(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119546774 A
(43)申请公布日 2025.02.28

(21)申请号 202380053382.1
(22)申请日 2023.07.10
(30)优先权数据
FR2207071 2022.07.11 FR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/FR2023/051068 2023.07.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/013451 FR 2024.01.18
(71)申请人 罗盖特公司
地址 法国莱斯特朗
(72)发明人 P·拉诺斯 M·拉梅特
M·雷莫德-西米恩 C·穆里斯
S·披祖特-塞林 E·塞维拉克
(74)专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205
专利代理师 马爽 黄健
(51)Int.Cl.
C12P 19/18(2006.01)
C12N 9/10(2006.01)
C13K 13/00(2006.01)
A23K 20/163(2006.01)
A23L 29/30(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表（电子公布）

(54)发明名称

用于可溶性纤维的酶促生产的方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于由富含聚合度(DP)为4的低聚糖的底物制备不易消化的α-葡聚糖混合物的方法。

CN 119546774 A

1.一种用于制备α-葡聚糖混合物的方法,所述方法包括将底物和酶混合在一起的步骤,所述底物是富含聚合度(DP)为4的低聚糖的糖浆,并且所述酶是能够裂解α(1,4)糖苷键并且能够产生α(1,6)糖苷键的α-葡聚糖转移酶。

2.根据权利要求1所述的方法,其中富含DP为4的低聚糖的所述糖浆包含至少40%、优选地至少45%、甚至更优选地至少50%的DP为4的低聚糖。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中富含DP为4的低聚糖的所述糖浆的右旋糖当量(DE)大于20。

4.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述底物的浓度介于50g/L反应介质与500g/L反应介质之间、优选地介于100g/L反应介质与200g/L反应介质之间。

5.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中能够裂解α(1,4)糖苷键并且能够产生α(1,6)糖苷键的所述α-葡聚糖转移酶是具有序列SEQID No:1的蛋白质或与具有所述序列SEQ ID No:1的所述蛋白质具有至少90%同一性的蛋白质。

6.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述酶的浓度介于0.01mg/mL反应介质与1mg/mL反应介质之间、优选地介于0.05mg/mL反应介质与0.5mg/mL反应介质之间、甚至更优选地为约0.1mg/mL反应介质。

7.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于将所述底物和所述酶混合在一起持续介于12小时与48小时之间、优选地约24小时的时间段,并且/或者在包含介于20℃与40℃之间、优选地约37℃的温度下混合在一起,并且/或者在介于5与6.5之间、优选地约5.75的pH下混合在一起。

8.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于所述方法还包括通过能够裂解α(1,4)糖苷键并且能够产生α(1,3)糖苷键的α-葡聚糖转移酶进行酶促处理的步骤。

9.根据前述权利要求所述的方法,其中能够裂解α(1,4)糖苷键并且能够产生α(1,3)糖苷键的所述α-葡聚糖转移酶是具有序列SEQ ID No:2的蛋白质或与具有所述序列SEQ ID No:2的所述蛋白质具有至少90%同一性的蛋白质。

10.一种能够通过根据前述权利要求中任一项所述的方法获得的α-葡聚糖混合物。

11.一种α-葡聚糖混合物,其特征在于所述α-葡聚糖混合物具有:

-含量小于55%、优选地小于50%、甚至更优选地小于45%的可水解纤维,

-和/或至少20%的α(1,6)键,

其中所述纤维含量对应于根据AOAC 2002.02方法的可水解部分,并且α(1,6)键的百分比表示通过由Hakomori方法测量的相对于糖苷键的总数的α(1,6)键的摩尔百分比。

12.根据权利要求10或11中任一项所述的α-葡聚糖混合物在制备用于人或动物营养的食品中的用途。

13.能够裂解α(1,4)糖苷键并且能够产生α(1,6)糖苷键以便降低α-葡聚糖混合物的可消化性的葡聚糖转移酶的用途,所述葡聚糖转移酶具有序列SEQ ID No:1或与具有序列SEQ ID No:1的所述蛋白质具有至少90%同一性的序列。

用于可溶性纤维的酶促生产的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于由富含聚合度(DP)为4的低聚糖的底物制备不易消化的α-葡聚糖混合物的方法。在本申请中,该底物指定含有低聚糖的糖浆,其中聚合度(DP)为4的低聚糖的含量为至少40%、优选地至少45%、甚至更优选地至少50%。

[0002] 本发明还涉及不易消化的α-葡聚糖的混合物。

[0003] 本发明还涉及能够产生α(1,6)糖苷键的α-葡聚糖转移酶的用途,其用于降低α-葡聚糖混合物的可消化性。

现有技术

[0004] 膳食纤维在人类营养中具有重要作用。在膳食纤维中,存在可溶于水并具有胶凝能力的可溶性纤维与不溶性纤维的区分。可溶性纤维(包括支链麦芽糖糊精)是特别有利的,因为它们不易消化。因此,将它们掺入饮食中可以降低食物的血糖指数并延长饱腹感。它们还具有对肠道菌群的益生元性质;换句话讲,它们能够选择性地促进某些益生菌类型细菌的生长或微生物群的活性,提供健康益处。

[0005] 迄今为止,包括支链麦芽糖糊精的可溶性纤维主要通过物理化学方法获得。

[0006] 特别是本申请人公司以商品名NUTRIOSE®FM10销售的麦芽糖糊精作为水溶性纤维的情况。

[0007] 存在通过物理化学方法获得的其他可溶性纤维,诸如由泰莱集团(Tate and Lyl)销售的PROMITOR®、由杜邦营养与生物科学公司(Dupont Nutrition and Biosciences)销售的FIBERSOL®或LITESSE®。

[0008] 许多研究已经证明,可消化性特性与可溶性纤维内各种类型的糖苷键的百分比直接相关。

[0009] 实际上,标准麦芽糖糊精是能够快速消化的并且被定义为基本上在α1→4(下文中1→4或α(1,4))处与仅4%至5%的α1→6糖苷键(下文中1→6或α(1,6))连接的葡萄糖和葡萄糖聚合物的纯化且浓缩的混合物,具有变化极大的分子量,完全可溶于水并且具有低还原能力。

[0010] 通过增加α1→6键或α1→3键的百分比,麦芽糖糊精的支化度增加,这使得它们更耐消化。

[0011] 使用能够促进“支链”型键形成的酶的酶促方法在安全和环境保护方面具有许多优点,并且还提供更好的特异性。

[0012] 最初,大多数生产可溶性纤维的酶促方法是使用蔗糖作为酶的底物来进行的,以便产生新键。例如,WO2015183714描述了由蔗糖和α-葡聚糖型底物的混合物进行的酶促反应。

[0013] 目前,大多数酶促方法使用淀粉麦芽糖酶由淀粉生产可溶性纤维。

[0014] 期望在不存在蔗糖的情况下从底物获得酶溶性纤维。

具体实施方式

[0015] 申请人公司然后已经发现,可由富含聚合度(DP)为4的低聚糖的糖浆通过酶促方法获得在人和动物营养中的目标纤维。因此,本申请人公司开发了一种使用特定酶的方法,该方法能够由富含DP4低聚糖的糖浆产生α(1,6)键。

[0016] 在第一方面,本发明涉及用于一种用于制备α-葡聚糖混合物(优选地支链麦芽糖糊精混合物)的方法,该方法包括将底物和酶混合在一起的步骤,所述底物是富含聚合度(DP)为4的低聚糖的糖浆,并且所述酶是能够裂解α(1,4)糖苷键并且能够产生α(1,6)糖苷键的α-葡聚糖转移酶。

[0017] 根据本发明,术语"α-葡聚糖"、"可溶性纤维"、"食品可溶性纤维"可互换使用。它们定义了由通过α-糖苷(或α-葡萄糖甙)键连接在一起的至少3个葡萄糖单元组成的低聚糖。

[0018] α-葡聚糖的分类主要基于对它们还原能力的测量,通常以"右旋糖当量"(DE)的概念表示。关于这一点,食品化学法典(Food Chemical Codex)的专题规范(Monograph Specifications)中给出的麦芽糖糊精的定义规定了麦芽糖糊精的DE值不得超过20。超过20的话,这些是葡萄糖浆。

[0019] 然而,此类DE测量不足以准确地表示α-葡聚糖的分子分布。实际上,完全无规的淀粉的酸水解或稍微更有序的淀粉的酶水解提供了葡萄糖和葡萄糖聚合物的混合物,仅用DE测量不能对混合物进行精确地定义,并且其包含短尺寸、低DP的分子以及非常长尺寸、高DP的分子。

[0020] 事实上,DE的测量仅给出了葡萄糖和α-葡聚糖的组成葡萄糖聚合物的混合物的平均DP以及由此得到的它们的数均分子量(Mn)的近似概念。为了完成α-葡聚糖的分子量分布的表征,重要的是确定另一参数,即,重均分子量(Mw)。

[0021] 在实施过程中,(Mn)和(Mw)通过不同的分析技术(诸如例如适用于葡萄糖聚合物的测量方法,其基于在用已知分子量的支链淀粉校准的色谱柱上的凝胶渗透色谱法)进行实验测定。

[0022] Mw/Mn比称为多分子性指数(PI),并且可以表征聚合物共混物的总体分子量分布。通常,标准麦芽糖糊精的分子量分布导致IP值介于5与10之间。

[0023] 这些各种参数也是α-葡聚糖的α-糖苷键分布的反映。实际上,标准α-葡聚糖的混合物具有非常高百分比的"直链"α(1,4)键(大于90%)和低百分比的所谓"支链"(α(1,2)键、α(1,3)键和α(1,6)键)。

[0024] 根据本发明的方法可以降低α(1,4)键相对于α(1,6)键的百分比,这具有降低通过该方法获得的α-葡聚糖混合物的可消化性的优点。

[0025] 根据本发明的方法制备的α-葡聚糖混合物优选地是支链麦芽糖糊精混合物。

[0026] 对于本发明而言,支链麦芽糖糊精被理解为是具有比标准麦芽糊精更高的α(1,6)糖苷键含量的麦芽糊精。

[0027] 标准麦芽糖糊精被定义为基本上在α(1,4)处与仅4%至5%的α(1,6)糖苷键连接的葡萄糖和葡萄糖聚合物的纯化且浓缩的混合物,具有变化极大的分子量,完全可溶于水并且具有低还原能力。

[0028] 根据本发明的一个实施方案,富含DP为4的低聚糖的糖浆包含至少40%、优选地至

少45％、甚至更优选地至少50％的DP为4的低聚糖。

[0029] 根据本发明的一个实施方案,富含DP为4的低聚糖的糖浆的右旋糖当量(DE)大于20。

[0030] 根据本发明的一个优选的实施方案,富含DP4的糖浆是具有如下表1所述的特征的糖浆。

[0031] 在本发明的一个优选的实施方案中,底物在反应介质中以介于50g/L与500g/L之间、优选地介于100g/L与200g/L之间的浓度存在。

[0032] 在本发明的一个优选的实施方案中,能够裂解α(1,4)糖苷键并且能够产生α(1,6)糖苷键的α-葡聚糖转移酶是具有序列SEQ ID No:1的蛋白质或与具有序列SEQ ID No:1的蛋白质具有至少90％同一性的蛋白质(下文中被称为GT#19)。优选地,它是与具有序列SEQ ID No:1的蛋白质具有至少91％、甚至更优选地至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％、至少99.9％同一性的蛋白质。序列SEQ ID No:1对应于Genbank登录号WP_053069107.1。

[0033] 如示例中所示,本发明人已经证明酶GT#19能够修饰富含DP4的糖浆以使其不易消化,根据方法AOAC2002.02的水解百分比小于或等于45％)。

[0034] 根据本发明的一个实施方案,酶以介于0.01mg/mL反应介质与1mg/mL反应介质之间、优选地介于0.05mg/mL反应介质与0.5mg/mL反应介质之间、甚至更优选地约0.1mg/mL反应介质的浓度添加。

[0035] 根据本发明的一个实施方案,使底物和酶接触持续介于12小时与48小时之间、优选地约24小时的时间段。

[0036] 根据本发明的一个实施方案,使底物和酶在介于20℃与40℃之间、优选地约37℃的温度下混合在一起。

[0037] 根据本发明的一个实施方案,使底物和酶在介于5与6.5之间、优选地介于5.5与6之间、甚至更优选地约5.75的pH下混合在一起。

[0038] 在本发明的一个实施方案中,该方法还包括通过能够裂解α(1,4)糖苷键并且能够产生α(1,3)糖苷键的α-葡聚糖转移酶进行酶促处理的步骤。例如,它可以是具有序列SEQ ID No:2的蛋白质或与具有序列SEQ ID No:2的蛋白质具有至少90％同一性的蛋白质(下文中被称为GT#11)。优选地,它是与具有序列SEQ ID No:2的蛋白质具有至少91％、甚至更优选地至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％、至少99.9％同一性的蛋白质。序列SEQ ID No:2对应于Genbank登录号AOR73699.1。

[0039] 根据一个方面,本发明还涉及一种可通过上文所述的方法获得的α-葡聚糖混合物、优选地支链麦芽糖糊精混合物。

[0040] 根据AOAC 2002.02方法,这种α-葡聚糖混合物的特征在于其低可消化性。有利的是,根据本发明的方法使得可以相对于起始底物将根据AOAC 2002.02方法测量的可水解部分降低至少2倍、优选地至少2.5倍、甚至更优选地至少3倍。

[0041] AOAC 2002.02方法可具体地使用由公司Megazyme®销售的“淀粉抗性,K-RSTAR 06/18”试剂盒的“HPAEC-PAD测定法”部分来实施,如下文实施例1部分5所述。

[0042] 根据本发明的方法使得可以相对于起始底物将α(1,6)键的百分比增加至少3倍、优选地至少3.5倍、甚至更优选地至少4倍。

[0043] α(1,6)键的百分比可通过如以下实施例1部分8所述的Hakomori方法(1964HAKOMORI由二甲基亚砜中甲基亚磺酰基负碳离子催化糖脂类和多糖的快速完全甲基化)或通过如以下实施例1部分7所述的质子NMR来测量。

[0044] 根据一个方面,本发明涉及一种α-葡聚糖混合物、优选地支链麦芽糖糊精混合物,其特征在于该α-葡聚糖混合物具有:

[0045] -含量小于55%、优选地小于50%、甚至更优选地小于45%的可水解纤维,

[0046] -和/或至少20%的α(1,6)键,

[0047] 其中纤维含量对应于根据AOAC 2002.02方法的可水解(即,非抗性)部分,并且α(1,6)键的百分比表示通过Hakomori方法测量的相对于糖苷键的总数的α(1,6)键的摩尔百分比。

[0048] 优选地,可水解纤维的含量小于44%、优选地小于43%、甚至更优选地小于42%、41%、40%、39%、38%、37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、30%。

[0049] 优选地,可水解纤维的含量大于5%、优选地大于10%、11%、12%、13%、14%、15%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%。

[0050] 优选地,可水解纤维的含量介于5%与45%之间、优选地介于10%与45%之间、优选地介于20%与44%之间、甚至更优选地介于30%与45%之间。

[0051] 优选地,α(1,6)键的百分比为至少21%、优选地至少22%、甚至更优选地至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、至少31%、至少32%、至少33%、至少34%、至少35%。

[0052] 优选地,α(1,6)键的百分比为至多40%、优选地至多36%、至多35%、至多34%、至多33%、至多32%、至多31%。

[0053] 优选地,α(1,6)键的百分比介于20%与40%之间、优选地介于20%与35%之间、更优选地介于25%与35%之间。

[0054] 优选地,α(1,3)键的百分比为至少2%、优选地至少3%。

[0055] 优选地,α(1,3)键的百分比为至多6%、优选地至多5%。

[0056] 优选地,α(1,3)键的百分比介于2%与8%之间,优选地介于3%与5%之间。

[0057] 优选地,α(1,2)键的百分比为至少1%、优选地至少2%。

[0058] 优选地,α(1,2)键的百分比为至多8%、优选地至多6%、至多5%、至多4%或至多3%。

[0059] 优选地,α(1,4)键的百分比为至多80%、优选地至多70%、至多65%。

[0060] 优选地,α(1,4)键的百分比为至少50%、优选地至少55%、至少60%。

[0061] 优选地,α(1,4)键的百分比介于50%与80%之间、优选地介于55%与70%之间、更优选地介于55%与65%之间。

[0062] 优选地,α-葡聚糖混合物、优选地支链麦芽糖糊精混合物的特征在于该α-葡聚糖混合物具有:

[0063] -含量小于55%、优选地小于50%、甚至更优选地小于45%的可水解纤维,

[0064] -并且具有以下特征中的一个或多个特征:

[0065] -介于20％与40％之间的α(1,6)键,

[0066] -介于20％与40％之间的α(1,3)键,

[0067] -介于2％与8％之间的α(1,2)键,

[0068] -介于50％与80％之间的α(1,4)键,

[0069] 其中纤维含量对应于根据AOAC 2002.02方法的可水解(即,非抗性)部分,并且α(1,6)键、α(1,3)键、α(1,2)键或α(1,4)键的百分比表示通过Hakomori方法测量的相对于糖苷键的总数的所述类型键的摩尔百分比。

[0070] 优选地,α(1,6)键、α(1,3)键、α(1,2)键或α(1,4)键的所述含量使得它们的摩尔百分比之和等于100％。

[0071] 本发明还涉及根据上文所述的方法获得的α-葡聚糖混合物和具有上文所述的性质的α-葡聚糖混合物在制备用于人或动物营养的食品中的用途。

[0072] 通常,根据本发明的α-葡聚糖混合物可用于促进肠道健康、血糖管理、饱腹感和体重管理以及持续的能量释放。

[0073] 最后,在另一方面,本发明涉及能够裂解α(1,4)糖苷键并且能够产生α(1,6)糖苷键以便降低α-葡聚糖混合物的可消化性的葡聚糖转移酶的用途,所述葡聚糖转移酶具有序列SEQ ID No:1或与具有序列SEQ ID No:1的蛋白质具有至少90％同一性的蛋白质。

[0074] 在本发明的这方面,α-葡聚糖混合物优选地是富含低聚糖的糖浆,特别是如本发明第一方面所述的具有富含DP为4的低聚糖的糖浆。

[0075] 优选地,可消化性的降低为相对于起始底物根据AOAC 2002.02方法测量的可水解部分降低至少2倍、优选地至少2.5倍、甚至更优选地至少3倍。

[0076] 借助于以下实施例将更好地理解本发明,这些实施例旨在为例示性而且非限制性的。

[0077] 实施例1:由富含DP4的糖浆制备支链麦芽糖糊精:材料和方法

[0078] 1.DP4底物溶液的制备

[0079] 所用的起始底物是富含DP4的糖浆,具有如表1所述的特征:

[0080] [表1]

[0081]

标准	子标准	测量方法	单位	值
分子量	Mn(支链淀粉当量)	MCL1439	Da	615
分子量	Mw(支链淀粉当量)	MCL1439	Da	1045
碳水化合物分布	DP1	MCL190A	相对％	2.5
碳水化合物分布	DP2	MCL190A	相对％	6.1
碳水化合物分布	DP3	MCL190A	相对％	7.4
碳水化合物分布	DP4	MCL190E	相对％	55.7
碳水化合物分布	DP5	MCL190E	相对％	2.3
碳水化合物分布	DP6	MCL190E	相对％	2.1
碳水化合物分布	DP7	MCL190E	相对％	2.3
碳水化合物分布	DP8	MCL190E	相对％	5.5
碳水化合物分布	DP9	MCL190E	相对％	1.4
碳水化合物分布	DP10	MCL190E	相对％	1.3

碳水化合物分布	>DP10	MCL190E	相对%	13.4
还原糖	右旋糖当量(DE)	MCL050B		33.4
干材料	干燥后的质量损失	MCL209A	%	30.2

[0082] 在50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.75)中制备浓度为100g/L、200g/L或400g/L的各种底物溶液(富含DP4的糖浆)。

[0083] 2.重组酶的生产。

[0084] 重组生产下列酶;

[0085] -酶GT#11:由发酵乳杆菌(Lactobacillus fermentum)NC2970的α-4,3葡聚糖转移酶,其氨基酸序列具有在Genbank中以参考号AOR73699.1列出的序列(SEQ ID No:2)。

[0086] -酶GT#19:由粘膜乳杆菌(Lactobacillus mucosae)的糖苷水解酶GH70,其氨基酸序列具有在Genbank中以参考号WP_053069107.1列出的序列。(SEQ ID No:1)

[0087] 在含有1%甘油和1%乳糖的ZYM-5052培养基中培养含有质粒pET-21a-酶(编号:X)的大肠杆菌(E.coli)BL21 star细胞(为了产生各种酶,包括GT#11和GT#19)。在培养结束时,将细胞以6500g离心10分钟,将细胞沉淀物在D0600nm为80的条件下重悬于含有300mM NaCl和20mM咪唑的20mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中,并通过使用30%振幅、4个20秒循环的冷超声裂解细胞,随后静置4分钟。通过以10,000g离心30分钟从溶解的蛋白质中分离细胞碎片。

[0088] 3.纯化酶

[0089] 在载有二价钴离子(CO2+)的钴树脂(Invitrogen)上进行目标蛋白质的纯化,多组氨酸标签对二价钴离子具有亲和力。通过在多组氨酸标签和增加浓度的咪唑之间产生竞争来进行洗脱。简而言之,使10mL至35mL的大肠杆菌(E.coli)细胞提取物与1mL钴树脂接触1小时,该钴树脂预先用25mL含有300mM NaCl和20mM咪唑的20mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)平衡。在多孔玻璃上过滤树脂可除去所有未结合的蛋白质。然后用40mL含有300mM NaCl和20mM咪唑的20mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤树脂5次。最后,用3mL含有300mM NaCl和250mM咪唑的20mM磷酸盐缓冲液(pH7.4)洗脱5分钟,以便分离目标酶。然后将酶溶液用5L 50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.75)透析(10kDa分子量截留膜)(过夜,在4℃下搅拌)以便除去NaCl和咪唑。使用2000超微量分光光度计(Thermofisher)测量它们在280nm处的吸光度,从而测定各种蛋白质溶液。使用ExPASy生物信息学资源门户网站的ProtParam工具应用来测定分子消光系数ε。

[0090] 4.酶促反应

[0091] 用0.1mg/mL纯化酶进行反应,并在50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.75)中,在存在10%、20%或40%底物的情况下进行透析。将反应物在37℃下搅拌温育24小时。通过加热(95℃持续5分钟)终止反应。在初始时间和最终时间取样,以使用不同的分析技术(HPAEC-PAD、NMR)来分析酶的特异性。

[0092] 5.可消化性测试

[0093] 转移反应物在-80℃冷冻24小时后冷冻干燥。将25mg冷冻干燥产物置于1mL含有30U胰腺α-淀粉酶和3U淀粉葡糖苷酶(淀粉抗性试剂盒,Megazyme K-STAR 06/18,其实施AOAC 2002.02方法)的100mM马来酸钠缓冲液中。将反应物在37℃温育16小时。在HPAEC PAD分析之前将产物在水中稀释。

[0094] 6.色谱分析

[0095] 通过与脉冲安培检测器偶联的阴离子交换色谱法(HPAEC PAD-具有脉冲安培检测的高效阴离子交换色谱法)分析获得的产物。在装配有偶联CarboPac™Pa100保护预柱(2mm×50mm)的CarboPac™PA100分析柱(2mm×250mm)的Thermo ICS6000系统上进行分析。根据以下曲线以0.250ml.min-1的流速施加150mM钠中的乙酸钠梯度:0分钟-5分钟,0mM;5分钟-35分钟,0mM-300mM;35分钟-40分钟,300mM-450mM;40分钟-42分钟,450mM。使用金工作电极和pH Ag/AgCl参比池进行检测。在注射前将样品稀释至1g.L-1的总干质量。

[0096] 7.NMR。

[0097] 光谱^{1}H、^{13}C和HSQC在Bruker Avance 500MHz设备上,在298K用5mm Z梯度H-BB-D BBI探针进行记录。使用TopSpin 3软件获得并处理数据。

[0098] 8.Hakomori方法

[0099] Hakomori方法(1964HAKOMORI由二甲基亚砜中甲基亚磺酰基负碳离子催化糖脂类和多糖的快速完全甲基化)使得能够通过区分游离OH基团和键合基团来化学表征糖苷键。这是一种破坏性方法,该破坏性方法包括甲基化、水解、用$NaBD_4$还原、乙酰化和质谱分析的步骤。

[0100] 实施例2:由富含DP4的糖浆制备支链麦芽糖糊精:结果

[0101] 各种酶促反应的结果示于下表2中,其显示通过质子NMR或通过Hakomori方法测量的α-1,6键;α-1,3键和α-1,4键的百分比,以及在所获得的反应产物中的水解百分比(AOAC 2002.02)。

[0102] [表2]

[0103]

		NMR				HAKOMORI				
酶	浓度 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	%水解(AOAC 2002.02)
RM	100	0%	0%	99%	1%	2.3%	2.6%	93.1%	2.0%	78.0%
RM	200	0%	0%	99%	1%	2.3%	2.6%	93.1%	2.0%	80.0%
RM	400	0%	0%	99%	1%	2.3%	2.6%	93.1%	2.0%	83.0%
GT#11	100	0%	10%	90%	0%	2.9%	10.6%	82.3%	4.1%	48.7%
GT#11	200	0%	9%	91%	1%	2.7%	9.3%	84.4%	3.7%	52.9%
GT#11	400	0%	5%	92%	3%	2.3%	6.6%	88.5%	2.9%	62.8%
GT#19	100	0%	0%	57%	43%	2.1%	4.3%	62.6%	30.9%	31.6%
GT#19	200	0%	0%	59%	41%	2.2%	4.3%	63.0%	30.5%	34.8%
GT#19	400	0%	0%	65%	35%	2.3%	4.1%	63.8%	29.7%	40.0%

[0104] RM:原料,=DP4糖浆

[0105] 本发明人已经证明酶GT#19能够修饰富含DP4的糖浆以使其不易消化(根据方法AOAC2002.02的水解百分比小于或等于45%)。

[0106] 通过利用酶GT#19进行的这种酶促处理获得的产物含有比起始点显著更少的α-1,4键和更多的α-1,6键。α-1,2键和α-1,3键的数量保持不变。因此,酶GT#19是4,6-α-葡聚糖转移酶。

[0107] 相反地,利用另一种GT(酶GT#11)进行的处理导致α-1,4键的百分比降低和α-1,3键出现。通过利用酶GT#11进行处理获得的产物的可消化性也降低(与未处理底物的84%和88%相比,在100mg/mL和200mg/mL的初始浓度下分别为53%和55%)。

[0108] 有利的是,根据本发明的α-葡聚糖混合物还具有根据Englyst方法的目标体外可

消化性曲线。