136 레스트랑, 뤼 드 라 오 뜨 로즈, 1
(72) 발명자
라노스, 피에르
프랑스 라 바쎄 59480 뤼 데스 렘파츠 3
라메테, 마티유
프랑스 아라스 62000 18 플레이스 데 엉씨앙 히바쥬 - 에이피피티 18
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 류현경

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **효소적으로 가용성 섬유를 얻는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 중합도(DP)가 4인, 올리고당류가 풍부한 기질로부터 소화성이 불량한 알파-글루칸의 혼합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
C08B 37/0009 (2013.01)
C12N 9/1051 (2013.01)
C12P 19/18 (2013.01)
(72) 발명자
라무드-시므온, 마갈리
프랑스 라몬빌-세인트-아그네 31520 1 뤼 벤자민 차리어
물리스, 클레어
프랑스 비에이으비니으 31290 뤼 드 라지에르 216
피주트-세린, 산드라
프랑스 마스-세인츠-푸엘레스 11400 체민 데스 보우타릭스 485
세베락, 에티엔느
프랑스 삐브학 31820 에비뉴 드 가스코뉴 13

명 세 서

청구범위

청구항 1

알파-글루칸의 혼합물을 제조하는 방법으로서,

- 기질을 제공하는 단계로서, 상기 기질은 다분산 지수가 5 내지 10, 바람직하게는 6 내지 9.5, 더욱 더 바람직하게는 7 내지 9, 8 내지 8.5, 가장 바람직하게는 약 8.4인, 올리고당류와 다당류의 혼합물인, 단계,

- 제1 효소의 존재 하에서의 제1 인큐베이션 단계,

- 제2 효소와의 제2 인큐베이션 단계를 포함하고,

- 상기 제1 및 제2 효소는 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,3) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제 및/또는 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,6) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 기질은

- 중합도(DP)가 1 내지 9인 올리고당류 40 내지 50%,

- DP가 10 내지 20인 다당류 15 내지 20%,

- DP가 20 초과인 다당류 35 내지 40%를 포함하며,

백분율은 상대 백분율로 표현되고, 전체는 100%를 구성하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 기질은 덱스트로스 당량(DE: dextrose equivalent)이 18 내지 20, 바람직하게는 18 내지 19, 더욱 더 바람직하게는 대략 18.4인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기질은 50 g/L 내지 500 g/L, 바람직하게는 100 g/L 내지 200 g/L 반응 매질의 농도로 도입되는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기질은 상기 제1 인큐베이션과 제2 인큐베이션 사이에 첨가되는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 효소는 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,3) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제이고, 상기 제2 효소는 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,6) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 효소는 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,6) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제이고, 상기 제2 효소는 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,3) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,6) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 상기 알파-글루카노트랜스퍼라제는 서열번호 1을 갖는 단백질 또는 서열번호 1을 갖는

상기 단백질과 적어도 90% 동일성을 갖는 단백질인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,3) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 상기 알파-글루카노트랜스퍼라제는 서열번호 2를 갖는 단백질 또는 서열번호 2를 갖는 상기 단백질과 적어도 90% 동일성을 갖는 단백질인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 효소는 0.01 내지 1 mg/mL 반응 매질, 바람직하게는 0.05 내지 0.5 mg/mL, 더욱 더 바람직하게는 대략 0.1 mg/mL 반응 매질의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 인큐베이션은 12 내지 48시간, 바람직하게는 대략 24시간의 기간 동안 및/또는 20 내지 40℃, 바람직하게는 대략 37℃를 포함하는 온도에서 및/또는 5 내지 6.5, 바람직하게는 대략 5.75의 pH에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 얻을 수 있는 알파-글루칸의 혼합물.

청구항 13

알파-글루칸의 혼합물로서,

- 건조 물질의 총 중량에 대해 45 중량% 미만의 가수분해성 섬유의 함량 및/또는

- 적어도 20%의 알파(1,6) 결합 및/또는

- 적어도 3%의 알파(1,3) 결합을 갖는 것을 특징으로 하고,

상기 섬유 함량은 AOAC 2002.02 방법에 따른 가수분해성(즉, 비저항성) 분율에 상응하고, 알파(1,6) 및 알파(1,3) 결합의 백분율은 각각 하코모리(Hakomori) 방법에 의해 측정된 글리코시드 결합의 총 수에 대한 알파(1,6) 및 알파(1,3) 결합의 몰 백분율을 나타내는, 방법.

청구항 14

인간 또는 동물 영양을 위한 식품을 제조하기 위한, 제12항 또는 제13항에 따른 알파-글루칸의 혼합물의 용도.

청구항 15

알파-글루칸의 혼합물의 소화성을 감소시키기 위한, 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,6) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 글루카노트랜스퍼라제의, 및 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,3) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 글루카노트랜스퍼라제의 순차적 용도로서. 상기 글루카노트랜스퍼라제는 각각 서열번호 1 또는 서열번호 1을 갖는 단백질과 적어도 90% 동일성을 갖는 단백질 및 서열번호 2 또는 서열번호 2를 갖는 단백질과 적어도 90% 동일성을 갖는 단백질을 갖는, 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 올리고당류와 다당류의 혼합물로부터 소화성이 불량한 알파-글루칸의 혼합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 또한 소화성이 불량한 알파-글루칸의 혼합물에 관한 것이다.

[0003] 본 발명은 또한 알파(1,3) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 글루카노트랜스퍼라제 및 알파(1,6) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 글루카노트랜스퍼라제를 순차적으로 사용하여 알파-글루칸의 혼합물의 소화성을 감소시키는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 식이 섬유는 인간 영양에서 중요한 역할을 한다. 식이 섬유 중에서, 물에 가용성이고 겔화 능력을 갖는 가용성 섬유와 불용성 섬유가 구별된다. 소화성이 불량하기 때문에 분지형 말토덱스트린을 포함하는 가용성 섬유가 특히 유리하다. 이로 인해서, 식이 내로의 이들의 혼입은 식품의 혈당 지수를 감소시키고 포만감의 감각을 연장시킬 수 있게 한다. 이들은 또한 장내 세균총(intestinal flora)에 프리바이오틱 특성을 부여하고; 즉, 이들은 건강상 이점을 제공함으로써 프로바이오틱 유형의 특정 박테리아의 성장 또는 미생물총의 활성을 선택적으로 촉진할 수 있다.

[0005] 지금까지 분지형 말토덱스트린을 포함하는 가용성 섬유는 주로 물리화학적으로 획득되었다.

[0006] 이는 특히 수용성 섬유로서 브랜드명 NUTRIOSE® FM10 하에서 본 출원인에 의해 판매되는 말토덱스트린의 경우이다.

[0007] Tate and Lyl가 판매하는 PROMITOR®, Dupont Nutrition and Biosciences가 판매하는 FIBERSOL® 또는 LITESSE®와 같이 물리화학적으로 얻은 다른 가용성 섬유가 존재한다

[0008] 다수의 연구는 소화성 특성이 가용성 섬유 내의 다양한 유형의 글리코시드 결합의 백분율과 직접 관련되었음을 입증하였다.

[0009] 실제로, 표준 말토덱스트린은 빠르게 소화되며, 분자량이 매우 다양하고 물에 완전히 용해되며 환원력이 낮은, 알파 1→4(이하 1→4 또는 알파(1,4))에 본질적으로 연결되고 단지 4 내지 5%의 알파 1→6 글리코시드 결합(이하 1→6 또는 알파(1,6))을 갖는 글루코스 및 글루코스 중합체의 정제되고 농축된 혼합물로 정의된다.

[0010] 알파 1→6 또는 알파 1→3 결합의 백분율을 증가시킴으로써, 말토덱스트린의 분지도가 증가되며, 이는 이들을 소화에 더 저항성으로 만든다.

[0011] "분지형" 유형 결합의 생성을 촉진할 수 있는 효소를 사용하는 효소 접근법은 안전성 및 환경 보존 관점에서 많은 이점을 갖고, 또한 더 양호한 특이성을 제공한다.

[0012] 원래, 가용성 섬유를 생성하기 위한 가장 효소적인 공정은 새로운 결합을 생성하기 위해 효소를 위한 기질로서 수크로스를 사용하여 수행된다. 예를 들어, WO2015183714는 수크로스 및 알파-글루칸 유형 기질의 혼합물로부터의 효소 반응을 기술한다.

[0013] 현재, 가장 효소적인 공정은 아밀로말타제를 사용하여 전분으로부터 가용성 섬유를 생성한다.

[0014] 수크로스의 부재 하에서, 기질로부터 효소적으로 가용성인 섬유를 얻는 것이 바람직하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이제 본 출원인은 올리고당류와 다당류의 혼합물로부터, 인간 및 동물 영양에서 관심이 있는 섬유를 효소적으로 얻을 수 있다는 것을 발견하였다. 따라서, 본 출원인은 2개의 특정 효소를 사용하는 방법을 개발하였는데, 하나의 방법은 알파(1,3) 결합을 생성할 수 있고, 나머지 방법은 순차적으로 알파(1,6) 결합을 생성할 수 있고, 그 반대도 마찬가지이다.

[0016] 제1 양태에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 알파-글루칸의 혼합물을 제조하는 방법에 관한 것이다:

[0017] - 기질을 제공하는 단계로서, 상기 기질은 다분산 지수가 5 내지 10, 바람직하게는 6 내지 9.5, 더욱 더 바람직하게는 7 내지 9, 8 내지 8.5, 가장 바람직하게는 약 8.4인, 올리고당류와 다당류의 혼합물인, 단계,

[0018] - 제1 효소의 존재 하에서의 제1 인큐베이션 단계,

[0019] - 제2 효소와의 제2 인큐베이션 단계로서, 상기 제1 및 제2 효소는 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,3) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제 및/또는 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,6) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제인, 단계.

[0020] 본 발명에 따르면, 용어"알파-글루칸", "가용성 섬유", "식품 가용성 섬유"는 상호교환적으로 사용된다. 이들은 알파-글리코시드(또는 알파-글루코시드) 결합에 의해 함께 연결된 적어도 3개의 글루코스 단위로 구성된 올리고당류를 정의한다.

[0021] 알파-글루칸의 분류는 주로 "덱스트로스 당량"("덱스트로스 당량" 또는 DE)의 개념에 의해 통상적으로

표현되는, 이의 환원력의 측정에 기초한다. 이 특정 지점에서, 식품 화학 코덱스의 모노그래프 사양에 주어진 말토덱스트린의 정의는 말토덱스트린에 대한 DE 값이 20을 초과하지 않아야 함을 명시한다. 20 초과에서, 이들은 글루코스 시럽이다.

[0022] 바람직하게는, 본 발명에 따른 방법에 사용되는 기질은 DE가 15 내지 20, 바람직하게는 17 내지 20, 바람직하게는 18 내지 19, 더욱 더 바람직하게는 약 18.4이다.

[0023] 그러나, 이러한 DE 측정치는 알파-글루칸의 분자 분포를 정확하게 나타내기에 불충분하다. 실제로, 완전히 무작위인 전분의 산 가수분해 또는 약간 더 정렬된 이의 효소적 가수분해는 DE의 단독 측정치로는 정확하게 정의할 수 없고, 크기가 짧고 중합도(DP)가 낮은 분자뿐만 아니라 크기가 매우 길고 DP가 높은 분자를 포함하는 글루코스와 글루코스 중합체의 혼합물을 제공한다.

[0024] 사실 DE의 측정치는, 글루코스의 혼합물 및 알파-글루칸의 구성 글루코스 중합체의 평균 DP 및 따라서 이의 수평균 분자량(Mn)의 대략적인 아이디어만을 제공한다. 알파-글루칸의 분자 질량 분포의 특징규명을 완료하기 위해서, 중량 평균 분자량(Mw)의 다른 파라미터를 결정하는 것이 중요하다.

[0025] 실제로, Mn 및 Mw의 값은 계산되지 않지만, 상이한 기술에 의해 측정된다. 예를 들어, 글루코스 중합체에 적합한 측정 방법이 사용되며, 이는 알려진 분자 질량의 풀루란으로 보정된 크로마토그래피 컬럼 상에서의 겔 투과 크로마토그래피에 기초한다.

[0026] Mw/Mn 비는 다분자 지수(polymolecularity index) 또는 다분산 지수(PI)로 불리며, 중합체 블렌드의 전체 분자 질량 분포를 특징규명하는 것을 가능하게 한다. 일반적으로, 표준 말토덱스트린의 분자 질량 분포는 5 내지 10의 IP 값을 초래한다.

[0027] 이러한 다양한 파라미터는 또한 알파-글루칸의 알파-글리코시드 결합 프로파일을 반영한다. 실제로, 표준 알파-글루칸의 혼합물은 매우 높은 백분율의 "선형" 알파(1,4) 결합(90% 초과) 및 낮은 백분율의 소위 "분지형"(알파(1,2), 알파(1,3) 및 알파(1,6) 결합)을 갖는다.

[0028] 본 발명에 따른 방법은 알파(1,3) 및 알파(1,6) 결합에 유리한 알파(1,4) 결합의 백분율을 감소시키는 것을 가능하게 하며, 이는 이러한 방법에 의해 얻은 알파-글루칸의 혼합물의 소화성을 감소시키는 이점을 갖는다.

[0029] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 기질은,

[0030] - 중합도(DP)가 1 내지 9인 올리고당류 40 내지 50%,

[0031] - DP가 10 내지 20인 다당류 15 내지 20%,

[0032] - DP가 20 초과인 다당류 35 내지 40%를 포함하며,

[0033] 백분율은 상대 백분율로 표현되고, 전체는 100%를 구성한다.

[0034] 바람직하게는, 기질은

[0035] - 90 내지 97%, 바람직하게는 92 내지 95%의 알파(1,4) 결합,

[0036] - 3 내지 7%, 바람직하게는 4 내지 6%의 알파(1,6) 결합,

[0037] - 0 내지 3%, 바람직하게는 1 내지 2%의 알파(1,3) 결합을 포함하며,

[0038] 알파(1,6) 결합의 백분율은 각각 Hakomori 방법에 의해 측정된, 글리코시드 결합의 총 수에 대한 알파(1,6) 결합의 몰 백분율이다.

[0039] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따르면, 기질은 덱스트로스 당량(DE: extrose equivalent)이 17 내지 20, 바람직하게는 18 내지 19, 더욱 더 바람직하게는 약 18.4이다.

[0040] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따르면, 기질은 하기 표 1에 기재된 특징을 갖는다. 이는 예를 들어, 본 출원인에 의해 판매되는 Glucidex 19D®일 수 있다.

[0041] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 기질은 반응 매질에서 50 g/L 내지 500 g/L, 바람직하게는 100 g/L 내지 200 g/L의 농도로 존재한다.

[0042] 두 효소는 순차적으로 사용된다.

[0043] 일 실시형태에서, 제1 효소는 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있을 뿐만 아니라 알파(1,4) 글리코시드

결합을 절단할 수 있고 알파(1,3) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제이고, 제2 효소는 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,6) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제이다.

[0044] 또 다른 실시형태에서, 제1 효소는 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,6) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제이고, 제2 효소는 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,3) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제이다.

[0045] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 알파(1,4) 글리코시드 결합을 가수분해하고 알파(1,6) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제는 서열번호 1을 갖는 단백질 또는 서열번호 1을 갖는 단백질과 적어도 90% 동일성을 갖는 단백질이다. 바람직하게는, 이것은 서열번호 1을 갖는 단백질과 적어도 91%, 보다 더 바람직하게는 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 적어도 99.6%, 적어도 99.7%, 적어도 99.8%, 적어도 99.9% 동일성을 갖는 단백질이다. 서열번호 1은 Genbank 수탁 번호 WP_053069107.1에 상응한다.

[0046] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,3) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 알파-글루카노트랜스퍼라제는 서열번호 2 또는 서열번호 2를 갖는 단백질과 적어도 90% 동일성을 갖는 단백질이다. 바람직하게는, 이것은 서열번호 2를 갖는 단백질과 적어도 91%, 보다 더 바람직하게는 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 적어도 99.6%, 적어도 99.7%, 적어도 99.8%, 적어도 99.9% 동일성을 갖는 단백질이다. 서열번호 2는 Genbank 수탁 번호 AOR73699.1에 상응한다.

[0047] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 각각의 효소는 순차적 인큐베이션 동안 0.01 내지 1 mg/mL 반응 매질, 바람직하게는 0.05 내지 0.5 mg/mL, 더욱 더 바람직하게는 약 0.1 mg/mL 반응 매질의 농도로 첨가된다.

[0048] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 기질 및 각각의 효소는 12 내지 48시간, 바람직하게는 대략 24시간의 기간 동안 접촉된다.

[0049] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 기질 및 각각의 효소는 20 내지 40℃, 바람직하게는 대략 37℃의 온도에서 접촉된다.

[0050] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 기질 및 각각의 효소는 5 내지 6.5, 바람직하게는 5.5 내지 6, 더욱 더 바람직하게는 대략 5.75의 pH에서 접촉된다.

[0051] 일 양태에 따르면, 본 발명은 또한 전술한 방법에 의해 얻어질 수 있는 알파-글루칸의 혼합물에 관한 것이다.

[0052] 알파-글루칸의 이러한 혼합물은 AOAC 2002.02 방법에 따른 이의 낮은 소화성을 특징으로 한다. 유리하게는, 본 발명에 따른 공정은, 출발 기질에 비해, AOAC 2002.02 방법에 따라 측정된 가수분해성 분율을 적어도 2배, 바람직하게는 적어도 2.5배, 더욱 더 바람직하게는 적어도 3배만큼 감소시키는 것을 가능하게 한다.

[0053] AOAC 2002.02 방법은 하기 실시예 1, 부분 6에 기재된 바와 같이 Megazyme®에 의해 판매되는"Starch resistant, K-RSTAR 06/18" 키트의 "HPAEC-PAD 검정"부분을 사용하여 구현될 수 있다.

[0054] 본 발명에 따른 방법은 출발 기질에 비해, 알파(1,6) 결합의 백분율을 적어도 3배, 바람직하게는 적어도 4배, 더욱 더 바람직하게는 적어도 5배, 6배, 7배 또는 8배만큼 증가시키는 것을 가능하게 한다.

[0055] 본 발명에 따른 방법은 또한 출발 기질에 부재하는 알파(1,3) 결합을 생성할 수 있게 한다.

[0056] 알파(1,4), 알파(1,6), 알파(1,2) 및 알파(1,3) 결합의 백분율은 하기 실시예 1, 부분 9에 기재된 바와 같이 Hakomori 방법(1964 HAKOMORI A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide)에 의해서 측정된다.

[0057] 일 양태에 따르면, 본 발명은,

[0058] - 45% 미만의 가수분해성 섬유의 함량 및/또는

[0059] - 적어도 20%의 알파(1,6) 결합 및/또는

[0060] - 적어도 3%의 알파(1,3) 결합을 나타내는 것을 특징으로 하는 알파-글루칸의 혼합물에 관한 것이며,

[0061] 여기서, 섬유 함량은 AOAC 2002.02 방법에 따른 가수분해성(즉, 비저항성) 분율에 상응하고, 알파(1,6) 및 알파

(1,3) 결합의 백분율은 각각 Hakomori 방법에 의해 측정된 글리코시드 결합의 총 수에 대한 알파(1,6) 및 알파(1,3) 결합의 몰 백분율을 나타낸다.

[0062] 바람직하게는, 가수분해성 섬유의 함량은 건조 물질의 총 중량에 대한 중량 기준으로, 44% 미만, 바람직하게는 43%미만, 더욱 더 바람직하게는 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30% 미만이다.

[0063] 바람직하게는, 알파(1,6) 결합의 백분율은 적어도 21%, 바람직하게는 적어도 22%, 더욱 바람직하게는 적어도 23%, 적어도 24%, 적어도 25%, 적어도 26%, 적어도 27%, 적어도 28%, 적어도 29%, 적어도 30%, 적어도 31%, 적어도 32%, 적어도 33%, 적어도 34%, 적어도 35%이고, 알파(1,6) 결합의 백분율은 각각 Hakomori 방법에 의해 측정된, 글리코시드 결합의 총 수에 대한 알파(1,6) 결합의 몰 백분율이다.

[0064] 바람직하게는, 알파(1,3) 결합의 백분율은 적어도 4%, 바람직하게는 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7% 및 적어도 8%이고, 알파(1,3) 결합의 백분율은 각각 Hakomori 방법에 의해 측정된, 글리코시드 결합의 총 수에 대한 알파(1,3) 결합의 몰 백분율이다.

[0065] 본 발명은 또한 상기에 기재된 방법에 따라 얻은 알파-글루칸의 혼합물의 용도 및 인간 또는 동물 영양을 위한 식품의 제조를 위해 상기에 기재된 특성을 갖는 알파-글루칸의 혼합물의 용도에 관한 것이다.

[0066] 전형적으로, 본 발명의 알파-글루칸의 혼합물은 장 건강, 혈당 관리, 포만감 및 체중 관리 및 지속적인 에너지 방출을 촉진하는 데 사용될 수 있다.

[0067] 마지막으로, 또 다른 양태에서, 본 발명은 알파-글루칸의 혼합물의 소화성을 감소시키기 위해서 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,6) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 글루카노트랜스퍼라제, 및 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,3) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 글루카노트랜스퍼라제를 순차적으로 사용하는 것에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 글루카노트랜스퍼라제는 서열번호 1 또는 서열번호 1을 갖는 단백질과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 바람직하게는, 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,6) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 상기 글루카노트랜스퍼라제는 서열번호 1 또는 서열번호 1을 갖는 단백질과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 바람직하게는, 알파(1,4) 글리코시드 결합을 절단할 수 있고 알파(1,3) 글리코시드 결합을 생성할 수 있는 상기 글루카노트랜스퍼라제는 서열번호 2 또는 서열번호 2를 갖는 단백질과 적어도 90% 동일성을 갖는다.

[0068] 바람직하게는, 소화성의 감소는 AOAC 2002.02 방법에 따라 측정된, 가수분해성 분율의 적어도 2, 바람직하게는 적어도 2.5, 더욱 더 바람직하게는 적어도 3배 감소이다.

[0069] 본 발명은 예시적이고 비제한적인 것으로 의도된 하기 실시예의 도움으로 더 잘 이해될 것이다.

[0070] **실시예 1: 올리고당류와 다당류의 혼합물로부터 분지형 말토덱스트린의 제조: 물질 및 방법**

[0071] 1. 올리고당류와 다당류의 혼합물을 포함하는 기질 용액의 제조

[0072] 사용된 출발 기질은 표 1에 기재된 특징을 갖는 올리고당류와 다당류의 혼합물이었다:

[0073] [표 1]

기준	하위 기준	측정 방법	단위	값
분자량	Mn (풀루란 eq)	MCL1439	Da	1130
분자량	Mw (풀루란 eq)	MCL1439	Da	9510
분자량	다분산 지수	MCL1439		8.4
탄수화물 분포	DP1	MCL190A	상대 %	1.7
탄수화물 분포	DP2	MCL190A	상대 %	5
탄수화물 분포	DP3	MCL190A	상대 %	7.2
탄수화물 분포	DP4	MCL190E	상대 %	5.6
탄수화물 분포	DP5	MCL190E	상대 %	6
탄수화물 분포	DP6	MCL190E	상대 %	7
탄수화물 분포	DP7	MCL190E	상대 %	6.1
탄수화물 분포	DP8	MCL190E	상대 %	4.3
탄수화물 분포	DP9	MCL190E	상대 %	3.1
탄수화물 분포	DP10 내지 DP20	MCL190E	상대 %	17.1
탄수화물 분포	>DP20	MCL190E	상대 %	37
환원 당	덱스트로스 당량(DE)	MCL050B		18.4
건조 물질	건조 후 질량의 손실	MCL209A	%	4%

[0074]

[0075] 50 mM의 아세트산나트륨 완충액, pH 5.75 중의 다양한 기질 용액을 100 g/L, 200 g/L 또는 400 g/L의 농도로 제조하였다.

[0076] 2. 재조합 효소의 생성.

[0077] 하기 효소를 재조합적으로 생성하였다;

[0078] - 효소 GT#11: 기준 AOR73699.1 하에 Genbank에 열거된 서열의 아미노산 서열을 갖는 글리코시드 하이드롤라제 계통 GH70인 알파-4,3 글루카노트랜스퍼라제 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum) NC2970.

[0079] -효소 GT#19: 기준 WP-053069107.1 하에 Genbank에 열거된 서열의 아미노산 서열을 갖는 글리코시드 하이드롤라제 GH70 계통인 락토바실러스 무코사에(Lactobacillus mucosae)로부터의 알파-4,6 글루카노트랜스퍼라제.

[0080] 플라스미드 pET-21 a-효소를 함유하는 이.콜라이(e.Coli) BL21 스타(DE3) 세포를 (GT#11 및 GT#19를 포함하는 다양한 효소를 생성하기 위해) 1% 글리세롤 및 1% 락토스를 함유하는 ZYM-50524 배지에서 배양하였다. 배양의 종료 시에, 세포를 6500 g에서 10분 동안 원심분리하고, 세포 펠렛을 300 mM의 NaCl 및 20 mM의 이미다졸을 함유하는 20 mM 포스페이트 완충제, pH 7.4에 80의 DO600 nm으로 재현탁시키고, 세포를 30% 진폭에서 20초, 그 다음 4분 정치의 4회 사이클을 사용한 저온 초음파처리에 의해서 용해시켰다. 세포 잔해물을 10,000 g에서 30분 동안 원심분리하여 가용화된 단백질로부터 분리하였다.

[0081] 3. 효소 정제

[0082] 폴리히스티딘 태그가 친화성을 갖는 2가 코발트 이온(CO2)이 로딩된 코발트 수지(Invitrogen) 상에서 관심 단백질의 정제를 수행하였다. 폴리히스티딘 태그와 증가하는 이미다졸 농도 사이의 경쟁을 생성함으로써 용리를 수행하였다. 간략하게, 이. 콜라이의 세포 추출물 10 내지 35 mL를 300 mM의 NaCl 및 20 mM의 이미다졸을 함유하는 25 mM 포스페이트 완충제, pH 7.4, 25 mL로 미리 평형화된 코발트 수지 1 mL와 1시간 동안 접촉시켰다. 소결된 유리 상에서의 수지의 여과는 모든 결합되지 않은 단백질이 제거되게 한다. 이어서, 수지를 300 mM NaCl 및 20 mM 이미다졸을 함유하는 40 mL의 20 mM 포스페이트 완충제, pH 7.4로 5회 세척하였다. 마지막으로, 관심 효소를 떼어내기 위해서 300 mM NaCl 및 250 mM 이미다졸을 함유하는 20 mM 포스페이트 완충제, pH 7.4, 3 mL로 용리를 수행하였다. 이어서, NaCl 및 이미다졸을 제거하기 위해서, 효소 용액을 150 mM의 NaCl을 함유하는 50 mM 아세트산나트륨 완충제, pH 5.75, 5 L에 대해 투석하였다(시그마 10 kDa 막)(하룻밤, 교반하면서 4 ℃). 2000 분광광도계 나노드롭(Thermofisher)을 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정함으로써 다양한 단백질 용액을 검정하였다. ExPASy 생물정보학 리소스 포털 사이트의 ProtParam 툴 애플리케이션을 사용하여 분자 흡광 계수 ε을 결정하였다.

[0083] 변성 조건 하에서 전기영동은 정제된 효소 추출물의 품질을 제어하는 것을 가능하게 하였다. 이러한 목적을 위해, 30 μl의 단백질 추출물 및 10 μl의 로딩 완충제(NuPage LDS 샘플 완충제 4x, Invitrogen)를 함유하는 샘

플을 95℃에서 5분 동안 변성시킨 다음, 프리캐스트 아크릴아미드 겔(Mini-Protean Tris-Glycine eXtented(Biorad)) 상에 침착시켰다. 150 V의 전압 하에서 1 x Tris/글리신/SDS 완충제에서 30분 동안 이동을 수행하였다. 이어서, 염색 용액(PageBlue Protein Staining Solution, Fermentas)에서 1시간 동안 겔을 인큐베이션시키고, 이어서 3개의 연속적인 수조에서 30분 동안 헹굼으로써 단백질을 드러내었다.

[0084] 4. 분지형 효소 활성 측정

[0085] 분지형 효소의 효소 활성은 디니트로살리실산(DNS) 방법을 사용하여 환원당의 초기 생성 속도를 측정함으로써 결정될 수 있다. 하나의 효소 단위는 적절한 활성의 완충 조건 하에서 100 g.L-1의 초기 수크로스 농도에 대해 30℃에서 분당 1pmol의 프룩토스를 방출하는 효소의 양을 나타낸다. 1 mL의 부피의 동역학 동안, 100 μL의 반응 매질을 제거하고, 동등한 부피의 DNS를 첨가하여 반응을 중단하였다. 이어서, 샘플을 95℃에서 5분 동안 가열하고, 얼음에서 냉각시키고, 물에서 절반으로 희석하고, 흡광도를 540 nm에서 판독하였다. 0 내지 2 g.L-1의 프룩토스의 표준 범위는 흡광도 값과 환원당의 농도 사이의 관계를 확립하는 것을 가능하게 한다.

[0086] 5. 효소 반응

[0087] 정제된 효소 GT#11 또는 GT#19 중 하나 0.1 mg/mL를 사용하여 반응을 수행하고, 50 mM 아세트산나트륨 완충제, pH 5.75 중의 10%, 20% 또는 40%의 기질의 존재 하에서 투석하였다. 반응물을 20℃ 또는 37℃에서 24시간 동안 교반하면서 인큐베이션시켰다. 가열에 의해 반응을 중단시켰다(5분 동안 95℃). 샘플을 초기 및 최종 시간에 취하여 상이한 분석 기술(HPAEC-PAD, NMR 및 HPSEC)을 사용하여 효소의 특이성을 분석하였다.

[0088] 6. 소화성 시험

[0089] 전사 반응물을 -80℃에서 24시간 동안 동결시킨 후에 동결 건조시켰다. 25 mg의 동결 건조 생성물을 30 U의 췌장 알파-아밀라제 및 3 U의 아밀로글루코시다제를 함유하는 100 mM 소듐 말레에이트 완충제(AOAC 2002.02 방법을 구현하는 Starch resistant kit, Megazyme K-STAR 06/18) 1 mL에 취하였다. 반응물을 37℃에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 생성물을 HPAEC PAD 분석 전에 물에 희석하였다.

[0090] 7. 크로마토그래피 분석

[0091] 얻은 생성물을 펄스형 전류량 검출기에 커플링된 음이온 교환 크로마토그래피(Pulsed Amperometric Detection이 구비된 HPAEC PAD - HIGH Performance Anion Exchange Chromatography)에 의해 분석하였다. CarboPacTM PA100 가드 예비-컬럼(2 mm x 50 mm)과 커플링된 CarboPacTM PA100 분석 컬럼(2 mm x 250 mm)이 장착된 Thermo ICS6000 시스템에서 분석을 수행하였다. 150 mM 나트륨 중의 아세트산나트륨의 구배를 하기 프로파일에 따라 0.250 ml.분-1의 유량으로 적용하였다: 0 내지 5분, 0 mM; 5 내지 35분, 0 내지 300 mM; 35 내지 40분, 300 내지 450 mM; 40 내지 42분, 450 mM. 금 작동 전극 및 pH Ag/AgCI 기준 셀을 사용하여 검출을 수행하였다. 주입 전에 샘플을 1 g.L-1의 총 건조 질량으로 희석하였다. 반응 생성물의 크기를 또한 시스템의 오븐에 70℃에서 배치된 Shodex OH-Pak SB-G 가드 컬럼 예비 컬럼에 의해 보호된 Shodex OH-Pak SB-802.5 컬럼이 장착된 Fisher Ultimate 3000 시스템에서 고성능 크기 배제 크로마토그래피에 의해 가끔 결정하였다. 이동상은 0.3 mL.분-1의 유량의 물이었다. 검출은 굴절률측정법에 의해 수행하였다. 주입 전에 샘플을 20 g.L-1의 총 건조 질량으로 희석하였다.

[0092] 8. NMR.

[0093] 스펙트럼 1H,13 C 및 HSQC를 5 mm Z-구배 H-BB-D BBI 프로브를 사용하여 298 K에서 Bruker Avance 500 ㎒ 장비에 기록하였다. TopSpin 3 소프트웨어를 사용하여 데이터를 획득하고 처리하였다.

[0094] 9. Hakomori 방법

[0095] HAKOMORI 방법(1964 HAKOMORI A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide)은 유리 OH 기와 결합된 기를 구별시킴으로써 글리코시드 결합을 화학적으로 특징규명하는 것을 가능하게 한다. 이는 메틸화, 가수분해, NaBD4로의 환원, 아세틸화 및 질량 분광법에 의한 분석의 단계를 포함하는 파괴적인 방법이다.

[0096] **실시예 2: GT#11 및 GT#19 효소의 별도의 사용**

[0097] 본 실시예에서, GT#11 및 GT#19 효소의 작용을 별도로 시험하였다.

[0098] 다양한 효소 반응의 결과를 하기 표 2에 제시하며, 이는 얻은 반응 생성물에서 양성자 NMR 또는 Hakomori 방법

및 가수분해 백분율(AOAC 2002.02)에 의해 측정된 알파-1,6; 알파-1,3 및 알파-1,4 결합의 백분율을 나타낸다.

[0099] [표 2]

[0100]

		NMR				HAKOMORI				
효소	농도 g/L	α-1,2	α-1,3	α-1,4	α-1,6	α-1,2	α-1,3	α-1,4	α-1,6	가수분해 %(AOAC 2002.02)
/	100	0%	0%	95%	5%					88%
/	200	0%	0%	95%	5%					94%
/	400	0%	0%	95%	5%					86%
GT#11	100	0%	17%	72%	11%	2%	8%	78%	12%	58%
GT#11	200	0%	15%	76%	9%	3%	8%	77%	12%	68%
GT#11	400	0%	14%	78%	8%	2%	5%	84%	10%	96%
GT#19	100	0%	0%	65%	35%	1%	3%	66%	30%	46%
GT#19	200	0%	0%	69%	31%	6%	6%	62%	26%	55%
GT#19	400	0%	0%	73%	27%	2%	3%	75%	20%	63%

[0101] 본 발명자들은 효소 GT#11이 알파-1,4 선형 결합의 백분율을 감소시키고 소위 "분지형" 알파-1,3 및 알파-1,6 결합의 백분율을 증가시킬 수 있음을 관찰하였다.

[0102] 효소 GT#19는 부분적으로 선형 알파-1,4 결합의 백분율을 감소시킬 수 있고 소위 "분지형" 알파-1,6 결합의 백분율을 현저히 증가시킬 수 있었다.

[0103] 두 경우 모두에서, 소화 저항성의 증가(가수분해도의 감소에 의해 반영됨)가 관찰되었다. 그러나, 얻은 생성물은 섬유로서 고려되기에 충분히 강하지 않다.

[0104] **실시예 3.: GT#11 및 GT#19 효소의 동시 사용**

[0105] 본 실시예에서, 본 발명자들은 두 효소 GT#11 및 GT#19의 조합 작용을 연구하였다.

[0106] 따라서, 두 효소를 표 3의 좌측 컬럼에 언급된 다양한 비율로 반응 혼합물에 동시에 첨가하였다.

[0107] 다양한 효소 반응의 결과를 하기 표 3에 제시하며, 이는 얻은 반응 생성물에서 양성자 NMR 또는 Hakomori 방법 및 가수분해 백분율(AOAC 2002.02)에 의해 측정된 알파-1,6; 알파-1,3 및 알파-1,4 결합의 백분율을 나타낸다.

[0108] [표 3]

[0109]

		NMR				HAKOMORI				
효소	농도 g/L	α-1,2	α-1,3	α-1,4	α-1,6	α-1,2	α-1,3	α-1,4	α-1,6	가수분해 %(AOAC 2002.02)
0.05 mg/mL GT#11+ 0.05 mg/mL GT#19	200	0%	0%	64%	36%	2%	5%	65%	28%	55%
0.075 mg/mL GT#11+ 0.025 mg/mL GT#19	200	0%	7%	65%	28%	2%	4%	67%	27%	52%
0.025 mg/mL GT#11+ 0.075 mg/mL GT#19	200	0%	0%	66%	34%	1%	4%	64%	31%	57%

[0110] 본 발명자들은 효소 GT#1 및 GT#19의 동시 작용이 선형 알파-1,4 결합의 백분율 및 소위 "분지형" 알파-1,3 및 알파-1,6 결합의 백분율의 증가를 초래하였음을 관찰하였다. 얻은 결과는 200 g/L의 기질에 대한 GT19 단독의 사용과 동등하거나 심지어 이보다 약간 덜 양호하다.

[0111] 소화 저항성의 증가(가수분해도의 감소에 의해 반영됨)에서 이러한 결합 프로파일 결과의 변형이 관찰되었다. 그러나, 얻은 생성물은 섬유로 간주되기에 충분히 저항성이지 않다(AGAC2002.02 방법에 따른 40% 미만의 가수분해).

[0112] **실시예 4.: GT#11 및 GT#19 효소의 순차적 사용**

[0113] 본 실시예에서, 본 발명자들은 두 효소 GT#11 및 GT#19의 순차적 작용을 연구하였다.

[0114] 효소 캐스케이드는 가수분해 효소에 대한 생성물의 저항성을 증가시키고 40% 미만의 소화성 수준을 달성하기 위한 양호한 전략을 나타낸다.

[0115] 효소 캐스케이드의 프레임워크 내에서, 효소는 다른 하나 이후에 사용된다. 2개의 알파-GT를 교대로 사용하는 2개의 상이한 구성을 연구하였다:

[0116] - Glucidex 19 D를 200 g.L-1에 용해시키고, 제1 알파-GT를 24시간 동안 0.05 mg.mL-1의 농도로 반응시킨다. 5분 동안 95℃에서 가열하여 반응을 정지시킨다. 이어서, 제2 효소를 0.05 mg.mL-1의 동일한 농도로 반응시킨다. 24시간 동안 95℃ 인큐베이션에서 5분 동안 가열하여 반응을 다시 정지시킨다.

[0117] - Glucidex 19D를 100 g.L-1에서 반응시키고, 제1 알파-GT를 0.05 g.L-1의 농도로 24시간 동안 반응시킨다. 반응을 95℃에서 5분 동안 가열하여 정지시킨다. 반응 매질에 100 g.L-1의 Glucidex 19D를 보충하고, 그 다음 제2 효소를 0.05 g.L-1의 동일한 농도로 반응시킨다. 24시간 동안 95℃ 인큐베이션에서 5분 동안 가열하여 반응을 다시 정지시킨다.

[0118] 이러한 다양한 전략은 알파-GT No. 11의 4,3-알파-글루카노트랜스퍼라제 특이성을 이용하고 알파-GT No. 19의 것에 비해 이의 작용을 촉진할 수 있게 한다. 실제로, 알파-1,6 결합의 수준 외에 무시할 수 없는 수준의 알파-1,3 결합이 달성될 수 있다(표 4).

[0119] 본 발명자들은 이러한 조건 하에서 50% 이하의 알파-1,4 결합 수준이 수득됨을 관찰하였고, 3가지 유형의 글리코시드 결합 (알파-1,6; 알파-1,3 및 알파-1,4)이 최종 생성물에 나타남을 관찰하였다

[0120] 다양한 효소 반응의 결과를 하기 표 4에 제시하며, 이는 얻은 반응 생성물에서 양성자 NMR 또는 Hakomori 방법 및 가수분해 백분율(AOAC 2002.02)에 의해 측정된 알파-1,6; 알파-1,3 및 알파-1,4 결합의 백분율을 나타낸다.

[0121] [표 4]

[0122]

		NMR				HAKOMORI				
효소	농도 g/L	α-1,2	α-1,3	α-1,4	α-1,6	α-1,2	α-1,3	α-1,4	α-1,6	가수분해 %(AOAC 2002.02)
GT#11 이어서 GT#19	100 +100	0%	16%	50%	35%	2%	7%	62%	29%	39%
GT#19 이어서 GT#11	100 +100	0%	13%	44%	43%	3%	5%	55%	36%	39%
GT#11 이어서 GT#19	200	0%	18%	51%	32%	2%	8%	64%	26%	36%
GT#19 이어서 GT#11	200	0%	14%	42%	44%	2%	5%	57%	36%	37%

[0123] 따라서, 본 발명자들은, 사용 순서와 무관하게, 그리고 2개의 반응들 사이에 기질의 첨가 유무와 무관하게, 2개의 효소의 순차적 사용이 40% 미만의 가수분해를 갖는 생성물을 수득하는 것을 가능하게 함을 입증하였다. 다시 말하면, 알파-글루카노트랜스퍼라제 GT#11 및 GT#19의 순차적 사용은 19의 DE를 갖는, 올리고당류와 다당류의 혼합물로부터 가용성 섬유를 수득하는 것을 가능하게 하였다.

[0124] **실시예 5.: 대규모에서의 GT#11 및 GT#19 효소의 순차적 사용**

[0125] 본 실시예에서, 본 발명자들은 전술한 실시예에서 생성된 50 mg 대신에 1 g의 섬유를 생성하기 위해 규모의 증가를 수행하였다: 200 g.L-1에서 15 ml의 Glucidex 19D는 제1 알파-GT No. 11을 24시간 동안, 이어서 알파-GT No. 19를 24시간 동안 포함하는 캐스케이드 반응을 거쳤다. 각각의 효소를 0.1 g.L-1로 사용하였다. 실시예 4의 더 작은 부피의 등가 시험과 비교할 때 결합 유형에서 동일한 분포가 얻어진다(표 5):

[0126] [표 5]

[0127]

		NMR				HAKOMORI			
효소	농도 g/L	α-1,2	α-1,3	α-1,4	α-1,6	α-1,2	α-1,3	α-1,4	α-1,6
GT#11 이어서 GT#19	200	0%	18%	56%	26%	2%	8%	68%	22%

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Roquette Fr?es

<120> Proc??d'obtention de fibres solubles par voie enzymatique

<130> B2121027FR and B2121028FR

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 881

<212> PRT

<213> lactobacillus mucosae

<400> 1

Met Lys Asn Leu Val Ala Lys Pro Gln Gly Asn Gln Leu Asn Ile Tyr
1 5 10 15
Asn Gly Asn Thr Val Leu Lys Thr Leu Gly Pro Gly Thr Trp Glu Asn
20 25 30

Met Ala Phe Ala Gln Asp Ser Ser Ala Ile Asn Asn Ile Asn Gly Tyr
35 40 45
Leu Ser Tyr Thr Gly Trp Tyr Arg Pro Tyr Gly Thr Ser Gln Asp Gly
50 55 60
Lys Thr Trp Tyr Gln Thr Thr Ala Met Asp Trp Arg Pro Leu Leu Met
65 70 75 80
Tyr Thr Trp Pro Ser Lys Asp Val Gln Ala Gln Phe Ile Lys Tyr Phe
85 90 95

Val Asn His Gly Tyr Glu Asn Ala Asn Tyr Gly Leu Thr Lys Val Ser
100 105 110
Val Ala Asn Leu Asn Lys Asp Thr Asp Ala Thr Val Leu Asn Thr Ala
115 120 125
Ala Gln Asn Leu Arg Tyr Val Ile Glu Gln Ser Ile Ala Thr Asn Lys
130 135 140
Gly Thr Gly Lys Leu Ala Asn Asp Ile Asn Gly Phe Ala Ala Thr Val
145 150 155 160

Pro Glu Leu Ser Ala Ser Ser Glu Leu Ser Leu Gln Ser Met Pro Asn
165 170 175
Tyr Lys Pro Asp Glu Ser Gly Thr Val Asp Ser Asp Gln Val Ile Phe
180 185 190
Val Asn Asn Asp Ser Lys Asp Gln Arg Arg Gly Asn Thr Ser Tyr Ala
195 200 205
Asp Ser Lys Tyr Arg Leu Met Asn Arg Thr Ile Asn Asn Gln Thr Gly

210 215 220

Asn Asp Asn Ser Asp Asn Ser Pro Glu Leu Leu Val Gly Asn Asp Ile
225 230 235 240
Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Asn Leu Asn Trp Glu Tyr
245 250 255
Phe Leu Leu Asn Tyr Gly Lys Leu Met Gly Tyr Asn Gln Asp Gly Asn
260 265 270
Phe Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Asp Asn Ile Asn Ala Asp Val
275 280 285

Leu Asp Gln Met Gly Gln Leu Met Asn Asp Met Tyr His Met Lys Gly
290 295 300
Asn Pro Gln Asn Ala Asn Asn His Leu Ser Tyr Asn Glu Gly Tyr His
305 310 315 320
Ser Gly Ala Ala Gln Met Leu Asn Glu Lys Gly Asn Pro Gln Leu Tyr
325 330 335
Met Asp Ser Gly Glu Phe Tyr Thr Leu Glu Asn Val Leu Gly Arg Ala
340 345 350

Asn Asn Arg Asp Asn Ile Ser Asp Leu Val Thr Asn Ser Ile Val Asn
355 360 365
Arg Gln Asn Asp Val Thr Glu Asn Glu Ala Thr Pro Asn Trp Ser Phe
370 375 380
Val Thr Asn His Asp Gln Arg Lys Asn Leu Ile Asn Arg Leu Ile Ile
385 390 395 400
Lys Asp His Pro Gly Ile Ala Tyr Ile Met Gly Ser Ala Tyr Lys Ala
405 410 415

Glu Tyr Ala Asn Gln Ala Trp Gln Glu Phe Tyr Ala Asp Gln Lys Lys
420 425 430
Thr Asp Lys Gln Tyr Ala Gln Tyr Asn Val Pro Ala Gln Tyr Ala Ile
435 440 445
Leu Leu Ser Asn Lys Asp Thr Val Pro Gln Ile Tyr Tyr Gly Asp Leu
450 455 460

Tyr Asn Glu Thr Ala Gln Tyr Met Gln Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Asp
465 470 475 480

Ala Ile Thr Thr Leu Met Lys Ala Arg Lys Gln Phe Val Ser Gly Gly
485 490 495

Gln Thr Met Thr Lys Leu Ser Asp Asn Leu Ile Ala Ser Val Arg Tyr
500 505 510

Gly Lys Gly Val Ala Asn Ala Asn Ser Glu Gly Thr Asp Ser Leu Ser
515 520 525

Arg Thr Ser Gly Met Ala Val Ile Val Gly Asn Asn Pro Gln Met Ala
530 535 540

Glu Gln Thr Ile Ser Ile Asn Met Gly Arg Ala His Ala Asn Glu Gln
545 550 555 560

Tyr Arg Asn Leu Leu Asp Thr Thr Asp Asn Gly Leu Thr Tyr Asn Ala
565 570 575

Asp Gly Ala Glu Asn Pro Glu Thr Leu Thr Thr Asp Asp Asn Gly Ile
580 585 590

Leu Lys Val Thr Val Lys Gly Tyr Ser Asn Pro Tyr Val Ser Gly Tyr
595 600 605

Leu Gly Val Trp Val Pro Val Val Ser Gly Asn Gln Asp Val Thr Thr
610 615 620

Asn Ala Ala Thr Val Ser Ala Asp Ser Asn Lys Ile Phe Glu Ser Asn
625 630 635 640

Ala Ala Leu Asp Ser His Met Ile Tyr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Gln
645 650 655

Pro Glu Pro Thr Ser Thr Glu Asn His Ala Tyr Asn Ile Ile Ala Gln
660 665 670

Asn Ala Glu Leu Phe Asn Asn Leu Gly Ile Thr Asp Phe Trp Met Ala
675 680 685

Pro Ala Tyr Thr Pro Phe Gly Met Ser Arg Tyr Asn Glu Gly Tyr Ser
690 695 700

Met Thr Asp Arg Tyr Asn Leu Gly Thr Asn Ala Asn Pro Thr Lys Tyr

705 710 715 720

Gly Ser Gly Glu Glu Leu Ala Asn Ala Ile Ala Ala Leu His Ser Ala

725 730 735

Gly Leu Lys Val Gln Glu Asp Ile Val Met Asn Gln Met Ile Gly Phe

740 745 750

Ser Gly Gln Glu Ala Val Thr Val Thr Arg Thr Asp Asp Arg Gly Met

755 760 765

Gln Ile Tyr Val Asn Gly Lys Thr Tyr Ala Asn Gln Ile Tyr Phe Ala

770 775 780

Tyr Thr Thr Gly Gly Gly Asn Gly Gln Glu Thr Tyr Gly Gly Lys Tyr

785 790 795 800

Leu Ser Glu Leu Gln Ser Lys Tyr Pro Asp Leu Phe Thr Thr Lys Ala

805 810 815

Ile Ser Thr Gly Val Ala Pro Asp Pro Thr Thr His Ile Thr Lys Trp

820 825 830

Ser Ala Lys Tyr Glu Asn Gly Thr Ser Leu Gln Asn Ile Gly Ile Gly

835 840 845

Leu Ala Val Lys Leu Pro Asn Gly Glu Tyr Ala Tyr Leu Arg Ser Ser

850 855 860

Asp Asn Lys Ser Phe Asn Thr Leu Leu Pro Ser Glu Ile Ser Val Lys

865 870 875 880

Leu

<210> 2

<211> 1593

<212> PRT

<213> Lactobacillus fermentum

<400> 2

Met Glu Phe Lys Lys His Phe Lys Leu Tyr Lys Ser Gly Lys Gln Trp

1 5 10 15

Cys Ile Ala Ala Val Val Thr Phe Thr Ala Thr Leu Gly Leu Val Ala

20 25 30

Gly Asn Thr Thr Val Asn Ala Asp Thr Leu Thr Thr Gly Gly Ser Thr

35 40 45

Pro Gln Ala Gln Val Asn Gln Glu Lys Gly Ile Thr Asn Thr Ser Gln

50 55 60

Pro Ala Ser Asp Gln Gly Lys Thr Ser Asn Thr Gly Asp Val Arg Asn

65 70 75 80

Thr Val Pro Gln Pro Asn Asn Ser Asp Lys Thr Asn Gln Tyr Gln Ala

85 90 95

Asp Thr Leu Thr Thr Gly Gly Ser Thr Pro Gln Ala Gln Val Asn Gln

100 105 110

Glu Lys Gly Ile Thr Asn Thr Ser Gln Pro Ala Ser Asp Gln Gly Lys

115 120 125

Thr Ser Asn Thr Gly Asp Val Arg Asn Thr Val Pro Gln Pro Asn Asn

130 135 140

Ser Gly Lys Thr Asn Gln Ser Gln Asn Gly Gln Asp Gln Lys Glu Ser

145 150 155 160

Ala Gly Asn Asp Asn Gly Ser Thr Gly Asn Asn Asp Gln Asn Lys Gly

165 170 175

Gln Gln Thr Thr Asp Trp Gln Lys Asn Ala Asn Asn Gln Trp Val Tyr

180 185 190

Asn Gly Lys Thr Asp Gln Asp Leu Lys Gly Thr Gln Tyr Val Gln Leu

195 200 205

Pro Thr Ile Pro Asp Thr Asn Val Gln Gly Asn Thr Asn Trp Tyr Phe

210 215 220

Val Lys Asp Gly Ile Ala Gln Ser Gly Val Gln Gln Trp Ala Gly Thr

225 230 235 240

Tyr Tyr Tyr Phe Asp Pro Thr Thr Tyr Leu Arg Val Asp Asn Asp Tyr

245 250 255

Arg Gln Ser Gln Trp Gly Asp Trp Tyr Leu Phe Gly Asn Asp Gly Arg

260 265 270

Ile Leu Ser Gly Val Gln Gln Trp Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp

275 280 285

Pro Thr Thr Tyr Leu Arg Val Asp Asp Asp Tyr Val Thr Ser Gln Trp

290 295 300

Gly Leu Lys Tyr Met Phe Gly Lys Asp Gly Arg Ile Ala Thr Gly Leu

305 310 315 320

Tyr Lys Trp Asp Lys Asn Asn Gln Trp Tyr Tyr Phe Asn Pro Thr Thr

325 330 335

Tyr Leu Ala Val Thr Asn Asn Tyr Ile Gln Ala Asn Asp Gly His Trp

340 345 350

Tyr Leu Phe Thr Ala Asp Gly Thr Ala Ala Ser Arg Val Ala Lys Trp

355 360 365

Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Pro Gln Thr His Leu Arg Val Asp

370 375 380

Asp Asn Tyr Val Gln Ser Gln Trp Gly Asp Trp Tyr Met Phe Gly Lys

385 390 395 400

Asp Gly Arg Ile Ala Thr Gly Leu Tyr Lys Trp Asp Lys Asn Asn Gln

405 410 415

Trp Tyr Tyr Phe Asp Pro Thr Thr Tyr Leu Ala Val Thr Asn Asn Tyr

420 425 430

Ile Gln Ala Asn Asp Gly His Trp Tyr Leu Phe Thr Ala Asp Gly Thr

435 440 445

Ala Ala Ser Arg Val Ala Lys Trp Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp

450 455 460

Pro Val Thr His Leu Arg Val Asp Asn Asn Tyr Val Gln Ser Gln Trp

465 470 475 480

Gly Asp Trp Tyr Leu Phe Gly Asn Asp Gly Arg Ile Leu Ser Gly Val

485 490 495

Gln Gln Trp Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Pro Thr Thr Tyr Leu

500 505 510

Arg Val Asp Asp Asp Tyr Val Thr Ser Gln Trp Gly Leu Lys Tyr Met

515 520 525

Phe Gly Lys Asp Gly Arg Ile Ala Thr Gly Leu Tyr Lys Trp Asp Lys

530 535 540

Asn Asn Gln Trp Tyr Tyr Phe Asp Pro Thr Thr Tyr Leu Ala Val Thr

545 550 555 560

Asn Asn Tyr Ile Gln Ala Asn Asp Gly His Trp Tyr Leu Phe Thr Ala

565 570 575

Asp Gly Thr Ala Ala Ser Arg Val Ala Lys Trp Ala Gly Thr Tyr Tyr

580 585 590

Tyr Phe Asp Pro Gln Thr His Leu Arg Val Asp Asp Asn Tyr Val Gln

595 600 605

Ser Gln Trp Gly Asp Trp Tyr Met Phe Gly Lys Asp Gly Arg Ile Ala

610 615 620

Thr Gly Leu Tyr Lys Trp Asp Lys Asn Asn Gln Trp Tyr Tyr Phe Asp

625 630 635 640

Pro Val Thr Tyr Leu Lys Val Thr Asn Lys Trp Val Asp Gly Asn Tyr

645 650 655

Tyr Asp Glu Asp Gly Ala Gln Ala Ile Ser Lys Leu Val Thr Ile Asn

660 665 670

Asn Arg Leu Tyr Tyr Phe Asp Asp Gln Gly Lys Glu Ile Ser Asn Gln

675 680 685

Phe Arg Thr Ile His Gly Asp Lys Tyr Tyr Phe Gly Asn Asp Ser Ala

690 695 700

Ala Val Thr Gly Gln Gln Thr Ile Asp Gly Lys Val Tyr Lys Phe Ser

705 710 715 720

Asn Tyr Gly Tyr Leu Leu Gly Asn Arg Tyr Gly Lys Ile Glu Asn Gly

725 730 735

Lys Leu Asn Ile Tyr Ser Leu Ala Asp His Ser Leu Ile Lys Thr Val

740 745 750

Glu Ala Gly Pro Trp Glu Asn Met Ala Tyr Ser Met Asp Ser Asn Ser

755 760 765

Ile Asn Asn Ile Asp Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Trp Tyr Arg Pro

770 775 780

Tyr Gly Thr Ser Gln Asp Gly Lys Thr Trp Tyr Pro Thr Thr Val Ala

785 790 795 800

Asp Trp Arg Pro Ile Leu Met Tyr Val Trp Pro Ser Lys Asp Val Gln

805 810 815

Val Lys Phe Ile Gln Tyr Phe Val Asn His Gly Tyr Glu Asn Ser Asn

820 825 830

Tyr Gly Leu Thr Ala Gly Ser Val Lys Asp Leu Ser Glu Asn Thr Ala

835 840 845

Ser Ile Asn Leu Asn Glu Val Ala Gln Asn Leu Arg Tyr Val Ile Glu

850 855 860

Gln His Ile Val Ala Ala Lys Ser Thr Ser Gln Leu Ala Asn Asp Ile

865 870 875 880

Asn Asn Phe Ile Thr Thr Ile Pro Glu Leu Ser Ala Ser Ser Glu Leu

885 890 895

Pro Asp Glu Ser Gly Ser Gly Gln Val Ile Phe Val Asn Asn Asp Asn

900 905 910

Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Lys Tyr Arg Leu Met Asn Arg Thr Val Asn

915 920 925

Asn Gln Thr Gly Asn Asp Asn Ser Asp Tyr Cys Pro Glu Phe Val Val

930 935 940

Gly Asn Asp Ile Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Asn Leu

945 950 955 960

Asn Trp Glu Tyr Phe Leu Leu Asn Tyr Gly Lys Leu Met Gly Tyr Asn

965 970 975

Gln Asp Gly Asn Phe Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Asp Asp Met

980 985 990

Asp Ala Asp Val Leu Asp Gln Ile Gly Gln Leu Met Asn Asp Met Tyr

995 1000 1005

His Met Lys Gly Asn Pro Gln Asn Ala Asn Asn His Leu Ser Tyr

1010 1015 1020

```
Asn Glu  Gly Tyr Gly Pro Gly  Ala Ala Arg Met Leu  Asn Lys Lys
    1025                1030                1035
Gly Asn  Pro Gln Leu Phe Met  Asp Ala Arg Glu Cys  Asn Thr Leu
    1040                1045                1050
Glu Asn  Val Leu Gly Arg Ala  Asn Asn Arg Asp Thr  Ile Ser His

    1055                1060                1065
Leu Val  Thr Asp Ser Ile Val  Asn Arg Gln Asn Asp  Val Thr Glu
    1070                1075                1080
Asn Glu  Ala Thr Pro Asn Trp  Ser Tyr Val Thr Asn  His Asp Ile
    1085                1090                1095
Arg Asn  Asn Leu Ile Asn Gly  Leu Ile Ile Lys Asp  His Pro Gly
    1100                1105                1110
Met Gly  Ser Ala Tyr Lys Ala  Glu Tyr Ala Asn Gln  Ala Trp Gln

    1115                1120                1125
Glu Phe  Tyr Ala Asp Gln Lys  Lys Thr Asp Lys Gln  Tyr Ala Gln
    1130                1135                1140
Tyr Asn  Val Pro Ala Gln Tyr  Ala Ile Leu Leu Ser  Asn Lys Asp
    1145                1150                1155
Thr Val  Pro Gln Ile Tyr Tyr  Gly Asp Leu Tyr Asn  Glu Thr Ala
    1160                1165                1170
Gln Tyr  Met Gln Glu Lys Ser  Ile Tyr Tyr Asp Ala  Ile Thr Thr

    1175                1180                1185
Leu Met  Lys Ala Arg Lys Gln  Phe Val Ser Gly Gly  Gln Thr Met
    1190                1195                1200
Thr Lys  Leu Ser Asp Asn Leu  Ile Ala Ser Val Arg  Tyr Gly Lys
    1205                1210                1215
Gly Val  Ala Asn Ala Asn Ser  Glu Gly Thr Asp Ser  Leu Ser Arg
    1220                1225                1230
Thr Ser  Gly Met Ala Val Ile  Val Gly Asn Asn Pro  Gln Met Ala

    1235                1240                1245
Glu Gln  Thr Ile Ser Ile Asn  Met Gly Arg Ala His  Ala Asn Glu
```

1250 1255 1260

Gln Tyr Arg Asn Leu Leu Asp Thr Thr Asp Asn Gly Leu Thr Tyr

1265 1270 1275

Asn Ala Asp Gly Ala Glu Asn Pro Glu Thr Leu Thr Thr Asp Asp

1280 1285 1290

Asn Gly Ile Leu Lys Val Thr Val Lys Gly Tyr Ser Asn Pro Tyr

1295 1300 1305

Val Ser Gly Tyr Leu Gly Val Trp Val Pro Val Ala Ser Gly Asn

1310 1315 1320

Gln Asp Val Thr Thr Asn Ala Ala Thr Val Ser Ala Asp Ser Asn

1325 1330 1335

Lys Ile Phe Glu Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser His Met Ile Tyr

1340 1345 1350

Glu Asp Phe Ser Met Tyr Gln Pro Lys Pro Thr Ser Thr Glu Asn

1355 1360 1365

His Ala Tyr Asn Ile Ile Ala Gln Asn Ala Glu Leu Phe Asn Asn

1370 1375 1380

Leu Gly Ile Thr Asp Phe Trp Met Ala Pro Ala Tyr Thr Gln Ala

1385 1390 1395

Gly Thr Ser Arg Tyr Asn Glu Gly Tyr Ser Val Ala Asp Arg Tyr

1400 1405 1410

Asn Leu Gly Thr Asn Ala Asn Pro Thr Lys Tyr Gly Ser Gly Glu

1415 1420 1425

Glu Leu Ala Asn Ala Ile Ala Ala Leu His Ser Ala Gly Leu Lys

1430 1435 1440

Val Gln Glu Asp Ile Val Met Asn Gln Met Ile Gly Leu Pro Gly

1445 1450 1455

Gln Glu Ala Val Thr Val Thr Arg Ala Asp Asn Arg Gly Met Gln

1460 1465 1470

Thr Tyr Val Asn Gly Lys Thr Tyr Ala Asn Gln Met Tyr Phe Ala

1475 1480 1485

Tyr Thr Thr Gly Gly Gly Asn Gly Gln Glu Thr Tyr Gly Gly Lys
1490 1495 1500
Tyr Leu Ser Glu Leu Gln Ser Lys Tyr Pro Asp Leu Phe Thr Thr
1505 1510 1515
Arg Ala Ile Ser Thr Gly Val Ala Pro Asp Pro Thr Thr His Ile
1520 1525 1530
Thr Lys Trp Ser Ala Lys Tyr Glu Asn Gly Thr Ser Leu Gln Asn
1535 1540 1545
Ile Gly Ile Gly Leu Ala Val Lys Leu Ala Asn Gly Asp Tyr Ala
1550 1555 1560
Tyr Leu Asn Asp Ser Asn Asn Lys Ala Phe Asn Thr Thr Leu Pro
1565 1570 1575
Glu Thr Met Ser Ser Thr Asp Tyr Tyr Ala Asn Ile Glu Asp Asn
1580 1585 1590