



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I883846 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 05 月 11 日

(21)申請案號：113107705

(22)申請日：中華民國 113 (2024) 年 03 月 04 日

(51)Int. Cl. : C12N1/20 (2006.01)

C12P19/02 (2006.01)

(30)優先權：2023/05/23 南韓

10-2023-0066300

(71)申請人：南韓商 C J 第一製糖股份有限公司 (南韓) CJ CHEILJEDANG CORPORATION
(KR)

南韓

(72)發明人：鄭求映 JEONG, GOO-YEONG (KR)；朴藝琳 PARK, YE-LIM (KR)；朴晟喜 PARK, SUNGHEE (KR)；金貞銀 KIM, JUNGEUN (KR)；沈東錫 SHIM, DONGSEOK (KR)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

(56)參考文獻：

US 2022/0095656A1

審查人員：陳婷好

申請專利範圍項數：7 項 圖式數：8 共 33 頁

(54)名稱

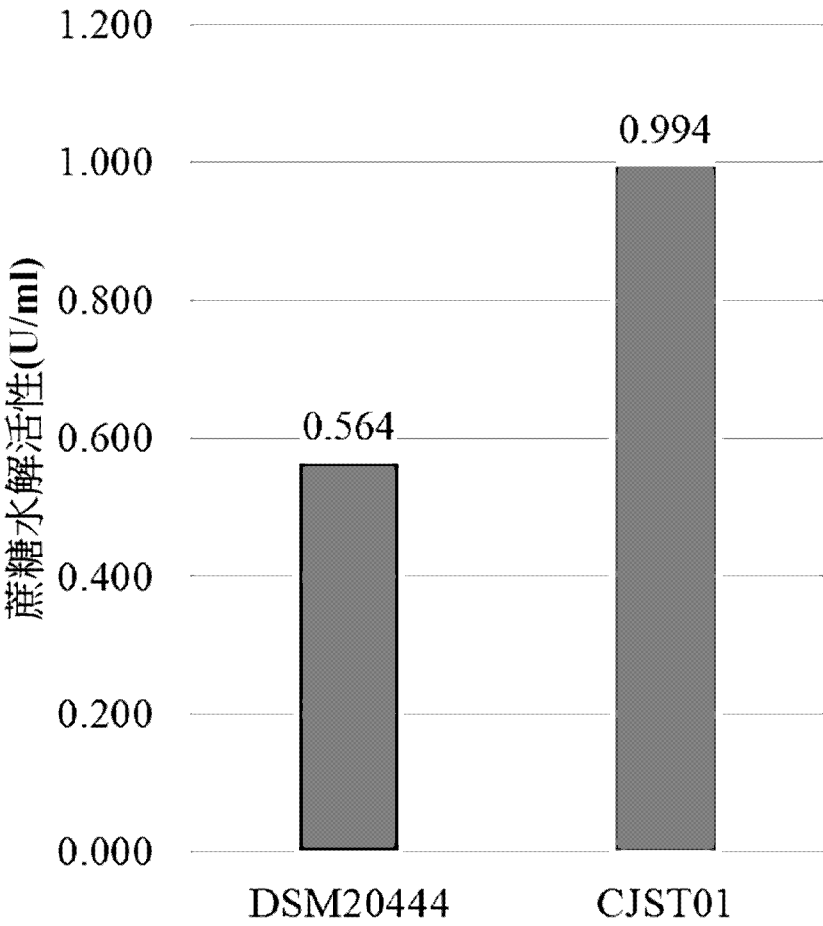
馬利乳酸桿菌菌株及其用途

(57)摘要

本發明係關於具有卓越的轉糖苷化活性的新穎馬利乳酸桿菌菌株及使用其製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷的方法。

The present invention relates to a novel *Lactobacillus mali* strain with excellent transglycosylation activity and a method for preparing transglycosylated steviol glycosides using the same.

指定代表圖：



【圖1】



I883846

【發明摘要】

【中文發明名稱】 馬利乳酸桿菌菌株及其用途

【英文發明名稱】 Lactobacillus mali strain and uses thereof

【中文】

本發明係關於具有卓越的轉糖苷化活性的新穎馬利乳酸桿菌菌株及使用其製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷的方法。

【英文】

The present invention relates to a novel Lactobacillus mali strain with excellent transglycosylation activity and a method for preparing transglycosylated steviol glycosides using the same.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 馬利乳酸桿菌菌株及其用途
【英文發明名稱】 Lactobacillus mali strain and uses thereof

【技術領域】

【0001】 本發明係關於具有卓越的經轉糖苷化甜菊醇（steviol）糖苷生產能力的新穎馬利乳酸桿菌菌株及使用其製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷的方法。

相關申請案之交叉參照

【0002】 本申請案基於韓國專利申請案第10-2023-0066300號（於2023年5月23日提申）主張優先權，該相對應韓國專利申請案之文件中揭露的完整內容被併入作為本敘述之部分。

【先前技術】

【0003】 由於世界衛生組織（WHO）因為根據糖攝取量擔心疾病（肥胖等等）所以建議降低每日糖攝取量，以已開發國家為中心，種種減低糖攝取量的政策正於政府領導下熱烈討論。據此，對於種種替代性甜味劑物質的需求正在市場上增加，且替代性甜味劑物質正被持續開發及商業化。目前，作為取代糖的替代性甜味劑，主要使用合成性高強度甜味劑（糖精、阿斯巴甜、蔗糖素等等），然而，由於對合成性甜味劑之安全性的疑慮持續升高，消費者對於開發天然的替代性甜味劑的要求不斷成長。

【0004】 甜菊苷（一種最近已引起關注的天然高度甜味劑）係指一種源自稱為甜菊的植物之葉的甜味劑。對於各成分而言，甜菊醇糖苷（已知為主要甜化成分）甜度為糖（蔗糖）之200~400倍，且瑞鮑迪苷（rebaudioside）A、瑞鮑迪

苷D及瑞鮑迪苷M主要被用作為食品及飲料甜味劑。然而，瑞鮑迪苷A有獨特的苦味且瑞鮑迪苷D及瑞鮑迪苷M溶解度低且價格高，故其等有於應用上受限的缺點，且因此其等於使用上受限。

【0005】 為了解決此問題，已研究了使用馬利乳酸桿菌製造的經轉糖苷化瑞鮑迪苷A，且此係其中1~4個葡萄糖以 α -1,6與瑞鮑迪苷A結合的結構，且已確認了感覺特徵被改善，此係藉由確認相較於瑞鮑迪苷A（一種甜菊醇糖苷）的苦味之改善及甜度偏好之卓越。

【0006】 馬利乳酸桿菌係一種在發酵食品（諸如蘋果酒、葡萄酒等等）中找到的微生物。本發明之發明人已確認了相較於已知可製造經轉糖苷化甜菊醇糖苷的馬利乳酸桿菌DSM20444菌株，來自種種發酵食品的新發現的馬利乳酸桿菌CJST01菌株明顯更卓越，從而完成了本申請案。

【發明內容】

技術問題

【0007】 本發明之一個實施方式提供馬利乳酸桿菌CJST01菌株。

【0008】 本發明之另一實施方式提供一種使用該菌株製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷的方法。

【0009】 本發明之其他實施方式提供一種通過該製備方法製備的經轉糖苷化甜菊醇糖苷。

【0010】 其他實施方式提供一種甜味劑，其包含該所製備的經轉糖苷化甜菊醇糖苷。

【0011】 其他實施方式提供一種用於製造經轉糖苷化甜菊醇糖苷的組成物，其包含該菌株或其培養物。

【0012】 其他實施方式提供一種馬利乳酸桿菌CJST01菌株或其培養物之

用途，其用於製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷及／或包含經轉糖苷化甜菊醇糖苷的甜味劑。

【0013】 其他實施方式提供一種包含馬利乳酸桿菌CJST01菌株或其培養物的組成物用途，其用於製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷及／或包含經轉糖苷化甜菊醇糖苷的甜味劑。

技術方案

【0014】 此於以下詳細解釋。另一方面，本發明中揭露的每一敘述及實施方式可適用於每一其他敘述及實施方式。換言之，本發明中揭露的種種要素之所有組合皆落入本發明之範圍內。此外，不可將本申請案之範圍視為受以下敘述的具體敘述限制。

【0015】 本申請案提供一種新穎的馬利乳酸桿菌菌株。該新穎的馬利乳酸桿菌菌株可係具有經轉糖苷化甜菊醇糖苷生產能力的菌株

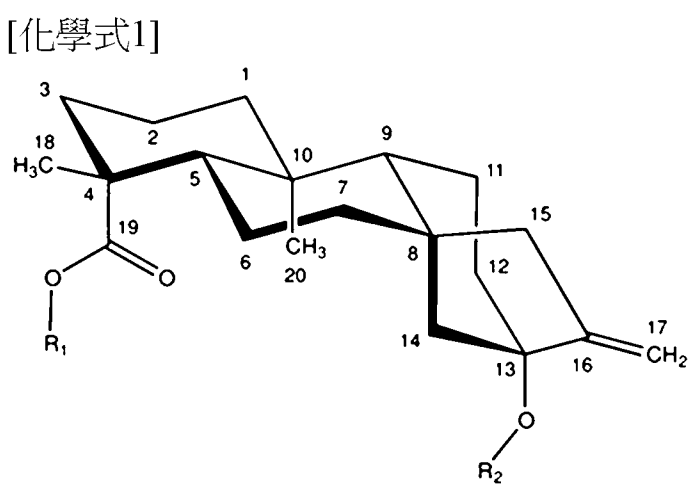
【0016】 於本申請案中，作為一個實施方式，作為藉由獲得來自通過均質化發酵食品來培養的培養溶液的粗酵素溶液來確認甜菊糖轉糖苷化能力以發現一種具有卓越的經轉糖苷化甜菊醇糖苷生產能力的菌株的結果，挑選了一種具有卓越的甜菊糖轉糖苷化活性的馬利乳酸桿菌菌株並將其命名為馬利乳酸桿菌CJST01菌株，並於2023年5月8日將其寄存到韓國生物科學及生物技術研究所韓國菌種中心（KCTC，其係布達佩斯條約下的國際寄存機構）並得到寄存編號KCTC15433BP。

【0017】 因此，該新穎的馬利乳酸桿菌菌株可係以寄存編號KCTC15433BP寄存的馬利乳酸桿菌CJST01菌株。

【0018】 馬利乳酸桿菌CJST01菌株具有SEQ ID NO: 1的16S rRNA。

【0019】 於本申請案中，術語「甜菊醇糖苷」係天然的甜味劑之一，且具

有其中葡萄糖、鼠李糖、木糖等等與化學式1（甜菊醇）之第13、第19-OH結合的形式。



【0020】 大體上，於化學式1中，氫（H）可與R1結合，或1至3個葡萄糖可通過β鍵與R1結合，且1個葡萄糖或木糖或鼠李糖可通過β鍵與R2結合，且0至2個葡萄糖可通過β鍵與其結合，但不限於其等。

【0021】 α-/β-糖苷鍵之區別在於變旋異構位置之相對立體化學（R型或S型）及距離單糖之碳1最遠的立構中心。大體上，當兩個碳具有相同的立體化學時，形成α-糖苷鍵，而當兩個碳具有不同的立體化學時β-糖苷鍵會發生。

【0022】 於本申請案中，術語「經轉糖苷化甜菊醇糖苷」可呈一種形式，其中1至9個葡萄糖通過α鍵添加於甜菊醇糖苷之19-OH位置（通過馬利乳酸桿菌菌株，使用蔗糖及甜菊醇糖苷作為受質），且更具體言之，可呈現一種形式，其中1至9個葡萄糖係通過α-(1,6)鍵加至與甜菊醇糖苷之19-OH位置結合的葡萄糖，但不限於其等。

【0023】 於本申請案中，該甜菊醇糖苷可係選自由以下者組成的群組中的任一者：甜菊苷、瑞鮑迪苷A、瑞鮑迪苷C、瑞鮑迪苷F、杜克苷（dulcoside）A、甜菊醇二苷（steviolbioside）及紅蓼皂苷（rubusoside），但不限於其等。

【0024】 馬利乳酸桿菌CJST01菌株相較於已知的馬利乳酸桿菌菌株可具

有卓越的經轉糖苷化甜菊醇糖苷生產能力。

【0025】 於本申請案中，術語「經轉糖苷化甜菊醇糖苷生產能力」意味能夠通過將葡萄糖轉移至葡萄糖供者中的甜菊醇糖苷來製造經轉糖苷化甜菊醇糖苷的能力，且可與「經轉糖苷化甜菊醇糖苷生產力」或「經轉糖苷化甜菊醇糖苷轉化速率」互換使用，且該經轉糖苷化甜菊醇糖苷生產能力、生產力或轉化速率可藉由還原糖測定法（DNS方法）、HPLC分析法或LC-MS分方法（但不限於其等）通過反應以甜菊醇糖苷及蔗糖培養菌株後獲得的粗酵素溶液來確認。

【0026】 於本申請案之一個實施方式，確認了馬利乳酸桿菌CJST01菌株相較於包含已知酵素的其他微生物於相同條件下具有較高的自甜菊醇糖苷至經轉糖苷化甜菊醇糖苷的轉化速率。

【0027】 此外，本申請案提供一種製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷的方法，其使用馬利乳酸桿菌CJST01菌株。

【0028】 馬利乳酸桿菌CJST01菌株及該經轉糖苷化甜菊醇糖苷與以上敘述者相同。

【0029】 該製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷的方法可包含於馬利乳酸桿菌菌株或其培養物存在下反應蔗糖與甜菊醇糖苷。

【0030】 於本申請案中，該培養物係指包含微生物細胞的培養溶液或移除微生物細胞的粗酵素溶液，且該「培養物」包括種種由微生物於生長期間釋放至培養基的物質以及經調配以用於培養微生物的培養基組分，且特別包含具有蔗糖水解活性的轉糖苷酶。具有蔗糖水解活性的酵素可扮演將蔗糖分解成葡萄糖或通過 α -(1,6)鍵將1至9個葡萄糖 α 結合於甜菊醇糖苷之19-OH位置的角色，但不限於其等。

【0031】 用於培養的培養基應符合特殊菌株之需求。用於馬利乳酸桿菌菌株的培養基係已知的。例如，可將本申請案之微生物於好氧條件下伴隨調整溫

度、pH等等培養在含有適當的碳源、氮源、胺基酸、維生素等等的普通培養基中。此時，作為碳源，包含碳水化合物（諸如葡萄糖、果糖及蔗糖）、胺基酸（諸如麩胺酸及半胱胺酸）等等。具體地，可使用天然有機營養素（諸如澱粉水解產物及糖蜜）且較佳地，其係諸如葡萄糖、果糖、經滅菌預處理糖蜜（即轉變成還原糖的糖蜜）的碳水化合物，且可不同地使用其他適當的量的碳源而不受限制，但不限於其等。作為氮源，可使用無機氮源（諸如氨）及有機氮源（諸如胺基酸（包括麩胺酸及半胱胺酸）及蛋白腴、肉萃取物、酵母菌萃取物等等）。可單獨使用或組合使用此等氮源，但不限於其等。對於培養基，作為磷源，可使用磷酸、磷酸二氫鉀或磷酸氫二鉀或對應的含鈉鹽，但不限於其等。作為無機化合物，可使用硫酸鎂、硫酸鐵、硫酸錳及氯化鈣等等，且此外，可包括胺基酸、維生素及適當的前驅物等等。可以批式或連續方式將此等培養基或前驅物加至培養物，但不限於其等。

【0032】 於培養期間，通過以適當方法將諸如氫氧化鉀、氨及磷酸的化合物加至培養物，可調整該培養物之pH。此外，於培養期間，可使用諸如脂肪酸聚乙二醇酯的消泡劑抑制起泡形成。此外，為了維持該培養物之好氧條件，可將氧或含氧氣體注射至該培養物中。培養之溫度可係27°C至37°C，具體地，30°C至33°C。可持續培養期直到獲得所欲產量的有用物質，且具體地，其係20至120小時。

【0033】 該製備經轉醣苷化甜菊醇醣苷的方法可包括製備包括馬利乳酸桿菌菌株或其培養物的組成物、蔗糖及甜菊醇醣苷之各者；及混合該組成物。

【0034】 於本申請案之一個實施方式，該製備方法可包括將添加物加至以上成分之至少一者。

【0035】 於另一實施方式，該添加物可係冷凍保護劑或賦形劑，且該方法可進一步包括於添加該添加物後的冷凍乾燥步驟。該冷凍保護劑或賦形劑係如

以下敘述。

【0036】 該甜菊醇糖苷可係選自由甜菊苷、瑞鮑迪苷A、瑞鮑迪苷C、瑞鮑迪苷F、杜克苷A、甜菊醇二苷及紅蓼皂苷組成的群組中的任一者，但不限於其等。

【0037】 此外，本申請案提供一種由該製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷的方法製備的經轉糖苷化甜菊醇糖苷及包含該經轉糖苷化甜菊醇糖苷的甜味劑。

【0038】 該所製備的經轉糖苷化甜菊醇糖苷及包含其的甜味劑可具有減低的異味味道及異味風味及改善的甜度品質。

【0039】 此外，本申請案提供一種用於製造經轉糖苷化甜菊醇糖苷的組成物，其包含馬利乳酸桿菌CJST01菌株或其培養物。

【0040】 馬利乳酸桿菌CJST01菌株及該經轉糖苷化甜菊醇糖苷與以上敘述者相同。

【0041】 該組成物可進一步包括冷凍保護劑或賦形劑。該冷凍保護劑或賦形劑可係非天然存在的物質或天然存在的物質，但不限於其等。於另一實施方式，該冷凍保護劑或賦形劑可係不天然與馬利乳酸桿菌CJST01接觸的物質或不與該菌株天然同時包含的物質，但不限於其等。於又另一實施方式，該組成物可進一步包括至少一種選自由甘油、繭蜜糖、麥芽糊精、脫脂奶粉及澱粉組成的群組的冷凍保護劑及／或至少一種選自由葡萄糖、糊精及脫脂奶組成的群組的賦形劑。本揭露內容之冷凍保護劑可以基於該組成物之總重0.01重量%至20重量%及0.01重量%至10重量%的量包含。具體地，甘油可以5重量%至20重量%的量包含、繭蜜糖可以2重量%至10重量%的量包含、麥芽糊精可以2重量%至10重量%的量包含、脫脂奶粉可以0.5重量%至2重量%的量包含且澱粉可以0.1%至1重量%的量包含在該組成物中。此外，該賦形劑可以基於該組成物之總重75%至95重量%或85%至95重量%的量包含。

【0042】 該組成物可以液體、顆粒或粉末的形式使用，但不限於其等。

【0043】 本申請案提供一種馬利乳酸桿菌CJST01菌株或其培養物之用途，其用於製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷及／或包含經轉糖苷化甜菊醇糖苷的甜味劑。

【0044】 本申請案提供一種包含馬利乳酸桿菌CJST01菌株或其培養物的組成物用途，其用於製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷及／或包含經轉糖苷化甜菊醇糖苷的甜味劑。

【0045】 馬利乳酸桿菌CJST01菌株及該經轉糖苷化甜菊醇糖苷與以上敘述者相同。

有利功效

【0046】 本發明係關於一種新穎的馬利乳酸桿菌菌株及使用其製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷的方法，且由於比已知會製造經轉糖苷化甜菊醇糖苷的馬利乳酸桿菌DSM20444菌株更卓越的甜菊醇糖苷轉糖苷化活性及高生產力，該新穎的馬利乳酸桿菌CJST01菌株可於生產過程期間縮短酵素反應時間，且使用該菌株製造的甜菊醇糖苷具有相較於以 α -1,4結合的甜菊醇糖苷及瑞鮑迪苷M味道品質或風味卓越的優點。此外，使用馬利乳酸桿菌CJST01菌株製造的經轉糖苷化瑞鮑迪苷A具有減低的異味味道及異味風味及卓越的溶解度。

【圖式簡單說明】

【0047】 [圖1]係一圖，其顯示比較使用DNS方法測量馬利乳酸桿菌CJST01菌株與對照組馬利乳酸桿菌DSM20444菌株之蔗糖水解活性的結果的結果。

【0048】 [圖2]係一圖，其顯示比較馬利乳酸桿菌CJST01菌株與對照組馬

利乳酸桿菌DSM20444菌株之按所添加的粗酵素溶液之量的自瑞鮑迪苷A的經轉糖苷化瑞鮑迪苷A之轉化率的結果。

【0049】 [圖3]係一圖，其顯示層析圖，其於添加15%的馬利乳酸桿菌CJST01菌株及對照組馬利乳酸桿菌DSM20444菌株之粗酵素溶液後的反應溶液係藉由HPLC分析。

【0050】 [圖4]係一圖，其顯示於藉由將其濃縮5倍來以10%的濃度將馬利乳酸桿菌CJST01粗酵素溶液加至瑞鮑迪苷A 10%及蔗糖10%後經反應的反應溶液組分之HPLC分析之結果。

【0051】 [圖5]係一圖，其顯示分析於藉由將其濃縮5倍來以10%的濃度將馬利乳酸桿菌CJST01粗酵素溶液加至瑞鮑迪苷A 10%及蔗糖10%後經反應的反應溶液組分的結果，其以LC-MS分析。

【0052】 [圖6]係一圖，其顯示分析於藉由將其濃縮5倍來以10%的濃度將馬利乳酸桿菌CJST01粗酵素溶液加至瑞鮑迪苷A 10%及蔗糖10%後經反應的反應溶液組分的結果，其以LC-MS分析。

【0053】 [圖7]係一圖，其顯示比較於通過馬利乳酸桿菌CJST01粗酵素溶液之甜菊醇糖苷的反應之前及之後的層析圖。

【0054】 [圖8]係以馬利乳酸桿菌CJST01粗酵素溶液製備的經轉糖苷化瑞鮑迪苷A之詳細風味特性等等的強度分析結果。

【實施方式】

【0055】 以下，本發明將通過以下實施例更詳細敘述。然而，此等實施例僅意欲用以說明本發明，而本發明之範圍不受此等實施例限制。

實施例1. 具有對甜菊苷的轉糖苷化活性的新穎菌株之挑選

【0056】 將吾人之公司擁有的微生物文庫原種(其自從傳統發酵食品及生產過程(諸如韓國泡菜、大豆糊、醋、發酵酒等等)收集的樣本分離)塗抹在MRS瓊脂培養基上並於30°C下培養24小時，且於其等中，通過裸視挑選具有快速生長速率的菌株並將菌落接種至MRS液態培養基3mL並接著於30°C下培養24小時。以8000 rpm離心各培養溶液10分鐘並分離微生物細胞及上清液並接著回收上清液(粗酵素溶液)。對於各粗酵素溶液，通過DNS方法確認蔗糖水解能力，並通過以各5%反應蔗糖及甜菊苷來確認甜菊苷轉糖苷化能力，並於表1顯示。

表1

菌株名	蔗糖 水解能力	甜菊苷 轉糖苷化能力
兩叉雙歧乳桿菌	×	×
洛德乳酸桿菌 (<i>Lactobacillus reuteri</i>)	O	×
酪蛋白乳酸桿菌	O	×
胚芽乳酸桿菌	O	×
唾液乳酸桿菌	O	×
馬利乳酸桿菌	O	O

【0057】 如於表1顯示，挑選了總共6種菌株(其等係兩叉雙歧乳桿菌、洛德乳酸桿菌、酪蛋白乳酸桿菌、胚芽乳酸桿菌、唾液乳酸桿菌及馬利乳酸桿菌)。作為確認其等之蔗糖水解活性及甜菊苷轉糖苷化活性的結果，確認了於6種菌株中，5種具有蔗糖水解活性，但於其等中，僅該馬利乳酸桿菌菌株具有甜菊苷轉糖苷化活性。

實施例2. 所挑選的馬利乳酸桿菌菌株之16S rRNA之鑑認

【0058】 作為確認實施例1中挑選出的馬利乳酸桿菌菌株之16S rRNA序列之結果，確認了無菌株有相同的序列，且其與已知的馬利乳酸桿菌菌株之鹼基

序列不同。據此，確認了實施例1中挑選出的馬利乳酸桿菌菌株係新穎的馬利乳酸桿菌菌株，且將其菌株名命名為馬利乳酸桿菌CJST01並於NCBI GenBank 註冊其16S rRNA序列。

【0059】 此外，於2023年5月8日將馬利乳酸桿菌CJST01菌株寄存到韓國生物科學及生物技術研究所韓國菌種中心（KCTC，其係布達佩斯條約下的國際寄存機構）並得到寄存編號KCTC15433BP。

實施例3. 馬利乳酸桿菌CJST01菌株之蔗糖水解活性之確認

【0060】 為了確認新穎的馬利乳酸桿菌CJST01菌株具有卓越的蔗糖水解活性，將其與已知具有蔗糖水解活性的馬利乳酸桿菌DSM20444菌株之蔗糖水解活性作比較。

【0061】 具體地，於分別將2種馬利乳酸桿菌CJST01菌株及馬利乳酸桿菌DSM20444菌株培養在MRS液態培養基（其中添加了蔗糖）中後，以8000 rpm離心培養溶液10分鐘並分離微生物細胞及上清液並接著僅取上清液（粗酵素溶液）。使所獲得的粗酵素溶液與蔗糖反應，並通過還原蔗糖測定（DNS方法）測量蔗糖水解活性並於圖1顯示。於以1:1將200 mM的蔗糖水溶液及各分液混合至50 mM醋酸鈉緩衝液後，在40°C水浴中反應其等10分鐘並接著於100°C下使之失活。以1:3的比例添加DNS試劑並混合並於100°C下反應5分鐘，並接著立即在冰上停止DNS反應。之後，於575 nm測量DNA試劑之吸光度（OD），並接著通過代入所製備的果糖標準曲線方程式來確認活性。接著，將1單位定義成每1分鐘增加1 μ mole的還原蔗糖的酵素之量（mL）。

【0062】 結果，如於圖1顯示，確認了新穎的馬利乳酸桿菌CJST01菌株相較於馬利乳酸桿菌DSM20444菌株顯示高約1.7倍的蔗糖水解活性。

實施例4. 自瑞鮑迪苷A至經轉糖苷化瑞鮑迪苷A的轉化之評估

【0063】 如下比較實施例3中製備的馬利乳酸桿菌CJST01菌株及馬利乳酸桿菌DSM20444菌株粗酵素溶液之自瑞鮑迪苷A至經轉糖苷化瑞鮑迪苷A的轉化率。

【0064】 具體地，以各10%將瑞鮑迪苷A（ Daepyung ）及蔗糖（ CJ CheilJedang ）加至50 μ M醋酸鈉緩衝液（pH 5.0），並分別以5%、15%或25%添加實施例3中製備的2種馬利乳酸桿菌菌株之粗酵素溶液，並於40°C下反應24小時。反應後，於100°C下使其等失活，且通過HPLC的確認至經轉糖苷化瑞鮑迪苷A的轉化率之結果係如於圖2顯示。此外，於15%的粗酵素溶液之添加反應後，以層析圖比較各反應溶液，並於圖3顯示。以下表2顯示HPLC分析條件。

表2

偵測器	UV 210 nm
管柱	Capcell pak C18 MG II（4.6 x 250, 5 μ m）
管柱溫度	40°C
移動相	30%乙腈
	等度
流率	1.0 mL/min

【0065】 作為比較按馬利乳酸桿菌2種之所添加的粗酵素溶液之量的至瑞鮑迪苷A的轉化率之結果，如於圖2顯示，當粗酵素溶液分別以5%、15%及25%添加時，顯示馬利乳酸桿菌CJST01菌株之粗酵素溶液之轉化率比馬利乳酸桿菌DSM20444菌株之粗酵素溶液高約1.3至1.5倍。通過此，相較於馬利乳酸桿菌DSM20444菌株，當使用馬利乳酸桿菌CJST01菌株時，於製備相同轉化率的經轉糖苷化瑞鮑迪苷A期間，所需的乳酸桿菌粗酵素溶液較少，且因此可看到其於經轉糖苷化瑞鮑迪苷A生產程序有利。

【0066】 此外，作為比較層析圖（其於馬利乳酸桿菌2種之15%的粗酵素溶液之添加反應後的反應溶液係通過HPLC分析）之結果，如於圖3顯示，確認了當添加2種菌株之粗酵素溶液時，於反應後瑞鮑迪苷A（原料）之峰值減低且經轉醣苷化瑞鮑迪苷A之峰值增加。此外，確認了相較於其中添加馬利乳酸桿菌DSM20444菌株粗酵素溶液的反應溶液，其中馬利乳酸桿菌CJST01菌株粗酵素溶液的反應溶液之瑞鮑迪苷A峰值減低遠更多。

實施例5. 按反應條件的經轉醣苷化瑞鮑迪苷A之轉化率之評估

【0067】 評估基於反應條件的馬利乳酸桿菌CJST01菌株及馬利乳酸桿菌DSM20444菌株之粗酵素溶液之自瑞鮑迪苷A至經轉醣苷化瑞鮑迪苷A的轉化率。

【0068】 具體地，於添加5%、10%、15%或25%的實施例3中製備的馬利乳酸桿菌CJST01菌株及馬利乳酸桿菌DSM20444菌株之粗酵素溶液、5%、7%或10%的受質（瑞鮑迪苷A）濃度及6小時、24小時或48小時的反應時間的條件下藉由與實施例4相同的方法通過HPLC分析瑞鮑迪苷A轉化率，且其係如於以下表3及表4顯示。

表3

馬利乳酸桿菌DSM20444菌株粗酵素溶液之按反應條件的瑞鮑迪苷A轉化率

受質濃度 (Reb A)	所添加的粗酵素溶液之量	反應時間 (h)		
		6	24	48
5%	5%	15.5	47.9	69.2
	10%	27.6	70.8	88.0
	15%	39.3	84.1	93.2
	25%	54.2	90.8	92.3
7%	5%	11.7	38.8	57.8
	10%	21.6	59.5	80.2
	15%	30.9	75.2	90.1

	25%	44.6	87.7	93.4
10%	5%	8.3	29.0	42.4
	10%	15.5	47.0	67.4
	15%	21.7	59.5	79.5
	25%	32.4	75.7	89.0

表4

馬利乳酸桿菌CJST01菌株粗酵素溶液之按反應條件的瑞鮑迪苷A轉化率

受質濃度 (Reb A)	所添加的粗酵素溶液之量	反應時間 (h)		
		6	24	48
5%	5%	23.9	65.0	84.7
	10%	40.1	84.5	93.3
	15%	55.9	92.8	94.3
	25%	72.0	93.0	91.2
7%	5%	17.7	52.0	73.3
	10%	34.2	79.2	92.2
	15%	44.8	87.5	93.4
	25%	61.4	93.1	92.6
10%	5%	12.9	41.1	60.7
	10%	23.0	62.1	81.6
	15%	33.0	76.8	90.0
	25%	49.2	89.1	91.5

【0069】 作為確認根據反應條件的馬利乳酸桿菌2種菌株之粗酵素溶液之瑞鮑迪苷A轉化率之結果，如於表3及表4顯示，於10%的受質濃度、5%、10%或15%的所添加的粗酵素溶液之量及6至48小時的反應時間，馬利乳酸桿菌DSM20444菌株粗酵素溶液顯示8至80%的經轉醣苷化瑞鮑迪苷A轉化率，且馬利乳酸桿菌CJST01菌株粗酵素溶液顯示13至90%的經轉醣苷化瑞鮑迪苷A轉化率。基於此等結果，可確認當使用馬利乳酸桿菌CJST01菌株時，於相同受質濃度或於相同的所添加的粗酵素溶液之量顯示較高的轉化率。

【0070】 此外，其中添加馬利乳酸桿菌DSM20444菌株粗酵素溶液的反應溶液於7%的受質濃度、15%的所添加的粗酵素溶液之量及48小時的反應時間的

條件下顯示90%的瑞鮑迪苷A轉化率，且其中添加馬利乳酸桿菌CJST01菌株粗酵素溶液的反應溶液於10%的受質濃度、15%的所添加的粗酵素溶液之量及48小時的反應時間的條件下顯示90%的瑞鮑迪苷A轉化率。通過此，可看到當使用馬利乳酸桿菌CJST01菌株粗酵素溶液時，可於高受質濃度下獲得有相同轉化率的反應溶液。

實施例6. 經轉糖苷化瑞鮑迪苷A之分析

【0071】 為了確認有多少葡萄糖與通過添加馬利乳酸桿菌菌株粗酵素溶液轉化的經轉糖苷化瑞鮑迪苷A結合，如下分析其。

【0072】 具體地，以各10%將瑞鮑迪苷A（ Daepyung ）及蔗糖（ CJ CheilJedang ）加至50 μM醋酸鈉緩衝液（pH 5.0），並將實施例3中製備的馬利乳酸桿菌CJST01菌株之粗酵素溶液濃縮5倍，並以10%的濃度添加，並於40°C下反應24小時。於反應後，於100°C下使其失活，且於以下表5的條件下的HPLC分析及LC-MS分析之結果係於圖4至6顯示。

表5

偵測器	於 210 nm（4nm bw）的 UV		
	Ref: 360 nm（100nm bw）		
管柱	NH2（4.6 * 250 mm, 5 um）		
	ex. Agilent Zorbax NH2		
管柱溫度	40°C		
梯度	溫度（min）	A（%）	B（%）
	0	80	20
	2	80	20
	90	50	50
	91	80	20
	100	80	20
注射體	12 uL		

積	
流率	1 mL/min

【0073】 結果，如於圖4至6顯示，確認了在使用馬利乳酸桿菌CJST01菌株粗酵素溶液製備的反應溶液之瑞鮑迪苷A中，1至9個葡萄糖被轉移至瑞鮑迪苷A。

實施例7. 通過甜菊醇糖苷的由馬利乳酸桿菌菌株粗酵素溶液造成的轉糖苷化活性之評估

【0074】 為了通過甜菊醇糖苷評估由馬利乳酸桿菌菌株粗酵素溶液造成的轉糖苷化活性，進行如下實驗。

【0075】 具體地，以各10%將12種甜菊醇糖苷（甜菊苷、瑞鮑迪苷A、B、C、D、E、F、M、N、杜克苷A、甜菊醇二苷、紅蓼皂苷）及蔗糖（CJ CheilJedang）加至50 μM醋酸鈉緩衝液（pH 5.0），並添加實施例3中製備的馬利乳酸桿菌2種菌株之粗酵素溶液並於40°C下反應24小時。反應後，於100°C下失活其，且通過HPLC確認經轉糖苷化甜菊醇糖苷之生產且其係如於以下表6及圖7顯示。

表6

甜菊醇糖苷	DSM20444	CJST01
瑞鮑迪苷 A	O	O
瑞鮑迪苷 B	-	-
瑞鮑迪苷 C	O	O
瑞鮑迪苷 D	-	-
瑞鮑迪苷 E	O	-
瑞鮑迪苷 F	O	O
瑞鮑迪苷 M	-	-
瑞鮑迪苷 N	-	-
甜菊苷	O	O
杜克苷 A	O	O

甜菊醇二苷	-	0
紅蔘皂苷	0	0

【0076】 結果，如於表6及圖7顯示，顯示了於12種甜菊醇糖苷中，馬利乳酸桿菌CJST01菌株粗酵素溶液具有針對甜菊苷、瑞鮑迪苷A、C及F、杜克苷A、甜菊醇二苷及紅蔘皂苷的轉糖苷化活性。確認了瑞鮑迪苷E僅於馬利乳酸桿菌DSM20444粗酵素溶液顯示活性，而甜菊醇二苷僅於馬利乳酸桿菌CJST01粗酵素溶液顯示活性。

實施例8. 經轉糖苷化瑞鮑迪苷A水溶液之感官性敘述性分析

【0077】 通過本用於製備經轉糖苷化甜菊醇糖苷的方法製備的CJST01經轉糖苷化瑞鮑迪苷A（CJ）係針對比較性樣本瑞鮑迪苷M（RM）及 α -1,4經轉糖苷化瑞鮑迪苷A（A14）樣本間的感官差異作分析。

【0078】 具體地，本評估係通過招募專業感官小組通過敘述性分析來進行，且預先針對100名年齡介於19與40的對甜度敏感的女性消費者計算對應於相同甜度水平的濃度。所使用的感官評估方法係成對比較測試，且最終計算濃度如於以下表7顯示。接著，請消費者基於RM濃度通過將CJ及A14樣本濃度分至五分位數來選擇最接近的濃度。製造方法係以飲用係通過將其以設定的濃度（w/w）溶解在飲用純水中而可能的狀態製備相對應物質，且樣本係在透明塑膠杯中以各10 mL提供給消費者小組，且隨機分配兩個樣本以挑選感覺較甜的樣本，且基於此，計算其中樣本間的總體差異間存在統計對等的樣本作為樣本濃度以用於最終敘述性分析。

表7
用於經轉糖苷化甜菊醇糖苷之感官卓越之驗證的評估之樣本表

分類	計算濃度	註記
CJ	0.1197%	α -1,6 經轉糖苷化瑞 鮑迪苷 A
RM	0.0696%	甜菊醇糖苷
A14	0.2351%	α -1,4 經轉糖苷化瑞 鮑迪苷 A

【0079】 通過敘述性分析的感官評估係藉由使用用於自以上者衍生的敘述性分析的樣本濃度來進行，如下。此感官評估之目的係鑑認各甜味劑水溶液之總體感官輪廓。此感官評估係由6個經訓練的專業小組進行重複兩次。

【0080】 具體地，樣本係於室溫下在透明塑膠杯中以各10 mL提供，且每個樣本提供小組3杯且感官表被敘述。評估係針對隨機提供的樣本進行，且於研究詳細風味特性等等時，允許樣本之間隔中約2~3分鐘的休息期以排除樣本間的感官影響。小組可感覺的評估項目係通過初步的樣本評估來衍生，且提供詳細風味／口感特徵作為標準樣本，如以下顯示。關於此的總體內容係於以下表8顯示。

表8

特性		定義	參考
風味	花	自小蒼蘭花感覺到的獨特芳香花香	糖 8%水溶液 + 小蒼蘭風味 (Seoul Flav) 0.00035%
	蜂蜜	自蜂蜜感覺到的獨特風味	混合蜂蜜風味 (Seoul Flav) 0.02%水溶液
	丁香	苜蓿獨特風味	苜蓿風味 (Seoul Flav) 0.005%水溶液
	水之魚腥味	來自魚缸或舊水的魚腥味	-
	金屬性	來自諸如鐵等等的金屬物質的鐵風味感	鐵液體製劑，不鏽鋼湯匙

口感	涼	吞嚥樣本後口部感到涼的感覺	薄荷風味 (Firmenich flavor) 0.002% 水溶液
	澀感	當將樣本含在口中或吞嚥其時感到的口中組織起皺或乾燥的感覺	單寧酸 (Nam Yung Commercial Co., Ltd.) 0.021%水溶液

【0081】 如於表8顯示，通過感官評估通過敘述性分析，得到作為該等甜味劑之5種之感官特徵，「甜度、苦味、5種風味特徵、2種口感特徵」。對於苦味，提供標準物質（2點：無水咖啡因0.055%，4點：無水咖啡因0.067%）以用於各強度。

【0082】 詳細風味特性等等之強度分析結果係如於以下表9顯示，且通過蜘蛛圖將此可視化的結果如於圖8顯示。

表9

詳細特性之強度¹⁾分析結果

詳細項目	CJ	RM	A14
苦味	2.5	1.3	4.8
花風味	1.5	1	1.3
蜂蜜風味	1	1	1
苜蓿風味	1	1	1.8
水之魚腥味	1	4	1
金屬性	1.3	2.8	1.5
涼	1.5	1.3	1.3
澀感	2	1.5	3.5

¹⁾二重複之平均。數據係基於15點類別標尺（其中1 – 弱的該特性之強度且15 = 強的該特性之強度）評分。在一列中不共有上標字母的值係顯著不同的（p<0.05 Duncan」氏多重差距檢定）。

【0083】 如於表8及圖8顯示，RM顯示以下特徵：「水之魚腥味之風味」被強力地表現且金屬性強，且「苦味及澀感」顯示相較於A14樣本被弱表現的特徵。於A14樣本，顯示以下特徵：「苦味／丁香風味／澀感」相對強。於CJ樣本，相較於RM樣本，金屬性強度被評估為弱的，且苦味／澀感被評估為於相等的水平，且相較於A14樣本，苦味／澀感特性被弱表現，且其他特性之強度被研究為相等的。

【0084】 換言之，通過以上結果，可確認CJ樣本之甜味劑之感官性能相較於比較性樣本具有更卓越的可用性(異味較少)。因為甜味劑目標在於替代糖(蔗糖)，沒有除了「甜度」以外的特徵不需要，且考慮到此被應用於種種食品，所提及的特徵對於普遍使用而言很重要。因此，當組合本敘述性分析之研究結果時，可確定已證實由本發明所得的經轉糖苷化瑞鮑迪苷A作為食品甜味劑係卓越的。

實施例9. 經轉糖苷化瑞鮑迪苷A之溶解度之評估

【0085】 對於甜菊醇糖苷及經轉糖苷化瑞鮑迪苷A之溶解度之評估，其中10 ml蒸餾水被加至2g瑞鮑迪苷A (RebA)、瑞鮑迪苷D (RebD)、瑞鮑迪苷M (RebM)、甜菊苷 (STV) 2g之各者的水溶液及其中10 ml蒸餾水被加至8g的經轉糖苷化瑞鮑迪苷A (RebA-Glu)的水溶液被混合並通過超音波振盪器於50°C下溶解60分鐘。在10、25、40、55°C培養箱中培養其等4日。以12000 rpm離心各水溶液10分鐘並在105°C乾燥烘箱中乾燥1 ml的上清液，並測量溶解度及於表10顯示。此時，經轉糖苷化瑞鮑迪苷A係通過與實施例7中使用的經轉糖苷化瑞鮑迪苷A之生產方法相同者製備其來獲得。

表10

溫度 (°C)	溶解度 (mg/ml)				
	RebA	RebD	RebM	STV	RebA-Glu
10	5	4	4	12	400↑
25	5	1	4	21	400↑
40	6	1	6	37	400↑
55	12	2	9	160↑	400↑

【0086】 結果，如於表10顯示，可確認經轉醣苷化瑞鮑迪苷A相較於瑞鮑迪苷A（反應受質）具有明顯增加的溶解度，且相較於瑞鮑迪苷D、瑞鮑迪苷M及甜菊苷（其他甜菊醇醣苷）具有卓越地改善的溶解度。

【0087】 基於以上敘述，本發明所屬技術領域中具有通常知識者會了解本發明可以其他具體形式實施而不改變其技術精神或必要特徵。於此方面，應將以上敘述的實施例理解成於所有方面皆為說明性而非限制性的。應將本發明之範圍判讀成自以下敘述的申請專利範圍之意義以及範圍衍生的所有改變及修改形式及其等之相等概念皆被包括在本發明之範圍中。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

【0088】

寄存機構之名稱：韓國生物科學及生物技術研究所韓國菌種保藏中心（KCTC）

寄存編號：KCTC15433BP

寄存日期：20230508

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing dtdVersion="V1_3" fileName="FCP071225.SEQ.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2024-06-
25">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>113107705</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2024-03-04</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>DPP20231998KR</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>KR</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>10-2023-0066300</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-05-23</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">南韓商CJ第一製糖股份有限公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>CJ CheilJedang Corporation</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">馬利乳酸桿菌菌株及其用途</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>1</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>1209</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..1209</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>Lactobacillus mali CJST01 27F 16S rRNA
sequence</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
        <INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1209</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q2">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tcggtggcggcagctatacatgcagtcgaacgcaaaactttcatcgaatgcttgcattcac
cgaaagttttgagtggcgaacgggtgagtaacacgtgggtaacctgccagaagagggggataacacttggaacagggtg
ctaataccgcataacaataaaaaccgcatggtttttatttaaaagatggttttgctatcacttctggatggacccgcggc
gtattagctagttggttaaggtaaaggcttaccaaggcaatgatacgtagccgaactgagagggttgatcggccacattggg
actgagacacggcccaaactcctacgggaggcagcagtagggaatcttccacaatggacgaaagtctgatggagcaacgc
cgctgagtgaagaaggttttcggatcgtaaaactctgttgttagagaagaacgtgtgtgagagtaactgctcatgcagt
gacggtatctaaccagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcggttaatacgtaggtggcaagcgttgtccggat
ttattgggcgtaaaagggaacgcaggcggttttttaagtctgatgtgaaagccttcggcttaaccgaagtcattgga
aactgaaagacttgagtgcagaagaggagagtggaactccatgtgttagcgggtgaaatgcgtagatatatggaagaacacc
agtggcgaaagcggctctctggtctgtaactgacgtgaggttcgaaagtgtgggtagcaaacaggattagataccctgg
tagtccacaccgtaaacgatgaatgctaagtgttgagggtttccgcccttcggtgctgcagctaacgcattaagcattc
cgcttggggagtagcaccgcaaggttgaaactcaaaggaattgacggggggccgcacaagcgggtggagcatgtggtttaa
ttcgaagcaacgcgaagaacccttaccaggtcttgacatcttctgacaaccctaagagattagtgttccctttcgggaca
gaatgacaggtggtgcatgatgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcacgagcgcactctatatag
ttgcagcatagtgggcactctagtgagactggcgtgacaacgaggagtgggatgacgtcaatcatcatgccccctaatgaa
ccttggggccttaacacacacggtgtc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種馬利乳酸桿菌CJST01菌株，其以寄存編號KCTC15433BP寄存。

【請求項2】如請求項1之菌株，其中該菌株具有SEQ ID NO: 1的16S rRNA序列。

【請求項3】如請求項1之菌株，其中該馬利乳酸桿菌CJST01菌株具有經轉醣苷化甜菊醇（steviol）醣苷生產能力，且該甜菊醇醣苷係選自由以下者組成的群組中的任一者：甜菊苷、瑞鮑迪苷（rebaudioside）A、瑞鮑迪苷C、瑞鮑迪苷F、杜克苷（dulcoside）A、甜菊醇二苷（steviolbioside）及紅蓼皂苷（rubusoside）。

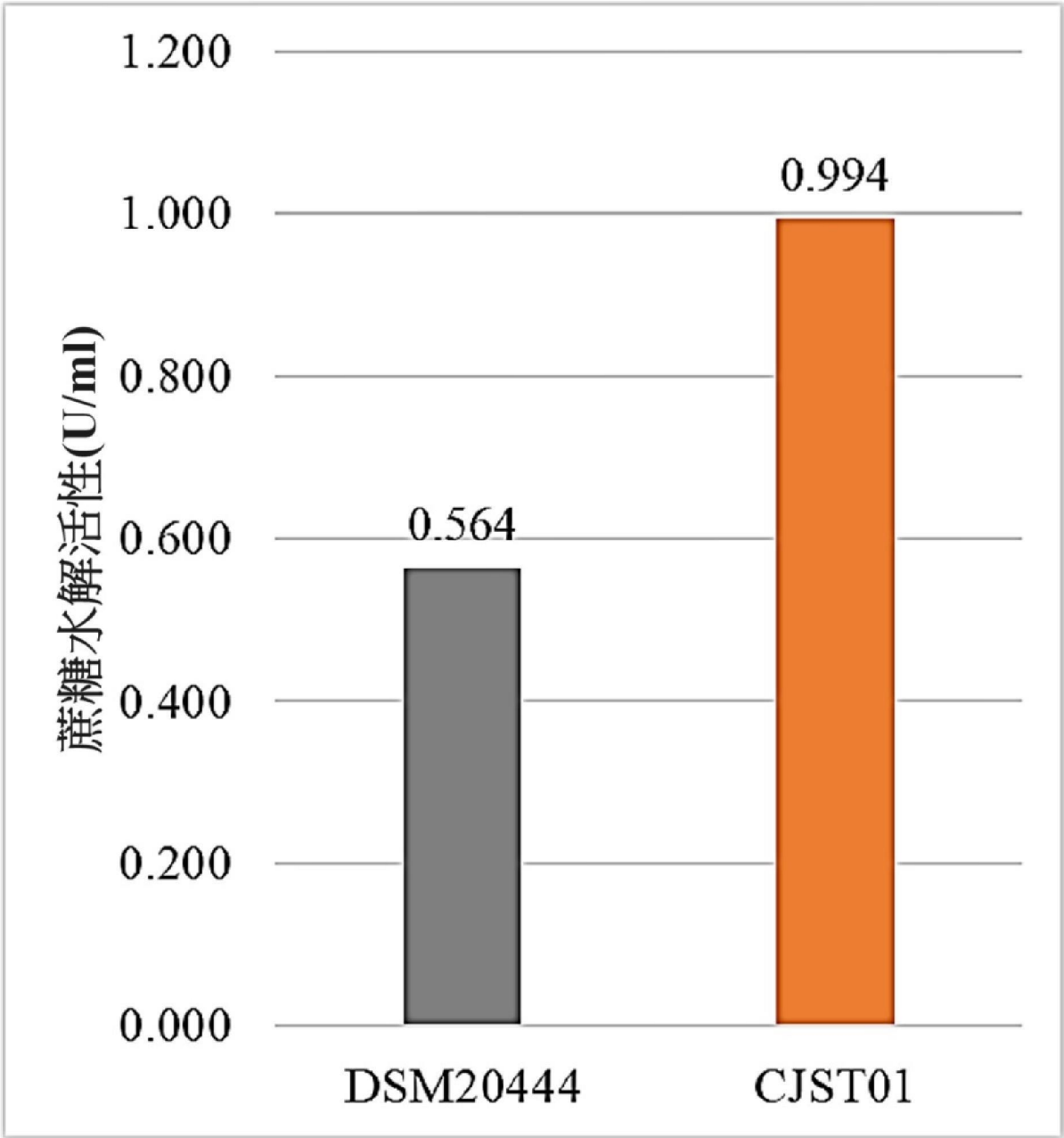
【請求項4】一種製備經轉醣苷化甜菊醇醣苷之方法，其使用如請求項1之菌株。

【請求項5】如請求項4之製備經轉醣苷化甜菊醇醣苷之方法，其包含於該馬利乳酸桿菌CJST01菌株或其培養物存在下反應蔗糖與甜菊醇醣苷，其中該甜菊醇醣苷係選自由以下者組成的群組中的任一者：甜菊苷、瑞鮑迪苷A、瑞鮑迪苷C、瑞鮑迪苷F、杜克苷A、甜菊醇二苷及紅蓼皂苷。

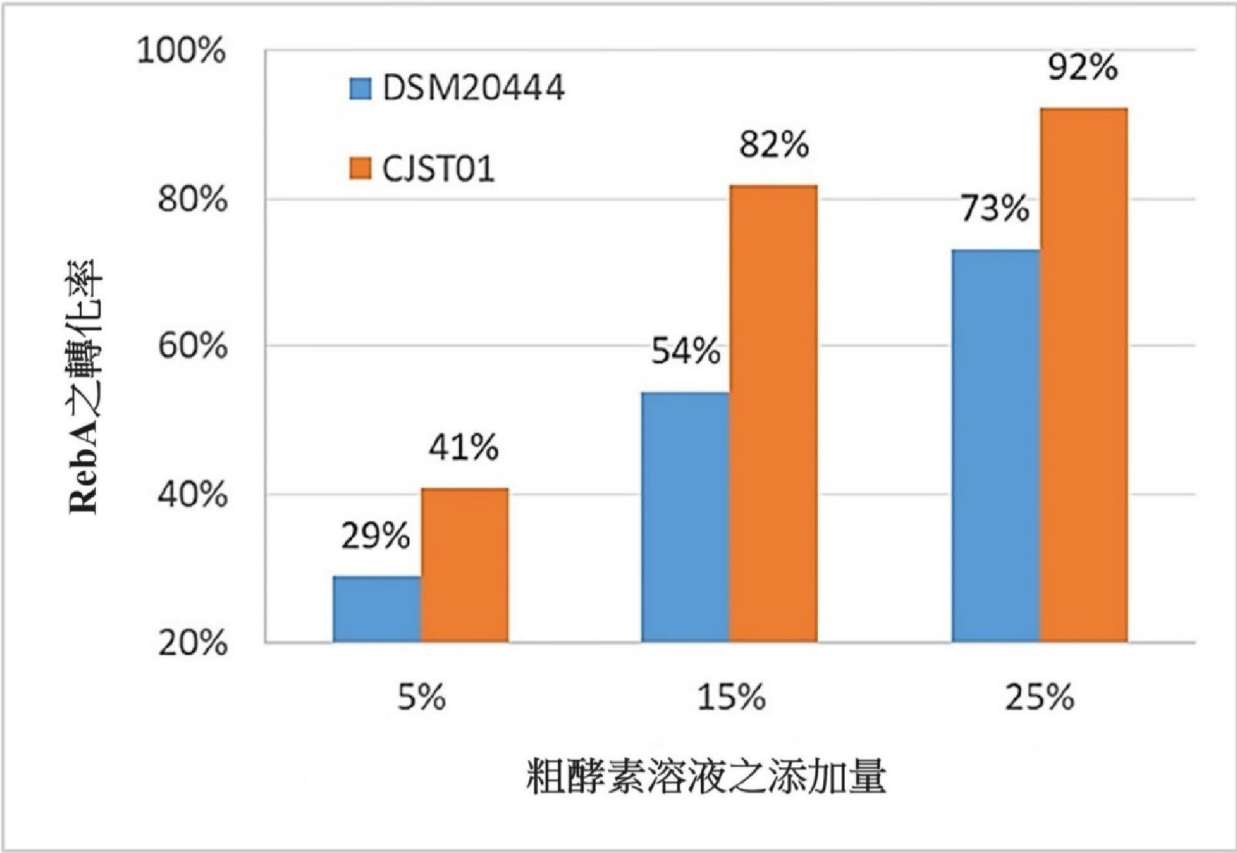
【請求項6】如請求項5之製備經轉醣苷化甜菊醇醣苷之方法，其中該甜菊醇醣苷係通過與該甜菊醇醣苷之19-OH位置結合的葡萄糖藉由 α -(1,6)鍵連接葡萄糖添加的甜菊醇醣苷。

【請求項7】如請求項6之製備經轉醣苷化甜菊醇醣苷之方法，其中該甜菊醇醣苷包含1至9個葡萄糖。

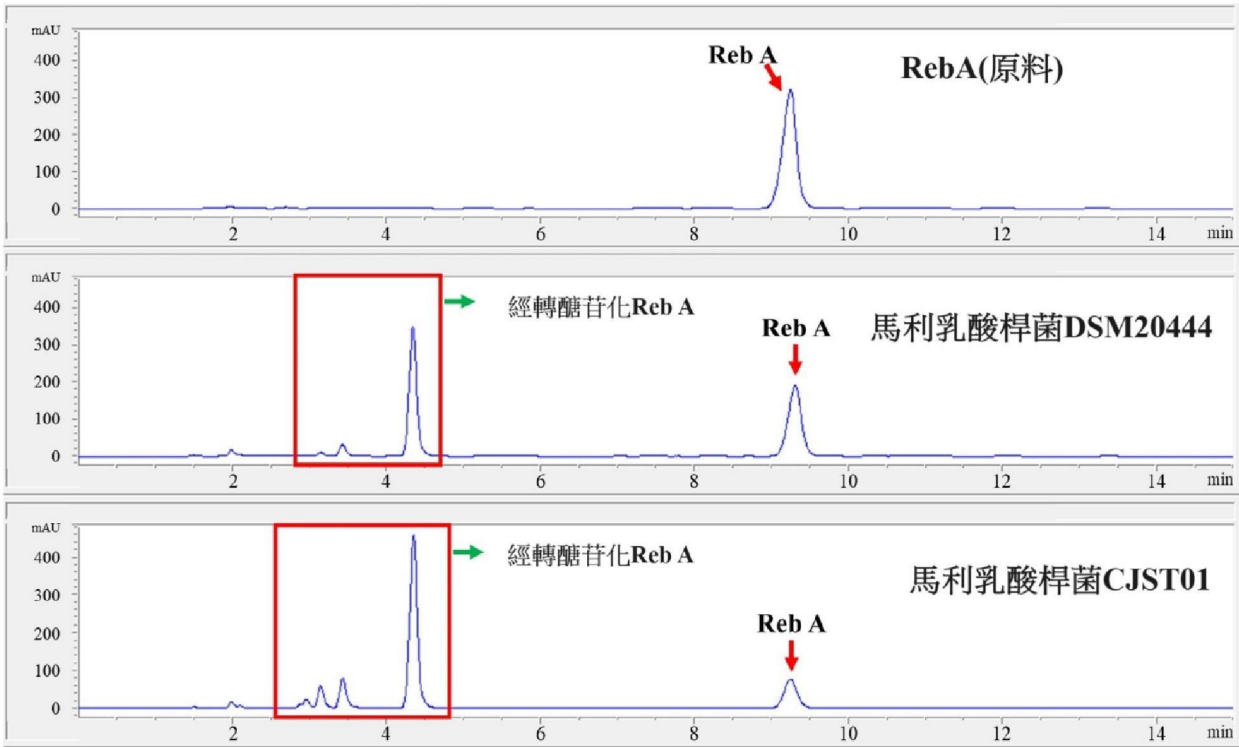
【發明圖式】



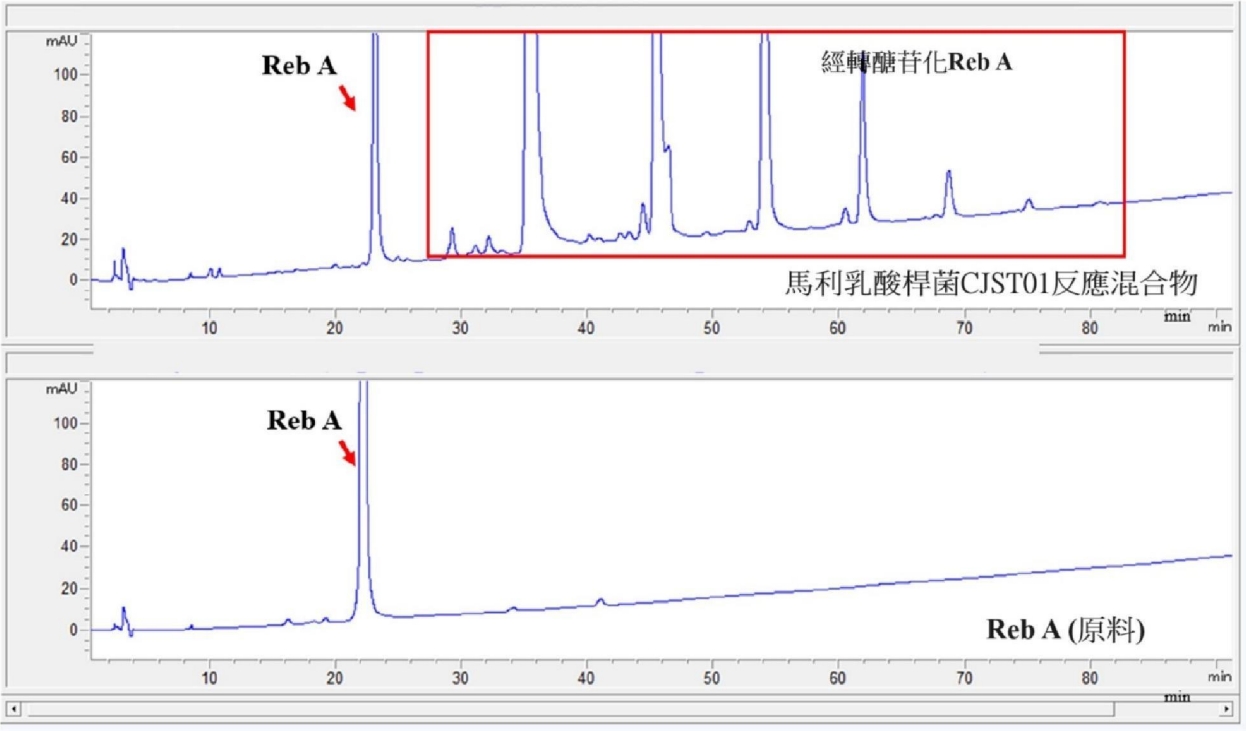
【圖1】



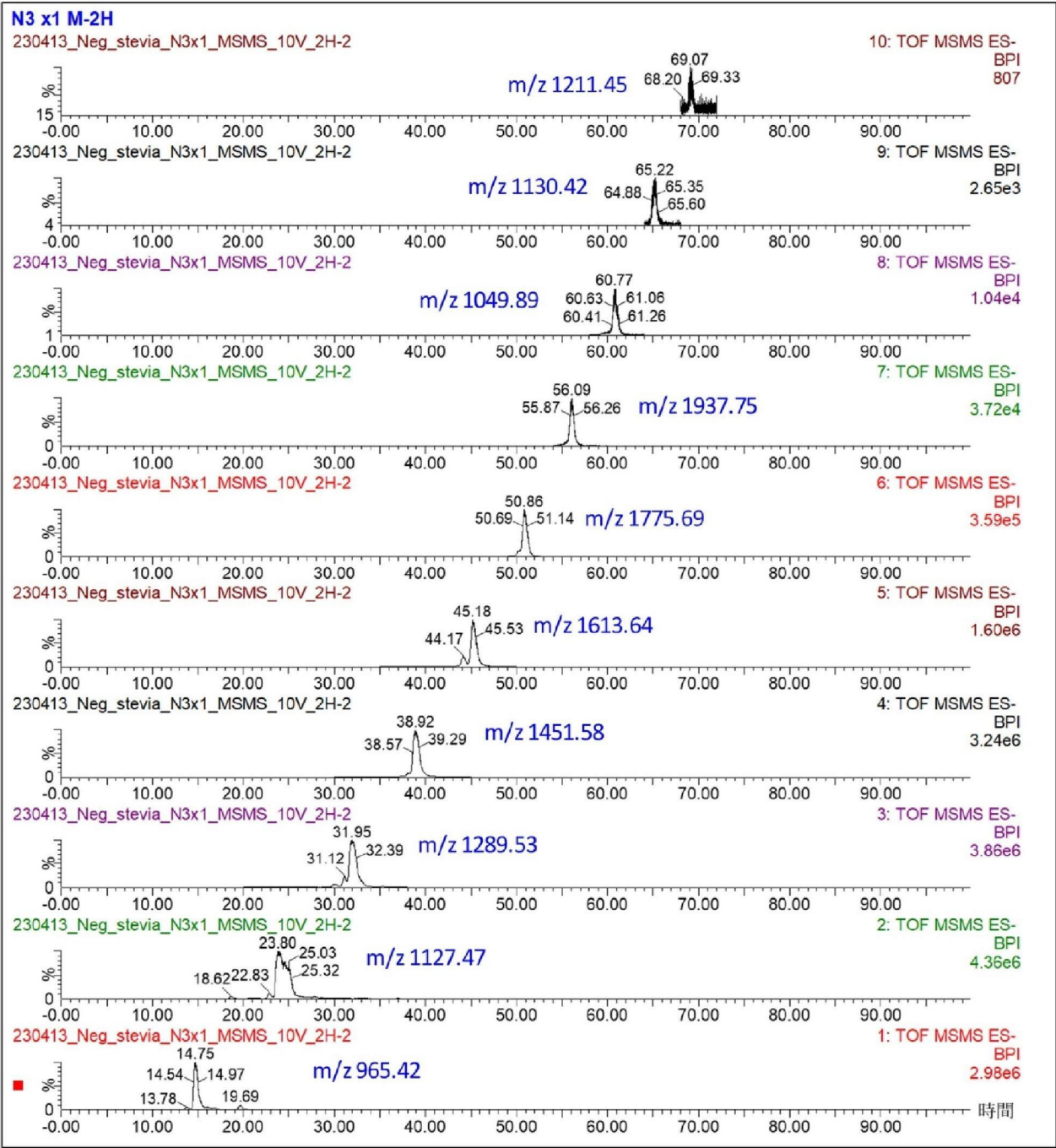
【圖2】



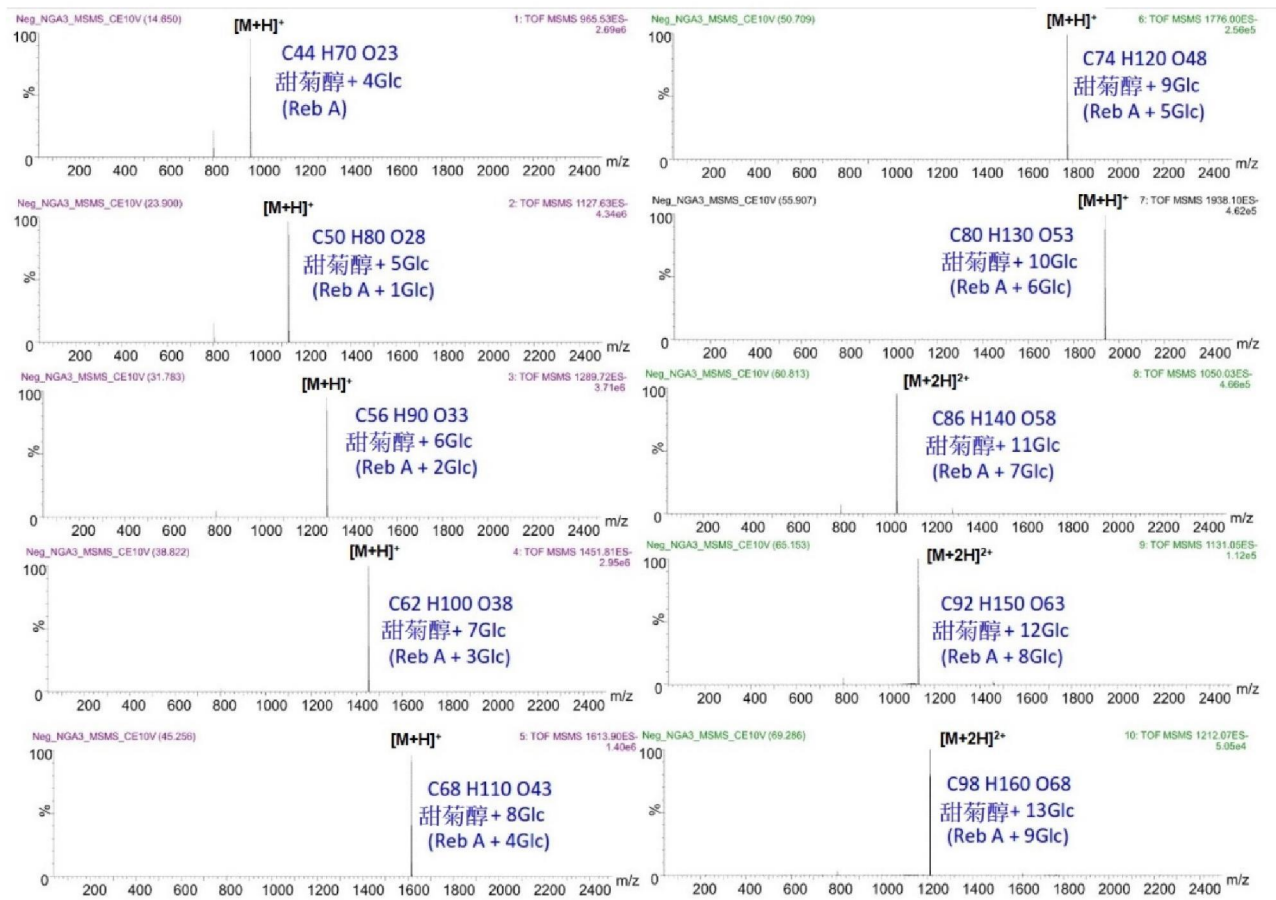
【圖3】



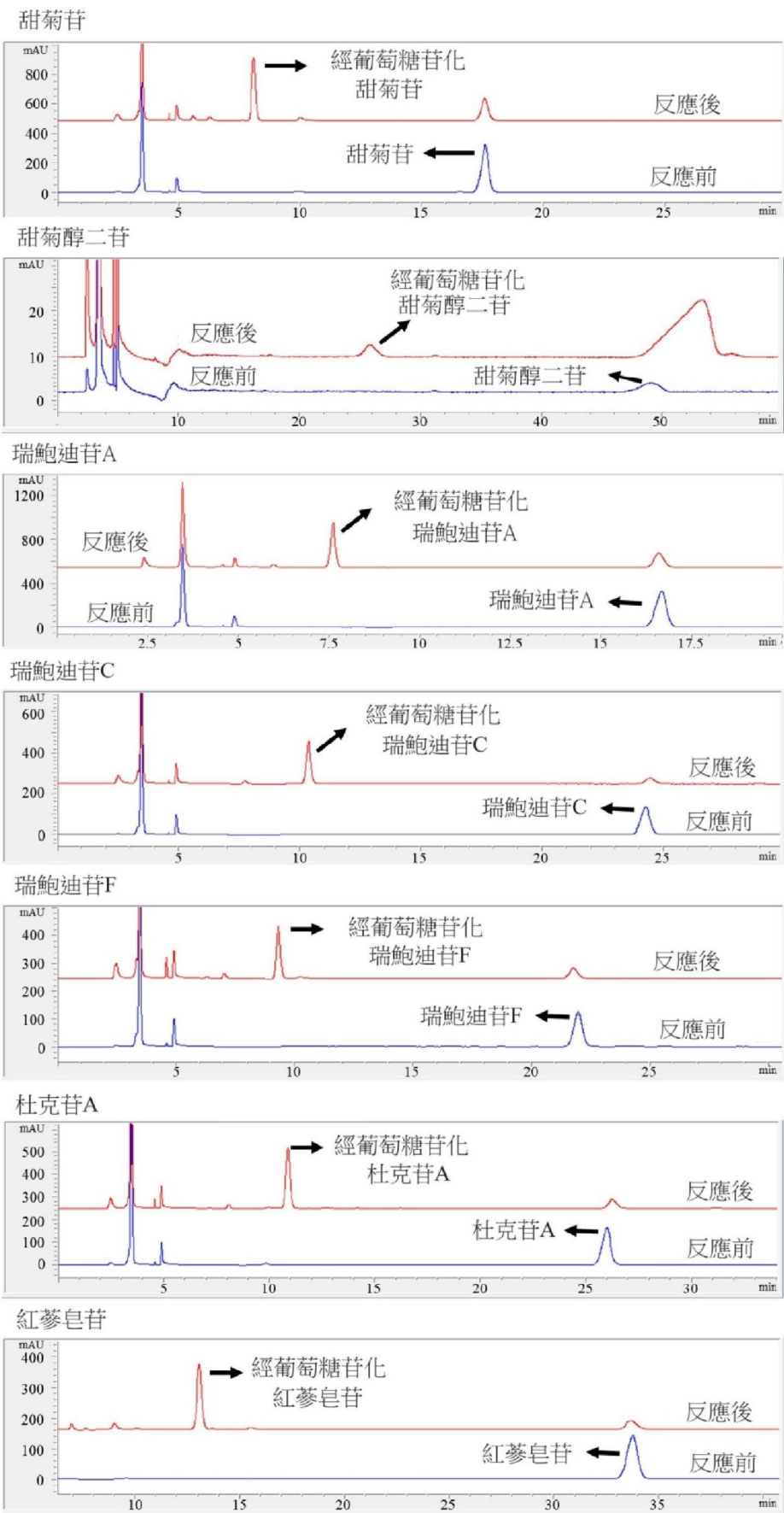
【圖4】



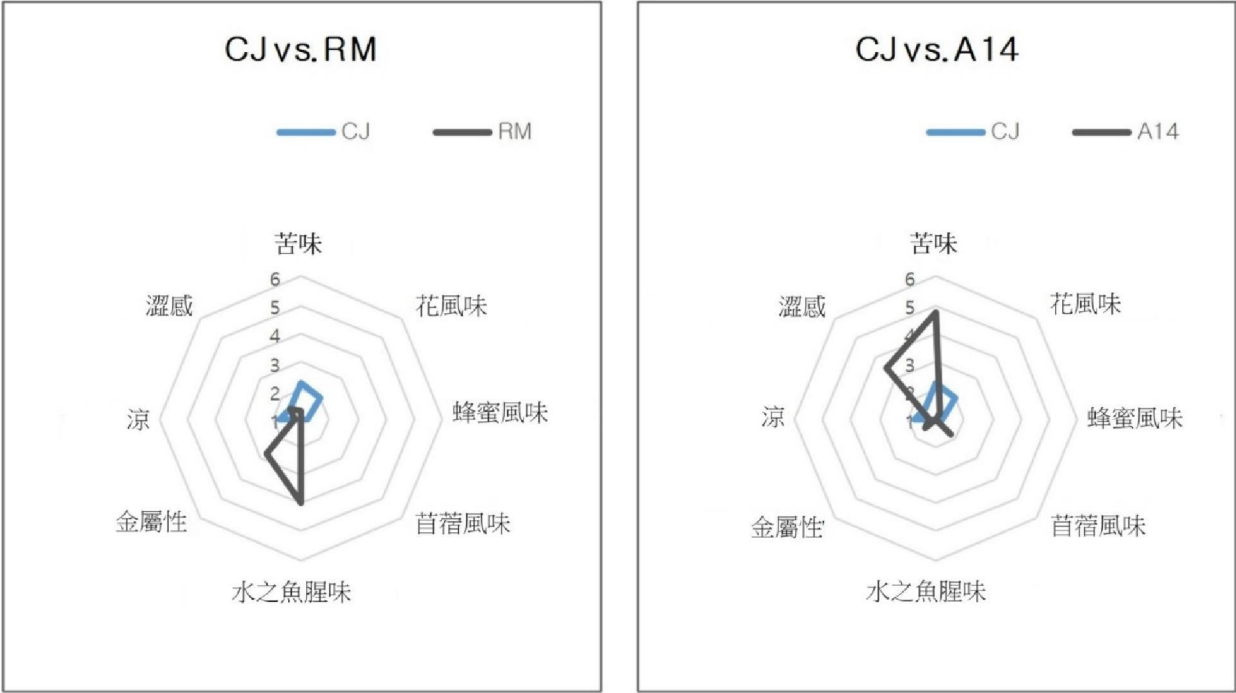
【圖5】



【圖6】



【圖7】



【圖8】