(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103270167 B
(45)授权公告日 2015.07.08

(21)申请号 201180003948.7
(22)申请日 2011.01.31
(30)优先权数据
10-2010-0108174 2010.11.02 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.03.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2011/000645 2011.01.31
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/060519 KO 2012.05.10
(73)专利权人 世宗大学校产学协力团
地址 韩国首尔
(72)发明人 俞尚镐 王韧 朴天锡
(74)专利代理机构 北京铭硕知识产权代理有限公司 11286
代理人 韩明星
(51)Int.Cl.
C12P 19/14(2006.01)
C12N 9/24(2006.01)
A23L 1/236(2006.01)
(56)对比文件
Mary An Godshall.The expanding world of nutritive and non-nutritive sweeteners.《Sugar Journal》.2007, 第69卷(第8期),12-20.
Gabrielle Potocki de Montalk et al.Amylosucrase from Neisseria polysaccharea:novel catalytic properties.《FEBS Letters》.2000, 第471卷219-223.
Gabrielle Potocki de Montalk et al.Amylosucrase from Neisseria polysaccharea:novel catalytic properties.《FEBS Letters》.2000, 第471卷219-223.
Cecile Albenne et al.Molecular basis of the amylase-like polymer formation catalyzed by Neisseria polysaccharea amylosucrase.《the Journal of Biological Chemistry》.2004, 第279卷(第1期),726-734.
Hamadas et al.Role of sweeteners in the etiology and prevention of dental caries.《Pure Appl Chem》.2002, 第74卷(第7期),1293-1300.
Emond et al.Cloning,purification and characterization of a thermostable amylosucrase from Deinococcus geothermalis.《FEBS Microbiology》.2008, 第285卷25-32.
审查员 李影

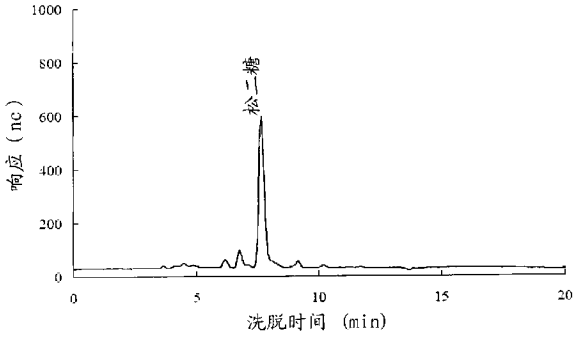
权利要求书1页 说明书9页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

利用淀粉蔗糖酶的松二糖的制备方法以及利用所述松二糖的甘味剂

(57)摘要

本发明涉及一种利用淀粉蔗糖酶的松二糖的制备方法以及利用所述松二糖的甘味剂,尤其涉及一种可以通过在单独包含蔗糖或与果糖一起包含蔗糖的溶液中处理淀粉蔗糖酶的酶反应而制备高纯度的松二糖的、高纯度松二糖的制备方法以及利用所述松二糖的甘味剂。



CN 103270167 B

1.一种松二糖的制备方法，包括以下步骤：

将淀粉蔗糖酶作用于蔗糖和果糖的混合溶液中，以发生反应而产生反应产物；

纯化反应产物以获得松二糖，

其中，包含在蔗糖和果糖的混合溶液中的蔗糖的浓度为1.0M、1.5M、2.0M或2.5M，包含在蔗糖和果糖的混合溶液中的果糖的浓度为0.25M、0.50M或0.75M。

2.如权利要求1所述的松二糖的制备方法，其特征在于，所述淀粉蔗糖酶来源于从由微生物多糖奈瑟球菌(Neisseria polysaccharea)、中度嗜热菌(Deinococcus geothermalis)以及麦氏交替单胞菌(Alteromonas macleodii)构成的组中选择的任意一种微生物。

3.如权利要求1或2所述的松二糖的制备方法，其特征在于，所述反应的反应温度为30℃至40℃。

4.如权利要求1或2所述的松二糖的制备方法，其特征在于，所述反应的pH值为6.5至7.5。

5.如权利要求1或2所述的松二糖的制备方法，其特征在于，当使用100-400units/L淀粉蔗糖酶时，所述反应的反应时间为24小时至120小时。

6.如权利要求1或2所述的松二糖的制备方法，其特征在于，所述纯化是从离子-交换柱层析法、利用活性炭的柱层析法或者利用硅胶的柱层析法中选择而进行的。

利用淀粉蔗糖酶的松二糖的制备方法以及利用所述松二糖的甘味剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用淀粉蔗糖酶的松二糖的制备方法以及利用所述松二糖的甘味剂。

背景技术

[0002] 松二糖 (turanose) 是蜂蜜中自然存在的还原性双糖类，具有相当于蔗糖甜味的一半程度的甜味，是蔗糖类似物，具有 3-O-α-D-吡喃葡糖基 -D- 果糖化学结构。

[0003] 松二糖不会被致龋微生物发酵，因此可以作为不产生热量的甘味剂使用，从而能够在食品、化妆品以及医药产业中发挥重要的作用。

[0004] 日本公开专利第 1993-252974 号是公开了一种在包含淀粉性物质和果糖的水溶液中处理环糊精葡萄糖基转移酶 (Cyclomaltodextrin Glucanotransferase) 而制备松二糖的、酶工艺的唯一一篇文献。所述酶工艺包括以下两个步骤的重要工艺 ：根据环糊精葡萄糖基转移酶而将淀粉性物质转化为果糖的转糖苷化反应 ；根据糖化酶而使所述转化产物的 α-1,4- 葡聚糖链水解的水解反应。

[0005] 然而，迄今为止尚未公开能够简单且高产率地制备高纯度松二糖的松二糖制备工艺，因此为了开发可以使用于食品的无热量的甘味剂、化妆品或医药等中使用的添加剂，研究这种松二糖制备方法是非常重要的。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 有鉴于此，本发明的发明者为了有效地生产高纯度松二糖，经过潜心研究，结果发现通过将淀粉蔗糖酶作为酶原使用而使其作用于诸如蔗糖等底物，由此能够有效地生产松二糖，并且通过简单的纯化工艺而能够有效地生产松二糖。由此，完成了本发明。

[0008] 因此，本发明的目的在于提供一种能够以产业规模简单且高产率生产高纯度松二糖的松二糖制备方法以及利用所述松二糖的甘味剂。

[0009] 技术方案

[0010] 为了实现上述目的，本发明提供一种松二糖的制备方法，包括以下步骤 ：将淀粉蔗糖酶作用于蔗糖溶液中，以发生反应而产生松二糖 ；纯化所述经过反应的混合物。

[0011] 有益效果

[0012] 根据本发明，可以通过在单独包含蔗糖或与果糖一起包含蔗糖的溶液中处理淀粉蔗糖酶，由此从蔗糖等底物易于生产高纯度松二糖，并且经过分离而纯化成高纯度，因此可以在食品、化妆品以及医药等产业中，作为重要的没有热量的甘味剂或者添加剂而有用地使用。

附图说明

[0013] 图 1 是示出未经过纯化的松二糖试样的 HPAEC 色谱图 (chromatography) 的图。

[0014] 图 2 示出经过纯化的松二糖试样的 HPLC 色谱图的图。

[0015] 图 3 是示出经过纯化的松二糖试样的 HPAEC 色谱图的图。

[0016] 图 4 示出经过纯化的松二糖试样的 HPLC-MS 色谱图的图。

[0017] 图 5 是示出基于 NMR 谱分析的经过纯化的松二糖试样。

[0018] 图 6 是示出经过纯化的松二糖试样的 TLC 色谱图的图。

[0019] 此时，通道 1 以及 7 是 G1(葡萄糖)-G7(麦芽七糖 (Maltoheptaose)) 标准物 ；通道 2 是蔗糖标准物 ；通道 3 是松二糖标准物 ；通道 4 是果糖标准物 ；通道 5 是未纯化的松二糖试样 ；通道 6 是经过纯化的松二糖试样。

具体实施方式

[0020] 本发明提供一种松二糖的制备方法，该方法包括以下步骤 ：将淀粉蔗糖酶 (amylosucrase) 作用于蔗糖溶液，使其发生反应，以生产松二糖 ；纯化所述反应物。

[0021] 本发明中所使用的淀粉蔗糖酶来源于从由微生物多糖奈瑟球菌 (Neisseria polysaccharea)、中度嗜热菌 (Deinococcus geothermalis) 以及麦氏交替单胞菌 (Alteromonas macleodii) 构成的组中选择的任意一种微生物，尤其可以来源于多糖奈瑟球菌 (Neisseria polysaccharea)，所述微生物可以根据美国专利第 6265635 号中公开的方法进行分离。

[0022] 根据本发明的一种实施例，淀粉蔗糖酶表现出 2.4U/ml 的最高活性，此时产生的松二糖的含量为 2.38mg/ml，因此可以确认淀粉蔗糖酶的比活性 (specific activity) 为 1.01U/mg 蛋白质。因此，为了提高松二糖的产率，相对于蔗糖 100g，可以包含 20 至 500mg、优选包含 40 至 150mg 的量的淀粉蔗糖酶。如果淀粉蔗糖酶的含量超出上述范围，则会引起降低反应转化率、或者增加副反应速率等问题。

[0023] 所述微生物多糖奈瑟球菌 (Neisseria polysaccharea) 在微生物生长而能够产生淀粉蔗糖酶的条件下培养，通常在约 37℃温度以及 pH 7.0 至 7.2 的条件下分离培养。对于培养时间而言，只要微生物能够充分增殖，则没有限制，例如可以培养 24 小时至 48 小时。完成微生物培养后，可以通过通常的固液相分离方法从培养物收集细胞。例如，可以在 4℃下进行离心分离，弃去上清液，获得细胞。

[0024] 尤其，可以通过将来源于所述微生物多糖奈瑟球菌 (Neisseria polysaccharea) 的淀粉蔗糖酶基因在宿主细胞例如大肠菌、芽孢杆菌、乳酸菌、霉菌内重组表达蛋白质而获得。

[0025] 细胞酶原可以使用采用通常的方法而从细胞提取的辅酶。例如，采用利用超音波或者均质机的破碎法从细胞提取酶，通过离心分离或者膜过滤处理所述提取物，获得辅酶。对于辅酶，可以不经过进一步处理而使用或者采用通常的方法纯化后使用。例如，过滤辅酶提取物，弃去不溶性物质，使所述过滤物通过镍 - 氮基三乙酸 (Ni-NTA) 亲和柱 (Affinity Column) 而纯化重组 His_6- 标记的淀粉蔗糖酶，在 4℃下，利用离心超滤装置 (Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices)，洗脱所述淀粉蔗糖酶，可以获得电泳结果均质的酶。

[0026] 对于纯化酶而言，可以直接利用或者基于通常的方法固定在载体物质上而使用。例如，可以使用对于离子交换体 (ion exchanger) 的结合法、对于树脂以及膜的共价结合以

及吸附法等方法。可以通过这种固定的方法，易于回收并多次使用作为合成酶的酶。由于酶的纯化工艺，通常消耗较多的时间和较高的费用，因此酶固定和再使用能够有助于节省相当多的费用。

[0027] 根据本发明的纯化淀粉蔗糖酶的活性可以通过如下方法测定。即，在作为底物而包含0.1M的蔗糖的50mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)900μl中，添加100μl酶溶液，在35℃下使所述混合物反应30分钟，在100℃下加热所述反应混合物10分钟，中止酶反应。利用将果糖作为标准物使用的二硝基水杨酸(DNS)法，分析游离在所述反应混合物中的果糖的量。淀粉蔗糖酶活性的1单位(unit)定义为在分析条件下每分钟促进1μmol果糖的生产的酶的量。

[0028] 对于在本发明中所使用的底物而言，可以单独使用蔗糖或者在所述蔗糖中进一步补充果糖而使用。对于所使用的蔗糖以及果糖的浓度没有特别限制。例如，在作为底物而补充有0.25M或者0.75M果糖的1.0M或者2.5M蔗糖溶液中作用时，所述酶也可以发生反应生产松二糖。并且，还可以使用包含相当高浓度的底物或者不溶解的底物的溶液。

[0029] 本发明的酶反应时，反应温度只要不是导致酶失活的温度，任意温度都可以，尤其小于或等于约40℃的温度，优选20至40℃温度。

[0030] 并且，本发明的酶反应时，反应pH可以约为6.0至9.0，但是可以优选6.5至7.5。

[0031] 并且，本发明的酶反应时，反应时间可能根据酶反应条件有所不同，但是当使用100-400units/L的纯化淀粉蔗糖酶时，可以选择24小时至120小时。

[0032] 在根据本发明而得到的反应混合物的糖组合物中，松二糖的产率表现为10％以上，优选50％以上，最高的产率为73％。过滤根据本发明而获得的糖组合物，去除杂质，用活性炭脱色。

[0033] 并且，为了对根据生产规模以及反应条件而生产的松二糖进行纯化回收，可以利用多种高纯度纯化方法。例如，可以通过利用离子－交换柱层析法、利用活性炭的柱层析法、利用硅胶的柱层析法、分步结晶法等方法，从经过反应的混合物中容易纯化出包含高纯度松二糖的产物，将获得的产物浓缩成糖浆(syrup)产物。根据需要，将糖浆产物干燥成粉末产物。

[0034] 并且，本发明提供包含根据所述制备方法而制备的松二糖的甘味剂。

[0035] 由于松二糖不会被致龋微生物发酵，因此可以作为没有热量的甘味剂而非常有用地使用，尤其可以在食物、化妆品以及医药等产业中起重要的甘味剂或者添加剂的作用。

[0036] 用于实施发明的实施方式

[0037] 以下，通过下述实施例更加详细地说明本发明，但是本发明不限于这些实施例。

[0038] <实施例1>酶准备以及纯化

[0039] 1.重组E.coli BL21储用(stock)培养物的准备

[0040] 利用根据多糖奈瑟球菌(Neisseria polysaccharea)淀粉蔗糖酶核苷酸序列而合成的两个引物，进行PCR(聚合酶链反应)，由此从多糖奈瑟球菌(Neisseria polysaccharea)ATCC 43768获得对应NpAS的基因。即，所述PCR反应利用作为模板的N.polysaccharea基因组DNA和两个寡核苷酸(序列表示符1:NPAS15'-GGA TCC GAT GTT GAC CCC CAC GCA GCA A-3';以及序列表示符2:NPAS25'-GGC AAG CTT CAG GCG ATT TCG AGC CAC AT-3')而进行。

[0041] 将其结果获得的PCR产物在T-easy vector(Promega,Madison,WI,USA)中克隆，通过DNA测序，确认PCR反应时是否存在任何错配。采用BamHI和HindII而酶切插入片段，然后将获得的片段插入到采用相同的酶进行处理的pRSET-B载体，获得NpAS表达载体的pRSET-NpAS。为了有效地表达基因，将pRSET-NpAS转化到E.coli BL21。

[0042] 2.酶准备

[0043] 将由1％(w/v)Bacto胰蛋白胨、0.5％(w/v)酵母提取物、0.5％(w/v)氯化钠以及水组成的液体营养培养基的pH调整为pH7.0。将500ml的培养基放入到在120℃下经过15分钟灭菌的1000ml Erlenmeyer烧瓶内，然后经冷却后，接种前述准备好的重组E.coli BL21储用培养物，然后在0.01％(w/v)氨苄青霉素(ampicillin)的存在下，在37℃下培养。当细胞的光学密度达到约0.6时，将0.1M的异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)1ml加入到培养物中，诱导基因表达。在16℃下，培养12小时后，在4℃、5,500×g下，离心分离20分钟，获得细胞。

[0044] 3.酶纯化

[0045] 在50mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)50ml中对前述准备好的培养物进行完全再悬浮，然后利用超音波破碎仪(Sonic Dismembrator 550,Fisher Scientific Co.)Model D100，破碎细胞。将获得的混合物在4℃、11,000×g下离心分离20分钟，除去细胞碎片。利用针头式过滤器对获得的上清液进行过滤后，使5ml过滤液通过镍-氮基三乙酸(Ni-NTA)亲和柱，纯化重组His_6-标记的淀粉蔗糖酶。在洗脱His_6-标记的淀粉蔗糖酶之前，事先用20ml清洗缓冲液(50mM Tris、300mM氯化钠、20mM咪唑、pH 7.0)清洗Ni-NTA亲和柱，然后采用5ml洗脱缓冲液(50mM Tris、300mM氯化钠、250mM咪唑、pH 7.0)洗脱淀粉蔗糖酶蛋白质，然后在4℃下，利用离心超滤装置(Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices(Millipore Corporation,Billerica,美国))进行浓缩。获得具有在电泳结果中呈现单一的蛋白质条带的酶制剂。

[0046] <实施例2>未纯化松二糖的制备

[0047] 1.从蔗糖获得的松二糖的制备

[0048] 将在前述的实施例中获得的纯化淀粉蔗糖酶400unit/L加入到包含2.0M蔗糖的溶液中，在35℃下加热72小时，进行酶反应。反应后，在煮沸的水中对酶加热10分钟，使酶失去活性。利用具有脉冲电流检测仪(Dionex,美国)的DX-300series HPAEC system(Dionex,美国)分析获得的反应产物。此时，将市场上销售的葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖以及松二糖作为标准物使用，分析糖类。其结果如下述表1以及图1。

[0049] 表1

[0050]

糖类	HPAEC保留时间(min)	糖类组分(％)
葡萄糖	4.00	0.7
果糖	4.33	20.7
蔗糖	6.75	4.9

松二糖	7.75	51.1
其他糖类	-	22.6

[0051] 2. 根据反应时间的反应产物的糖组分分析

[0052] 将在前述实施例中获得的纯化淀粉蔗糖酶 400unit/L 加入到包含 2.0M 蔗糖的溶液中，在 35℃下，进行酶反应。以预定的时间间隔收集试样，在 100℃下煮 10 分钟，使剩余的酶失活。然后，利用 HPAEC(High performance anion-exchange chromatography：高效阴离子交换色谱法）与前述的实施例类似地对各试样的糖组分进行分析，其结果如表 2。

[0053] 表 2

[0054]

反应时间(hour)	糖组分(%)				
	葡萄糖	果糖	蔗糖	松二糖	其他糖类
24	0.5	9.6	52.9	25.2	11.8
72	0.7	20.7	4.9	51.1	22.6
120	0.9	20.8	5.0	52.0	21.3

[0055] 从表 2 可以得知，根据本发明的纯化淀粉蔗糖酶在作为底物利用 2.0M 的蔗糖在 35℃下至少反应 72 小时时，形成包含约 50％的松二糖的糖类组合物。表现出约 20％的产率的本发明的另一种主要产物是果糖，而其余是葡萄糖、未消耗的蔗糖以及其他糖类。

[0056] <实施例 3>对于松二糖产率的酶量的影响

[0057] 将在 1.0M 蔗糖溶液中添加根据本发明的纯化淀粉蔗糖酶 100unit/L、200unit/L 或者 400unit/L 而获得的混合物，在 35℃下进行酶反应。以预定的时间间隔收集试样，在 100℃下煮 10 分钟，使剩余的酶失活。利用 HPAEC 对各试样的糖组分进行分析。在多种酶活性下，各试样的松二糖的产量和反应时间如下述表 3。

[0058] 表 3

[0059]

松二糖产率 (%)		酶量 (units/L)		
		100	200	400
反应时间 (hour)	24	8.8 ± 0.3	19.3 ± 0.8	30.7 ± 0.2
	72	27.4 ± 1.0	30.8 ± 0.2	31.7 ± 0.3
	120	31.4 ± 0.5	31.6 ± 0.6	31.8 ± 0.5

[0060] 从上述表 3 可以得知，100unit/L 的纯化淀粉蔗糖酶，反应 120 小时后，以约 30％的产量产生松二糖；400unit/L 的纯化淀粉蔗糖酶，只反应 24 小时后，以约 30％的产量产生松二糖。

[0061] <实施例 4>对于松二糖产率的温度的影响

[0062] 将根据本发明的纯化淀粉蔗糖酶 400unit/L 加入到包含 1.0M、1.5M 或 2.0M 蔗糖的溶液中，分别在 30℃、35℃以及 40℃下进行酶反应。反应 72 小时后，在 100℃下，对试样加热 10 分钟，使剩余的酶失活，利用 HPAEC 对各试样的糖组分进行分析。在下述表 4 中示出了在多种蔗糖浓度以及温度下的、各试样的松二糖的产率。

[0063] 表 4

[0064]

松二糖产率 (%)		温度 (℃)		
		30	35	40
蔗糖浓度(M)	1.0	33.9 ± 0.1	31.7 ± 0.3	29.6 ± 0.0
	1.5	38.7 ± 0.4	36.1 ± 0.5	34.7 ± 0.0
	2.0	34.2 ± 0.2	51.1 ± 0.0	38.7 ± 1.1

[0065] 如表 4 所示，根据本发明的纯化淀粉蔗糖酶在作为底物利用 2.0M 的蔗糖在 35℃下反应 72 小时时，产生约 50％松二糖。

[0066] <实施例 5> 对于松二糖产率的蔗糖浓度的影响

[0067] 将根据本发明的纯化淀粉蔗糖酶 400unit/L 加入到包含 1.0M、1.5M、2.0M 或 2.5M 蔗糖的溶液中，在 35℃下，分别进行酶反应。以预定的时间间隔收集试样后，在 100℃下，对试样加热 10 分钟，使剩余的酶失活。利用 HPAEC 对各试样的糖组分进行分析。在下述表 5 中示出了在多种蔗糖浓度以及反应温度下的、各试样的松二糖的产率。

[0068] 表 5

[0069]

松二糖产率(%)		蔗糖浓度 (M)			
		1.0	1.5	2.0	2.5
反应时间 (hour)	24	30.7 ± 0.2	26.5 ± 0.2	25.1 ± 0.1	17.9 ± 0.0
	72	31.7 ± 0.3	36.1 ± 0.5	51.1 ± 0.0	41.0 ± 0.8
	120	31.8 ± 0.5	37.4 ± 0.3	52.0 ± 0.9	56.2 ± 0.3

[0070] 如表 5 所示，蔗糖浓度越高，最终生产更多的松二糖。利用 2.5M 蔗糖溶液时，反应 120 小时后，以约 55％高产率生产松二糖。

[0071] <实施例 6> 对于松二糖产率的果糖添加的影响

[0072] 准备含有多种浓度的蔗糖 (1.0M、1.5M 或者 2.0M) 以及果糖 (0.25、0.50 或者 0.75M) 的溶液，然后将根据本发明的纯化淀粉蔗糖酶 400unit/L 分别加入到各溶液中，在 35℃下，分别进行酶反应。反应 96 小时后，在 100℃下，对试样加热 10 分钟，使剩余的酶失活，利用 HPAEC 对各试样的糖组分进行分析。在下述表 6 中示出了在多种蔗糖浓度以及果糖浓度下的、各试样的松二糖的产率。

[0073] 表 6

[0074]

松二糖产率(%)		果糖 (M)			
		0	0.25	0.50	0.75
蔗糖浓度 (M)	1.0	30.9 ± 0.8	45.8 ± 0.1	57.2 ± 0.2	62.8 ± 1.1
	1.5	36.5 ± 0.6	49.8 ± 0.1	58.6 ± 0.3	65.4 ± 0.4
	2.0	50.9 ± 0.1	60.0 ± 0.1	67.1 ± 0.4	73.1 ± 0.6

[0075] 如表 6 所示，果糖浓度越高，最终生产更多的松二糖。当在各反应培养基中加入 0.75M 果糖时，以约 60％高产率生产松二糖。

[0076] ＜实施例 7＞从蔗糖的纯化松二糖的制备

[0077] 1. 酶准备以及纯化

[0078] 在由 1％ (w/v)Bacto 胰蛋白胨、0.5％ (w/v) 酵母提取物、0.5％ (w/v) 氯化钠以及水组成的灭菌液体营养培养基的 5L 中接种重组 E.coli BL21 储用培养物，在 0.01％ (w/v) 氨苄青霉素 (ampicillin) 的存在下，在 37℃下培养 4 小时。然后，将 0.1M 的异丙基－β-D- 硫代半乳糖吡喃糖苷 (Isopropyl - β-D-thiogalactopyranoside)10ml 加入到培养物中。在 16℃下，培养 16 小时后，在 4℃、5,500×g 下，进行离心分离 30 分钟，获得细胞。

[0079] 在 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0)500ml 中对获得的细胞培养物进行再悬浮，然后利用超音波破碎仪 (Sonic Dismembrator 550,Fisher Scientific Co.)Model D100，破碎细胞。对获得的细胞悬浮液进行离心分离，获得上清液，然后利用 0.45μm 针头式过滤器对获得的上清液进行过滤，利用镍－氮基三乙酸 (Ni-NTA) 亲和柱进行纯化，利用离心超滤装置 (Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices(Millipore Corporation,Billerica, 美国)) 进行浓缩。约 100ml 酶浓缩液最终表现出约 2.4unit/ml 的活性。

[0080] 2. 从蔗糖的纯化松二糖的制备

[0081] 准备包含最终浓度为 2.5M 的蔗糖的溶液，将所述纯化淀粉蔗糖酶 400unit/L 加入到所述溶液中，在 35℃下，进行 120 小时酶反应。然后，将经过反应的混合物在 100℃下加热 10 分钟，进行冷却，利用 0.45μm 针头式过滤器进行过滤，除去不溶性物质，然后利用依次具有诸如 JAIGEL W-251 以及 W-252(20mm×500mm) 的两个亲水性制备柱的制备高速液相色谱 (model LC-9104 ;JAI Ltd.,Tokyo,Japan) 进行纯化。为了洗脱试样，以 3mL/min 流速使用去离子水。获得松二糖馏分 (fraction)，进行浓缩，冷冻干燥，获得大量包含具有约 96％纯度和约 65％产率的松二糖的糖粉末。

[0082] 3. 形态分析

[0083] 利用包含前述制备的松二糖的高纯度糖粉末，进行下述的形态分析。

[0084] 1)HPAEC(高效阴离子交换色谱法)

[0085] 利用具有脉冲电流检测仪 (Dionex, 美国) 的 DX-300series HPAEC system(Dionex, 美国)，分析前述准备好的高纯度糖粉末，此时将市场上销售的葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖以及松二糖作为标准物使用。其结果，如图 3 所示，可以确认出从蔗糖形成了松二糖。

[0086] 2)HPLC-MS(高效液相色谱－质谱法)

[0087] 利用阳离子模式电喷雾，在 Agilent 1100series MSD(Agilent Technologies,Palo Alto,CA, 美国）上获得前述纯化的松二糖的质谱，试样溶液以 0.8ml/min 的流速注入到电喷雾源，注入容量为 10μl。在将毛细管电压 (capillary voltage) 维持在 4kV 的期间，将破碎电压固定在 150V。这种电喷雾源的温度维持在 350℃，检测扫描范围设定在 m/z 100 ～ 1400。

[0088] 其结果，如图 4 所示，高纯度糖粉末在 MS m/z 365.3 下，呈现离子 $(M+Na)^+$，因此确认出所述糖类为双糖类。

[0089] 3)NMR(核磁共振)

[0090] 利用 600MHz NMR 系统 (Rheinstetten, 德国)，进行 NMR(核磁共振) 分析，此时将纯化松二糖溶于纯 D_2O(重水) 而使用。根据标准试验方法，记录 HSQC(heteronuclear single quantum correlation :异核单量子相关) 谱、^{13}C 以及 ^{1}H NMR 谱 (核磁共振氢谱)。数据处理利用 TopSpin® 2.0 软件 (Bruker BioSpin,Rheinstetten, 德国) 而进行。

[0091] 纯化松二糖的 ^{13}C NMR 谱 (核磁共振 ^{13}C 谱) 的分析结果，如下述表 7 以及图 5 所示，确认出是诸如 3-O-α-D-吡喃葡糖基 -α-D-呋喃果糖、3-O-α-D-吡喃葡糖基 -β-D-呋喃果糖以及 3-O-α-D-吡喃葡糖基 -β-D-吡喃果糖等松二糖互变异构体。

[0092] 表 7

[0093]

互变异构体	化学位移（Chemical shift）（ppm）											
	α-D-吡喃葡糖基单位						D-果糖单位					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
3-O-α-D-吡喃葡糖基-α-D-呋喃果糖	97.1	71.5	73.1	69.6	74.8	60.5	61.3	104.5	85.0	72.5	81.8	63.0
3-O-α-D-吡喃葡糖基-β-D-呋喃果糖	98.7	71.7	72.9	69.6	74.6	60.5	62.5	101.9	80.8	72.6	81.1	63.1
3-O-α-D-吡喃葡糖基-β-D-吡喃果糖	101.2	72.3	73.1	69.6	73.0	60.7	64.3	98.0	76.9	70.5	69.3	63.6

[0094] 4)TLC(薄层色谱法)

[0095] TLC 分析是利用 Whatman K6 硅胶板进行的。此时，将乙腈 (acetonitrile)、乙酸乙酯 (ethyl acetate)、1- 丙醇 (1-propanol) 以及水 (85:20:20:15v/v) 作为溶剂体系使用。将溶解于甲醇的 0.3% (w/v)N-(1- 萘基)- 乙二胺和 5% (v/v) 硫磺酸喷洒在板上，在 110℃下，对板进行加热 10 分钟，进行着色。

[0096] 其结果，如图 6 所示，确认出所述糖类是松二糖。

[0097] < 实施例 8> 从蔗糖的纯化松二糖的制备

[0098] 准备包含最终浓度为 2.0M 的蔗糖和最终浓度为 0.75M 的果糖的溶液，将纯化淀粉蔗糖酶 400unit/L 加入到所述溶液中，在 35℃下，进行 96 小时酶反应。然后，将反应混

合物在 100℃下加热 10 分钟，使剩余的酶失活，冷却至室温。所获得的反应混合物包含约 73％的松二糖（参照图 1）。为了从其他产物分离松二糖，首先利用 0.45μm 针头式过滤器对反应混合物进行过滤，除去不溶性物质，然后适用于依次具有诸如 JAIGEL W-251 以及 W-252(20mm×500mm) 的两个亲水性制备柱的制备高速液相色谱 (model LC-9104 ;JAI Ltd.,Tokyo,Japan)。为了洗脱试样，以 3mL/min 流速使用去离子水。获得松二糖馏分（图 2 的馏分 C)，进行浓缩，冷冻干燥，获得大量包含具有约 96％纯度和约 65％产率的松二糖的糖粉末（图 3)。

[0099] 对于本发明内容的特定部分详细说明到此，但是本领域中具有普通知识的技术人员应该知晓，这种具体的说明仅仅属于优选实施方式，本发明的范围不限于此。因此，本发明的实质性范围应当被附带的权利要求及其均等物限定。

[0100] 序列表自由内容

[0101] 序列标识符 1 是 NPAS1 引物的碱基序列，序列标识符 2 是 NPAS2 引物的碱基序列。

[0001]

MSP1203079W-序列表

<110> 世宗大学校产学协力团

<120> 利用淀粉蔗糖酶的松二糖的制备方法以及利用所述松二糖的甘味剂

<130> DP-2010-0560

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> NPAS1

<400> 1
ggatccgatg ttgaccccca cgcagcaa 28

<210> 2
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> NPAS2

<400> 2
ggcaagcttc aggcgatttc gagccacat 29

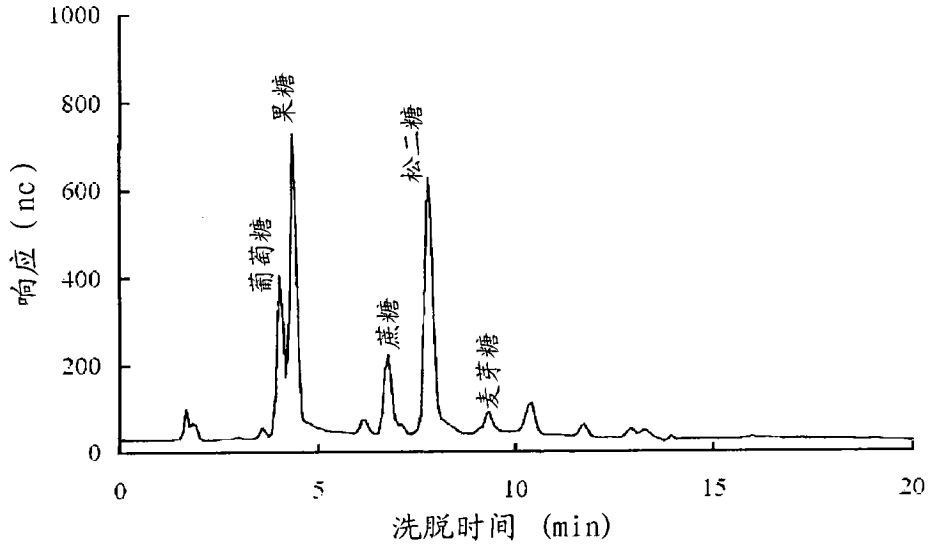

1000
800
600
400
200
0
响应（nc）
葡萄糖
果糖
蔗糖
松二糖
麦芽糖
0
5
10
15
20
洗脱时间 (min)

图 1

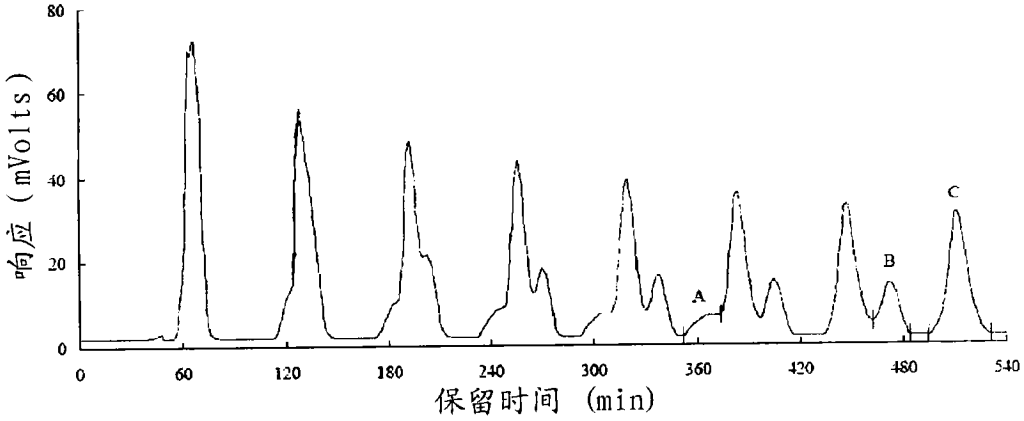

80
60
40
20
0
响应（mVolts）
A
B
C
0
60
120
180
240
300
360
420
480
540
保留时间 (min)

图 2

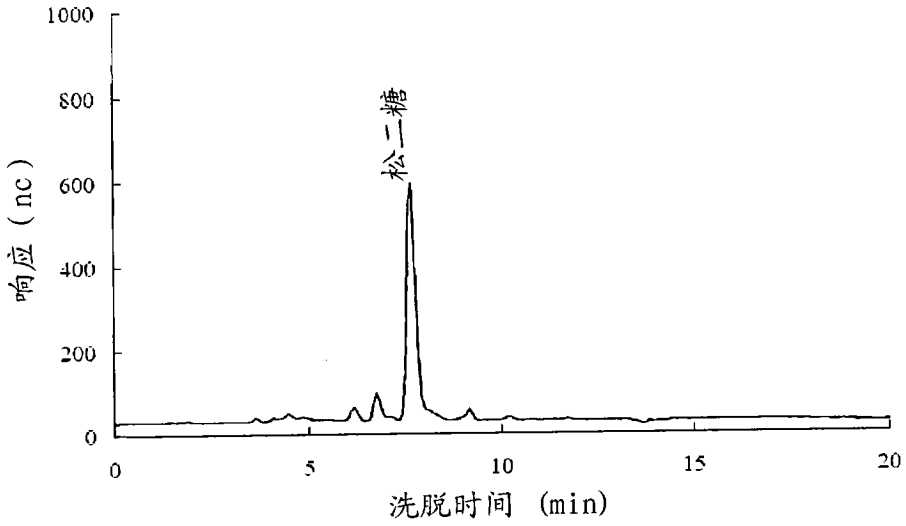

1000
800
600
400
200
0
响应（nc）
松二糖
0
5
10
15
20
洗脱时间 (min)

图 3

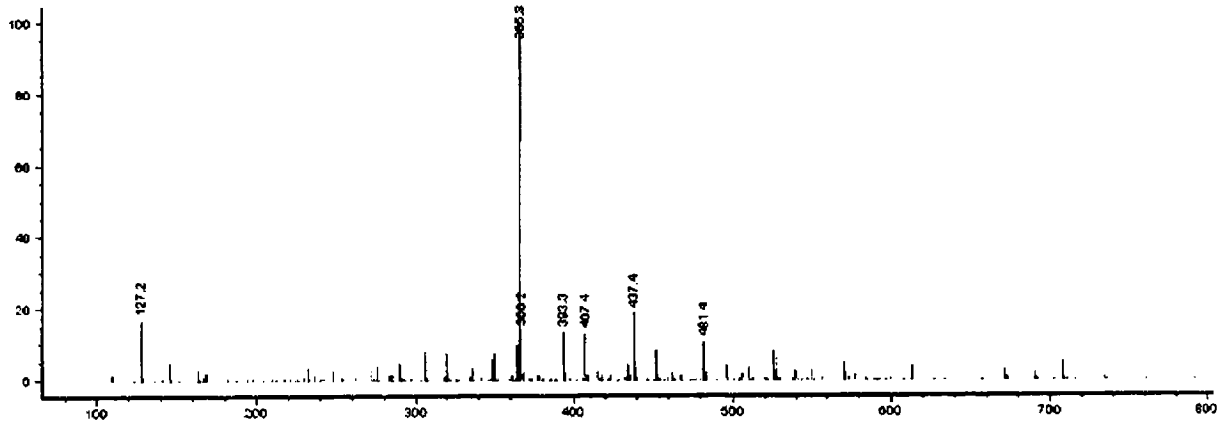

100
80
60
40
20
0
127.2
365.3
383.3
407.4
437.4
481.4
100
200
300
400
500
600
700
800

图 4

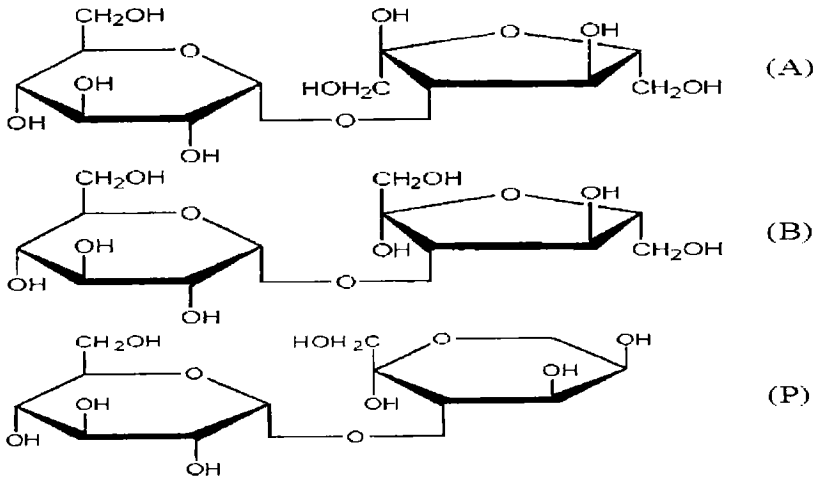

(A)
(B)
(P)

图 5

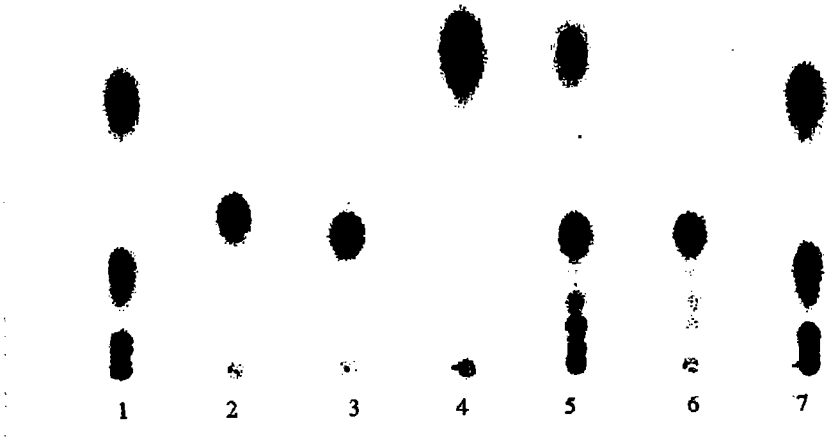


图 6