



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0041953  
(43) 공개일자 2013년04월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12P 19/02* (2006.01) *C12P 19/12* (2006.01)  
*C12N 9/38* (2006.01) *C07H 3/06* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7004179
- (22) 출원일자(국제) 2011년07월19일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2013년02월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2011/062355
- (87) 국제공개번호 WO 2012/010597  
 국제공개일자 2012년01월26일
- (30) 우선권주장  
 10169981.7 2010년07월19일  
 유럽특허청(EPO)(EP)  
 61/365,560 2010년07월19일 미국(US)
- (71) 출원인  
 아틀라 푸즈 에이엠비에이  
 덴마크, 디케이-8260 비비 제이, 쉘데르훼즈 14
- (72) 발명자  
 베렐슨 한스  
 덴마크 DK-6920 비데백 Chr. 아가드스베 8  
 랑보그 웨제 피터  
 덴마크 DK-8200 오르후스 N 프리초프 난센스 베 25
- (74) 대리인  
 김진희, 김성기

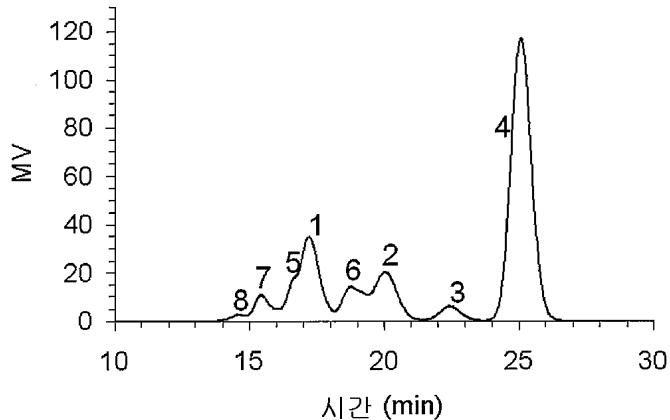
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 갈락토올리고당 함유 조성물 및 이것의 제조 방법

### (57) 요 약

본 발명은 갈락토올리고당 함유 조성물의 제조 방법 및 갈락토올리고당 함유 조성물 자체에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1b



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

1종 이상의 갈락토올리고당을 포함하는 조성물의 제조 방법으로서,

- a) - 이탈기에 결합된 갈락토실 기를 포함하고, 350 g/mol 이하의 몰중량을 갖는 갈락토실 도너, 및
    - 상기 갈락토실 도너와는 상이하고, 당류 또는 당알코올인 갈락토실 억셉터
 를 포함하는 혼합물을 제공하는 단계로서, 여기서, 갈락토실 억셉터와 갈락토실 도너 간의 몰비는 1:10 이상이고, 상기 혼합물은 0.05 mol/L 이상의 갈락토실 억셉터를 포함하는 것인 단계,
  - b) 베타-갈락토시다제 활성을 가지고 0.9 이하의 T 값을 갖는 효소를 제공하여, 상기 효소를 혼합물과 접촉시키는 단계,
  - c) 상기 효소가 갈락토실 도너의 이탈기를 유리시켜 갈락토실 도너의 갈락토실 기를 갈락토실 억셉터로 이동시키도록 함으로써 갈락토올리고당을 형성하고, 이로써 갈락토올리고당을 포함하는 조성물을 얻는 단계
- 를 포함하는 제조 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 갈락토실 도너의 이탈기가 글리코실 기인 제조 방법.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 효소가

- 서열 번호 2의 아미노산 서열에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는
  - 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1)~Ile(1174)에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는
  - 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1)~Gly(1752)에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는
  - 서열 번호 2의 아미노산 서열 Val(33)~Ile(1174)에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열
- 을 포함하는 것인 제조 방법.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 효소가 서열 번호 2의 아미노산 서열 Val(33)~Ile(1174)에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 제조 방법.

### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 효소가 서열 번호 2의 아미노산 서열 Val(33)~Ile(1174)에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 것인 제조 방법.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 효소가 서열 번호 2의 아미노산 서열 Val(33)~Ile(1174)을 갖는 것인 제조 방법.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c)가 추가의 갈락토실 도너를 첨가하는 것을 포함하는 것인 제조 방법.

### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c) 동안 혼합물의 갈락토실 도너의 농도를 0.01~1 mol/L의 범

위의 농도로 유지하는 것인 제조 방법.

### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

d) 단계 c)의 조성물의 갈락토올리고당을 부화(enrich)하는 단계  
를 더 포함하는 제조 방법.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 부화가 크로마토그래피 분리 및/또는 나노여과를 포함하는 것인 제조 방법.

### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 얻을 수 있는 갈락토올리고당 함유 조성물.

### 청구항 12

- 일반식 Gal-X를 갖는 제1 갈락토올리고당,
- 일반식 Gal<sub>2</sub>X를 갖는 제2 갈락토올리고당, 및
- 일반식 Gal<sub>3</sub>X를 갖는 제3 갈락토올리고당

을 포함하는 갈락토올리고당 함유 조성물로서, 여기서 X는 락토실 또는 글루코실이 아닌 글리코실 기이고,

- 갈락토올리고당 Gal-X, Gal<sub>2</sub>X 및 Gal<sub>3</sub>X의 총량, 및
- 갈락토올리고당 Gal-Glc, Gal<sub>2</sub>Glc, Gal<sub>3</sub>Glc의 총량

간의 몰비가 5:95 이상인 갈락토올리고당 함유 조성물.

### 청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 제1 갈락토올리고당, 제2 갈락토올리고당 및 제3 갈락토올리고당 간의 몰비가 50 ~ 99:1 ~ 45:0.5 ~ 25인 갈락토올리고당 함유 조성물.

### 청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 갈락토올리고당 함유 조성물의 총 중량에 대해 10 중량% 이상의 제1 갈락토올리고당, 제2 갈락토올리고당 및 제3 갈락토올리고당의 총량을 포함하는 것인 갈락토올리고당 함유 조성물.

### 청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 갈락토올리고당 함유 조성물을 포함하는 식품.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 갈락토올리고당(galacto-oligosaccharide) 함유 조성물 및 이것의 효율적 제조 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 모유(human breast milk)는 모유 수유 아기에게 몇 가지 유익한 건강 효과를 부여하는 것으로 생각되는 다수의 다양한 올리고당을 함유하는 것으로 알려져 있다(Kunz et al. (2000)). 예를 들어, FOS, GOS 또는 이눌린(inulin)과 같은 몇 종의 올리고당은 이른바 프리바이오틱스(prebiotics)로서, 이것은 이들이 위장관계의 유익균을 촉진하고 유해균을 억제한다는 것을 의미한다. 올리고당은, 그 건강 증진 효과로 인하여, 영아용 조제분유(infant formula) 및 임상 영양식(clinical nutrition)과 같은 기능성 식품에 흔히 사용된다.

[0003] 올리고당의 제조 방법에는 몇 가지 접근법이 있다. 한 가지 접근법은 천연 공급원으로부터 올리고당을 단리하는 것에 기초한다. 프럭토스올리고당(FOS) 및 이눌린은 예를 들어 자연에서는 예루살렘 아티초크(돼지감자)(Jerusalem artichoke), 우엉, 치커리, 럭(Leek), 양파 및 아스파라거스에서 발견되며, 이러한 농작물로부터 단리될 수 있다. 치커리 뿌리로부터의 이눌린의 생산은, 예를 들어 Frank의 문헌(2002)에 기재되어 있다. 올리고당의 제조를 위한 이러한 접근법은 적합한 농작물의 입수 가능성에 의해 제한을 받으며, 더 복잡한 올리고당에 대해서는 실시가 불가능할 수 있다.

[0004] 또 다른 접근법은 효소가 올리고당의 합성을 촉진하는 효소적 합성법에 기초하는 것이다. Yun의 문헌(1996)은 프럭토실트랜스파라제 활성을 갖는 효소를 사용하고 효소를 위한 기질로서 수크로스를 사용하는 프럭토올리고당(fructo-oligosaccharide)의 효소적 제조에 관해 기재한다. 효소적 합성의 또 다른 예는 WO 01/90,317 A2에 기재되어 있으며, 이 특허문헌은 특수한 베타-갈락토시다제 효소와 기질로서 락토스를 사용하여 식 Gal-Gal-Glc의 갈락토올리고당(GOS)을 제조하는 방법을 개시한다.

### 발명의 내용

[0005] 본 발명의 목적은 개선된 갈락토올리고당 제조 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 개선된 갈락토올리고당 함유 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명자들은 놀랍게도 베타-갈락토시다제 활성을 가지고, 바람직하게는 0.9 이하의 T 값을 갖는 효소가 특별한 유형의 갈락토올리고당의 매우 효과적인 합성에 사용될 수 있다는 것을 발견하였는데, 여기서 갈락토실 억셉터(galactosyl acceptor)는 갈락토실 도너(galactosyl donor)와 상이하다.

[0007] 따라서, 본 발명의 일 양태는 1종 이상의 갈락토올리고당을 포함하는 조성물의 제조 방법으로서,

[0008] a) - 이탈기에 결합된 갈락토실 기를 포함하는 갈락토실 도너, 및

[0009] - 상기 갈락토실 도너와는 상이한 갈락토실 억셉터

[0010] 를 포함하는 혼합물을 제공하는 단계로서, 여기서, 갈락토실 억셉터와 갈락토실 도너 간의 몰비는 1:10 이상이고, 상기 혼합물은 0.05 mol/L 이상의 갈락토실 억셉터를 포함하는 것인 단계,

[0011] b) 베타-갈락토시다제 활성을 갖는 효소를 제공하여, 상기 효소를 상기 혼합물과 접촉시키는 단계,

[0012] c) 상기 효소가 갈락토실 도너의 이탈기를 유리시켜 갈락토실 도너의 갈락토실 기를 갈락토실 억셉터로 이동시키도록 함으로써 갈락토올리고당을 형성하고, 이로써 1종 이상의 갈락토올리고당을 포함하는 조성물을 얻는 단계

[0013] 를 포함하는 제조 방법에 관한 것이다.

[0014] 본 발명은 복합 갈락토올리고당 조성물을 높은 수율로 제조하기 위한 저비용의 효율적인 방법을 개시한다. 본 발명은 또한 바람직하지 않은 부산물을 초래하여 조성물로부터 제거하는 데 많은 비용이 드는 갈락토실 도너의 자체 갈락토실화(self-galactosylation) 정도를 감소시키는 것으로 생각된다.

[0015] 바람직하게는, 상기 효소는 베타-갈락토시다제 활성 이외에도 트랜스갈락토실화(transgalactosylation) 활성을 갖는다. 또한, 효소는 0.9 이하의 T 값을 갖는 것이 바람직할 수 있다.

[0016] 본 발명의 내용에 있어서, 용어 베타-갈락토시다제 효소의 "트랜스갈락토실화 활성"은 도너 분자, 예를 들어 락토스 분자로부터 갈락토실 기를 물이 아닌 분자, 예를 들어 다른 락토스 분자로 이동시킬 수 있는 효소의 능력을 의미한다.

[0017] T 값은 갈락토실 도너와 갈락토실 억셉터 둘 다로서 락토스를 사용하는 베타-갈락토시다제 효소의 트랜스갈락토실화 효율의 척도이다. 베타-갈락토시다제 효소의 T 값의 측정은 실시예 2에 기재된 어세이(assay)와 식에 따라 수행된다. T 값은 하기 식을 이용하여 계산한다:

$$T \text{ 값} = \frac{\text{생성된 갈락토스의 양 (mol)}}{\text{사용된 락토스의 양 (mol)}}$$

[0018] 트랜스갈락토실화 활성을 갖지 않는 락타제 효소는 사용되는 락토스 1 몰당 1 몰의 갈락토스를 생성하여, 1의 T 값을 갖는다. 매우 높은 트랜스갈락토실화 활성을 갖는 베타-갈락토시다제는 갈락토스를 생성하는 대신 락토스

로부터의 거의 모든 갈락토실화 기를 트랜스갈락토실화에 사용하며, 따라서 거의 0의 T 값을 갖는다.

[0020] 본 발명의 또 다른 양태는, 본원에 기재된 방법에 의해 얻을 수 있는, 1종 이상의 갈락토올리고당을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명의 다른 목적과 이점에 대해서는 이하에 기재한다.

### 도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a는 효소와 함께 인큐베이션하기 전의 실시예 3에 기재된 혼합물(락토스 및 L-푸코스를 포함함)의 HPLC 크로마토그램을 보여준다.

도 1b는 효소와 함께 인큐베이션한 후의 실시예 3의 혼합물의 HPLC 크로마토그램을 보여주며, 여기에 L-푸코스 함유 갈락토올리고당의 피크(피크 6, 7 및 8)가 분명하게 존재한다.

도 2는 효소 반응 중의 실시예 3의 혼합물의 락토스, 글루코스 및 갈락토스의 농도(임의 단위)의 플롯을 포함한다.

도 3은 효소 반응 중의 실시예 3의 혼합물의 올리고당 Gal-Fuc, Gal-Gal-Fuc/Gal-Gal-Glc, 및 Gal-Gal-Gal-Fuc/Gal-Gal-Gal-Glc의 농도(임의 단위)의 플롯을 포함한다.

도 4는 효소 반응 중의 실시예 4의 혼합물의 올리고당 Gal-Fuc, Gal-Gal-Fuc/Gal-Gal-Glc, 및 Gal-Gal-Gal-Fuc/Gal-Gal-Gal-Glc의 농도(임의 단위)의 플롯을 포함한다.

도 5는 효소 반응 중의 실시예 5의 올리고당 Gal-GalNAc, Gal-Gal-GalNAc/Gal-Gal-Glc, 및 Gal-Gal-Gal-GalNAc/Gal-Gal-Gal-Glc의 농도(임의 단위)의 플롯을 포함한다.

도 6은 효소 반응 중의 실시예 6의 혼합물의 올리고당 Gal-Xyl, Gal-Gal-Xyl/Gal-Gal-Glc, 및 Gal-Gal-Gal-Xyl/Gal-Gal-Gal-Glc의 농도(임의 단위)의 플롯을 포함한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 상기에 언급한 바와 같이, 본 발명의 양태들은 1종 이상의 갈락토올리고당을 포함하는 조성물의 제조 방법으로서,

[0024] a) - 이탈기에 결합된 갈락토실 기를 포함하는 갈락토실 도너, 및

[0025] - 상기 갈락토실 도너와는 상이한 갈락토실 억셉터

[0026] 를 포함하는 혼합물을 제공하는 단계로서, 여기서, 갈락토실 억셉터와 갈락토실 도너 간의 몰비는 1:10 이상이고, 상기 혼합물은 0.05 mol/L 이상의 갈락토실 억셉터를 포함하는 것인 단계,

[0027] b) 베타-갈락토시다제 활성, 바람직하게는 0.9 이하의 T 값을 갖는 효소를 제공하여, 상기 효소를 상기 혼합물과 접촉시키는 단계,

[0028] c) 상기 효소가 갈락토실 도너로부터 이탈기를 유리시켜 갈락토실 도너의 갈락토실 기를 갈락토실 억셉터로 이동시킴으로써 갈락토올리고당을 형성하고, 이로써 1종 이상의 갈락토올리고당을 포함하는 조성물을 얻는 단계

[0029] 를 포함하는 제조 방법에 관한 것이다.

[0030] 본 발명의 내용에 있어서, 용어 "글리코실 기"는 단당, 또는 이당 또는 삼당과 같은 저급 올리고당, 또는 상용하는 당알코올로부터 1개 또는 2개의 하이드록실 기를 제거함으로써 얻어지는 기를 의미한다. 본원에서 이 용어는 갈락토실 도너, 갈락토실 억셉터 및 올리고당의 다양한 빌딩블록을 지칭하기 위해 사용된다.

[0031] 가장 흔한 당류 및 이들의 상응하는 글리코실 기의 약어를 하기 표에 기재하였다.

당류	약어	글리코실 기의 명칭
글루코스	Glc	글루코실
갈락토스	Gal	갈락토실
푸코스	Fuc	푸코실
만노스	Man	만노실
크실로스	Xyl	크실로실
N-아세틸글루코사민	GalNAc	N-아세틸갈락토사미닐
락토스	Lac	락토실

[0032]

[0033] 본 발명의 내용에 있어서, 용어 "올리고당(oligosaccharide)"은 상이한 또는 동일한 유형일 수 있는 2개 이상의 글리코실 기, 바람직하게는 3개 이상의 글리코실 기를 포함하는 분자를 의미한다. 2개 이상의 글리코실 기는 바람직하게는 0-글리코실 결합에 의해 결합된다. 올리고당은 글리코실 기의 직쇄일 수 있거나 분지형 구조를 가질 수 있다. 올리고당은, 예를 들어 화학량론식, 예를 들어  $(Gal)_3Glc$ 로서 또는 일반식, 예를 들어 Gal-Gal-Gal-Glc, Gal-Gal-Glc-Gal, 또는 Gal-(Gal-)Glc-Gal로서 나타낼 수 있다. 화학량론식은 올리고당 또는 올리고당의 기가 포함하는 글리코실 기에 대한 정보를 제공하지만, 이들의 상대적 위치에 대한 정보는 제공하지 않는 반면, 일반식은 글리코실 기의 상대적 위치에 대한 일반적 정보도 포함한다.

[0034]

본 발명의 내용에 있어서, 용어 "호모올리고당(homo-oligosaccharide)"은 단 1가지 유형의 글리코실 기를 포함하는 올리고당을 의미한다. 호모올리고당의 예로는 Gal-Gal-Gal-Gal 및 Glc-Glc-Glc이 있다.

[0035]

본 발명의 내용에 있어서, 용어 "헤테로올리고당(hetero-oligosaccharide)"은 상이한 글리코실 기를 포함하는 올리고당, 예를 들어 Gal-Gal-Glc 또는 Gal-Gal-Fuc를 의미한다.

[0036]

본 발명의 내용에 있어서, 용어 "올리고당"과 함께 사용되는 접두사 "갈락토"는 올리고당이 반복 단위로서 갈락토실 기를 포함한다는 것을 나타낸다. 접두사 "호모" 또는 "헤테로"는 접두사 "갈락토"와 함께 사용될 수 있다. Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Gal-Gal 둘 다 갈락토올리고당이다. Gal-Gal-Glc는 헤테로갈락토올리고당이고, Gal-Gal-Gal-Gal은 호모갈락토올리고당이다.

[0037]

본 발명의 내용에 있어서, "X"는 본원에 정의된 갈락토실 억셉터를 나타낸다. -X"는 갈락토실 억셉터에 상응하는 글리코실 기, 특히 다른 기에 결합된 글리코실 기를 나타낸다. "--"는 결합을 기호로 나타낸 것이다. 글리코실 기는 바람직하게는 글리코실 기의 3번, 4번, 5번 또는 6번 위치를 통해 결합되며, 바람직하게는 0-글리코실 결합을 통해 결합된다. 본 발명의 내용에 있어서, "Gal--"은 다른 기에 결합된 갈락토실 기, 바람직하게는 갈락토실 기의 1번 위치를 통해, 바람직하게는 0-글리코실 결합을 통해 결합된 갈락토실 기를 나타낸다.

[0038]

본 발명의 내용에 있어서, "-Gal--"은 2개의 다른 기에 결합된 갈락토실 기를 나타낸다. 왼쪽 결합은 바람직하게는 갈락토실 기의 4번 또는 6번 위치에, 바람직하게는 0-글리코실 결합을 통해 이루어진다. 오른쪽 결합은 갈락토실 기의 1번 위치에, 바람직하게는 0-글리코실 결합을 통해 이루어진다.

[0039]

2개의 갈락토실 기 간의 결합은 전형적으로 1-4 또는 1-6 결합이며, 일반적으로 0-글리코실 결합이다. 갈락토실 기와 질소 함유 억셉터 간의 결합은 N-글리코실 결합일 수도 있다.

[0040]

본 발명의 내용에 있어서, 용어 "방법" 및 "공정"은 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0041]

단계 a)는 제조하고자 하는 올리고당이 포함된 혼합물을 제공하는 것을 포함한다.

[0042]

혼합물은 바람직하게는 액체 혼합물이며, 예를 들어 갈락토실 억셉터 및 갈락토실 도너를 포함하는 수용액일 수 있다.

[0043]

본 발명의 몇몇 실시형태에서, 단계 a)의 혼합물의 갈락토실 억셉터와 갈락토실 도너 간의 몰비는 1:5 이상, 바람직하게는 1:1 이상, 더욱 더 바람직하게는 5:1 이상이다. 예를 들어, 단계 a)의 혼합물의 갈락토실 억셉터와 갈락토실 도너 간의 몰비는 10:1 이상, 예컨대 15:1 이상일 수 있다.

[0044]

단계 a)의 혼합물의 갈락토실 억셉터와 갈락토실 도너 간의 몰비는 예를 들어 1:10 ~ 100:1의 범위일 수 있다.

- [0045] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 단계 a)의 혼합물의 갈락토실 억셉터와 갈락토실 도너 간의 몰비는 1:10 ~ 50:1의 범위, 바람직하게는 1:5 ~ 30:1의 범위, 더욱 더 바람직하게는 1:1 ~ 20:1의 범위이다. 예를 들어, 단계 a)의 혼합물의 갈락토실 억셉터와 갈락토실 도너 간의 몰비는 예를 들어 2:1 ~ 40:1의 범위, 바람직하게는 4:1 ~ 30:1의 범위, 더욱 더 바람직하게는 10:1 ~ 25:1의 범위일 수 있다.
- [0046] 전술한 바와 같이, 갈락토실 도너는 이탈기에 공유 결합된 갈락토실 기를 포함한다. 갈락토실 기는 바람직하게는  $\beta$ -D-갈락토파라노실 기이다. 또한, 갈락토실 기는 바람직하게는 갈락토실 기의 1번 위치로부터 0-글리코실 결합을 통해 이탈기에 결합된다.
- [0047] 갈락토실 도너의 이탈기는 예를 들어 글리코실 기 및/또는 당알코올 기이다. 이탈기가 단당 또는 이당 또는 상응하는 당알코올의 글리코실 기인 경우, 갈락토실 기는 바람직하게는 갈락토실 기의 1번 위치로부터 0-글리코실 결합을 통해 이탈기에 결합되며, 이 결합은 단당형 이탈기의 4번 위치 또는 이당형 이탈기의 4'번 위치에 부착된다.
- [0048] 본 발명의 내용에 있어서, 어구 "Y 및/또는 X"는 "Y" 또는 "X" 또는 "Y 및 X"를 의미한다. 동일한 논리로, 어구 " $X_1, X_2, \dots, X_{i-1}$ , 및/또는  $X_i$ "는 " $X_1$ " 또는 " $X_2$ " 또는... 또는 " $X_{i-1}$ " 또는 " $X_i$ " 또는 이를 성분들의 임의의 조합:  $X_1, X_2, \dots, X_{i-1}$ , 및  $X_i$ 를 의미한다.
- [0049] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 갈락토실 도너는 1,000 g/mol 이하의 몰중량을 갖는다. 예를 들어, 갈락토실 도너는 500 g/mol 이하의 몰중량을 가질 수 있다. 갈락토실 도너가 350 g/mol 이하의 몰중량을 갖는 것이 더 바람직할 수 있다.
- [0050] 이당은 현재로서 갈락토실 도너로서 바람직한 유형이다. 대안으로 또는 부가적으로, 삼당이 갈락토실 도너로서 사용될 수도 있다. 따라서, 혼합물이 상이한 갈락토실 도너의 조합을 포함하는 것도 고려해 볼 수 있다.
- [0051] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 갈락토실 도너는 락토스이다. 유용한 갈락토실 도너의 다른 예로는 락툴로스(lactulose)가 있다. 유용한 갈락토실 도너의 다른 예는 락티톨(lactitol)이다.
- [0052] 본 발명의 내용에 있어서, 용어 "락토스"는 이당  $\beta$ -D-갈락토파라노실-(1→4)-D-글루코스를 의미하며, 이것은 유당(milk sugar)으로 칭해지기도 하고, 우유의 가장 주된 당류이다.
- [0053] 갈락토실 도너는 공업적으로 정제된 공급원(예컨대 정제 락토스) 및/또는 천연 공급원(예컨대 유청막 투과액, 즉 유청의 한외여과에 의해 제조된 체단백 유청) 둘 다로부터 유용한 갈락토실 도너 공급원을 통해 제공될 수 있다.
- [0054] 갈락토실 억셉터는 효소로부터 갈락토실 기를 억셉트할 수 있는 임의의 분자일 수 있으며, 전형적으로 하이드록실 기, 바람직하게는 알코올 하이드록실 기를 포함한다. 용어 "억셉트하는"은 도너의 갈락토실 기가 억셉터에, 예를 들어 0-글리코실 결합을 통해 공유 결합되어야 함을 의미한다.
- [0055] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 갈락토실 억셉터는 하나 이상의 알코올 하이드록실 기를 포함한다. 예를 들어, 갈락토실 억셉터는 폴리올일 수 있다.
- [0056] 본 발명의 내용에 있어서, 용어 "폴리올"은 2개 이상의 알코올 하이드록실 기를 포함하는 분자를 의미한다.
- [0057] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 갈락토실 억셉터는 락토스가 아니다. 또한, 갈락토실 억셉터가 글루코스가 아닌 것이 바람직할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 갈락토실 억셉터는 갈락토실 도너와 상이하다. 락토스와 같은 비교적 저렴한 갈락토실 도너를 갈락토실 공급원으로서 사용하고 푸코스와 같은 생물학적으로 유용한 억셉터를 갈락토실 억셉터로서 사용하는 것이 특히 바람직하다.
- [0059] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 갈락토실 억셉터는 락토스, 갈락토스, 또는 글루코스가 아니다.
- [0060] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 갈락토실 억셉터는 글루코스 또는 일반식  $\text{Gal}-(\text{Gal})_i-\text{Glc}$ (여기서,  $i$ 는 음이 아닌 정수, 즉, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 또는 4임)의 올리고당이 아니다.
- [0061] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 갈락토실 억셉터는 갈락토스 또는 일반식  $\text{Gal}-(\text{Gal})_i-\text{Gal}$ (여기서,  $i$ 는 음이 아닌 정수임)의 올리고당이 아니다.

- [0062] 다양한 몰중량을 갖는 갈락토실 억셉터가 사용될 수 있으나, 100 g/mol 이상의 몰중량을 갖는 갈락토실 억셉터가 본 발명에서 바람직하다.
- [0063] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 갈락토실 억셉터는 1,000 g/mol 이하의 몰중량을 갖는다. 예를 들어, 갈락토실 억셉터는 500 g/mol 이하의 몰중량을 가질 수 있다. 갈락토실 억셉터가 350 g/mol 이하의 몰중량을 갖는 것이 더 바람직할 수 있다. 갈락토실 억셉터는, 예를 들어 200 g/mol 이하의 몰중량을 가질 수 있다.
- [0064] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 갈락토실 억셉터는 당류이다. 갈락토실 억셉터는, 예를 들어 단당일 수 있다. 대안으로, 갈락토실 억셉터는 이당일 수 있다.
- [0065] 예를 들어, 갈락토실 억셉터는 5탄당일 수 있다. 갈락토실 억셉터는 예를 들어 아라비노스일 수 있다. 유용한 5탄당의 예는 크실로스이다. 유용한 5탄당의 또 다른 예는 리보스이다. 갈락토실 억셉터는, 예를 들어 아라비노스, 크실로스 및 리보스로 이루어진 군으로부터 선택되는 5탄당일 수 있다.
- [0066] 유용한 갈락토실 억셉터의 다른 군은 6탄당이다. 갈락토실 억셉터는 예를 들어 만노스일 수 있다. 6탄당은 갈락토스이다. 유용한 6탄당의 다른 예는 타가토스이다. 유용한 6탄당의 다른 예는 프력토스이다. 갈락토실 억셉터는, 예를 들어 만노스, 갈락토스, 타가토스 및 프력토스로 이루어진 군으로부터 선택되는 6탄당일 수 있다.
- [0067] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 갈락토실 억셉터는 테옥시-6탄당이다. 갈락토실 억셉터는 예를 들어 D-푸코스, L-푸코스, 또는 이들의 혼합물과 같은 푸코스일 수 있다.
- [0068] 대안으로, 갈락토실 억셉터는 이당 또는 삼당과 같은 올리고당일 수 있다. 유용한 이당의 예는 말토스이다. 유용한 이당의 예는 락툴로스이다.
- [0069] 갈락토실 억셉터의 다른 유용한 군은 당류 유도체이다.
- [0070] 본 발명의 내용에 있어서, 용어 "당류 유도체"는 하나 이상의 비하이드록실 기를 포함하는 당류를 의미한다. 그러한 작용기의 예로는 카복실 기, 아미노 기, N-아세틸아미노 기 및/또는 티올 기가 있다. 1번 위치에 알데히드 기 또는 2번 위치에 케톤 기를 포함하는 당류는 그 당류가 상기에 언급한 비하이드록실 기 중 일부를 포함하지 않는다면 당류 유도체로 간주되지 않는다.
- [0071] 유용한 사카라이드 유도체의 예는 N-아세틸 갈락토사민이다. 유용한 사카라이드 유도체의 다른 예는 시알산이다. 유용한 사카라이드 유도체의 또 다른 예는 시알릴 락토스이다. 따라서, 갈락토실 억셉터는 N-아세틸 갈락토사민, 시알산 및 시알릴 락토스로 이루어진 군으로부터 선택되는 당류 유도체일 수 있다.
- [0072] 유용한 갈락토실 억셉터의 다른 군은 당알코올이다. 따라서, 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 갈락토실 억셉터는 당알코올이다. 유용한 당알코올의 예는 솔비톨, 크실리톨, 락티톨 및/또는 말티톨이다.
- [0073] 본 발명자들은, 상기에 언급된 갈락토실 억셉터와는 대조적으로, N-아세틸 글루코사민 및 글루코스가 덜 효율적인 갈락토실 억셉터라는 것을 발견하였다. 따라서, 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 갈락토실 억셉터는 글루코스 또는 N-아세틸 글루코사민이 아니다.
- [0074] 상기 혼합물은 제1 유형의 갈락토실 억셉터와는 상이한 1종 이상의 추가의 갈락토실 억셉터를 포함할 수 있다. 상기 혼합물의 상이한 유형들의 갈락토실 억셉터는, 예를 들어 본원에서 언급된 갈락토실 억셉터 유형들 중에서 선택될 수 있다. 일반적으로, 가장 주된 종은 GalX, Gal<sub>2</sub>X 및 Gal<sub>3</sub>X이다.
- [0075] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 제조된 갈락토실화 억셉터는 새로운 유형의 갈락토실 억셉터로서 작용하고 역시 갈락토실화될 수 있다. 이렇게 하여, 화학량론식 Gal<sub>i+1</sub>X(여기서, i는 음이 아닌 정수임)를 갖는 갈락토올리고당이 제조될 수 있다. 일반적으로, 가장 주된 종은 Gal-X, Gal-Gal-X, 및 Gal-Gal-Gal-X이다.
- [0076] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에서, 제조된 갈락토실화 억셉터는 새로운 유형의 갈락토실 억셉터로서 작용하고 역시 갈락토실화될 수 있다. 이렇게 하여, 일반식 Gal-(Gal)<sub>i</sub>-X(여기서, i는 음이 아닌 정수임)를 갖는 갈락토올리고당이 제조될 수 있다. 일반적으로, 가장 주된 종은 Gal-X, Gal-Gal-X, 및 Gal-Gal-Gal-X이다.
- [0077] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 단계 a)의 혼합물은 0.7 mol/L 이하, 바람직하게는 0.4 mol/L 이하, 더욱 더 바람직하게는 0.2 mol/L 이하의 농도로 갈락토실 도너를 포함한다. 혼합물은 예를 들어 0.001~0.7 mol/L의 범위, 바람직하게는 0.01~0.5 mol/L의 범위, 더욱 더 바람직하게는 0.02~0.2 mol/L의 범위의 농도로 갈락토실 도너를 포함할 수 있다.

- [0078] 대안으로, 단계 a)의 혼합물은 0.3 mol/L 이하, 바람직하게는 0.1 mol/L 이하, 더욱 더 바람직하게는 0.05 mol/L 이하의 범위의 농도로 갈락토실 도너를 포함할 수 있다. 혼합물은 예를 들어 0.001~0.2 mol/L의 범위, 바람직하게는 0.005~0.1 mol/L의 범위, 더욱 더 바람직하게는 0.01~0.05 mol/L의 범위의 농도로 갈락토실 도너를 포함할 수 있다.
- [0079] 갈락토실화 갈락토실 억셉터 및 갈락토실화 갈락토실 도너는 제한된 정도로 갈락토실 도너로서 작용할 수 있으나, 갈락토실화 갈락토실 억셉터 및 갈락토실화 갈락토실 도너는 본 발명의 내용에 있어서 갈락토실 도너로 간주되지 않으며, 본원에 언급된 갈락토실 도너의 농도 또는 비에 기여하지 않는다는 것에 유념해야 한다.
- [0080] 갈락토실 억셉터는 다양한 농도 범위로 사용될 수 있다. 그러나, 혼합물을 갈락토실 억셉터로 포화시키는 것은 피하는 것이 바람직한데, 그 이유는 과잉 갈락토실 억셉터는 일반적으로 본 발명의 갈락토올리고당 함유 조성물로부터 제거되어야 하기 때문이다.
- [0081] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 단계 a)의 혼합물은 0.05 mol/L 이상, 바람직하게는 0.10 mol/L 이상, 더욱 더 바람직하게는 0.30 mol/L 이상의 양으로 갈락토실 억셉터를 포함한다. 더 높은 농도의 갈락토실 억셉터도 바람직할 수 있으며, 따라서, 단계 a)의 혼합물은 예를 들어 0.5 mol/L 이상, 바람직하게는 0.7 mol/L 이상, 더욱 더 바람직하게는 1 mol/L 이상의 양으로 갈락토실 억셉터를 포함할 수 있다.
- [0082] 혼합물은 예를 들어 0.05 mol/L~5 mol/L의 범위, 바람직하게는 0.1 mol/L~2 mol/L의 범위, 더욱 더 바람직하게는 0.3 mol/L~1 mol/L의 범위의 농도로 갈락토실 억셉터를 포함할 수 있다.
- [0083] 그러나, 몇몇 실시형태에서, 비교적 낮은 농도의 갈락토실 억셉터가 바람직하며, 이 경우 혼합물은 예를 들어 2 mol/L 이하, 바람직하게는 0.5 mol/L 이하, 더욱 더 바람직하게는 0.2 mol/L 이하의 농도로 갈락토실 억셉터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 혼합물은 0.05 mol/L~2 mol/L의 범위, 바람직하게는 0.06 mol/L~1 mol/L의 범위, 더욱 더 바람직하게는 0.08 mol/L~0.8 mol/L의 범위의 농도로 갈락토실 억셉터를 포함할 수 있다.
- [0084] 갈락토실 억셉터 및 갈락토실 도너 이외에도, 혼합물은 효소 반응을 위한 조건을 최적화하기 위한 다양한 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0085] 상기 혼합물은 예를 들어 혼합물의 pH를 효소의 pH 최적 조건으로 조절하기 위해 1종 이상의 pH 완충제를 포함할 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 혼합물은 1종 이상의 금속 이온을 포함하는 수용성 염을 포함할 수 있다. 특정 효소에 따라, 예를 들어  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  또는  $\text{Mg}^{2+}$ 와 같은 금속 이온이 사용될 수 있다. 그러나, 일부 효소는 혼합물 중의 금속 이온의 존재에 민감하지 않다는 점을 언급해 둔다.
- [0086] 올리고당을 합성하기 위한 통상적인 방법은 종종 수분 활성도 저하제, 예컨대 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 이용한다. 본 발명은 유익하게 그러한 수분 활성도 저하제를 사용하지 않고도 갈락토올리고당의 효율적 합성을 수행할 수 있게 한다. 따라서, 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 혼합물은 혼합물의 중량에 대해 5 중량% 이하, 바람직하게는 1 중량% 이하, 더욱 더 바람직하게는 0.1 중량%의 양으로 수분 활성도 저하제를 포함한다. 예를 들어, 혼합물은 혼합물의 중량에 대해 0.05 중량% 이하의 양으로 수분 활성도 저하제를 포함한다.
- [0087] 단계 a)의 혼합물 또는 이 혼합물을 형성하는 성분들은 반응 중의 미생물 생육을 방지하기 위해 효소를 사용한 반응 전에 열처리할 수 있다. 통상적인 열처리 공정, 예컨대 파스테르 살균법(예를 들어, 72°C에서 15초 동안), 고온 파스테르 살균법(hight pasteurisation)(예를 들어, 90°C에서 15초 동안), 또는 UHT 처리(예를 들어, 140°C에서 4초 동안)가 이용될 수 있다. 온도 불안정(temperature labile) 효소를 열처리할 때에는 주의를 기울여야 한다.
- [0088] 단계 b)는 바람직하게는 베타-갈락토시다제 활성을 가지고 바람직하게는 0.9 이하의 T 값을 갖는 효소를 제공하는 것을 포함한다. 이 방법은 추가적인 효소, 예를 들어 베타-갈락토시다제 활성 또는 트랜스갈락토실화 활성과는 다른 효소 활성을 갖는 효소를 사용하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0089] 본 발명의 내용에 있어서, 용어 "베타-갈락토시다제 활성"은 락토스와 같은  $\beta$ -D-갈락토시드의 말단 비환원  $\beta$ -D-갈락토스 잔기의 가수분해의 효소적 촉매작용을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 효소는 바람직하게는 클래스 EC 3.2.1.23에 속한다.
- [0090] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 효소의 T 값은 0.8 이하, 바람직하게는 0.7 이하, 더욱 더 바람직하게는 0.6 이하이다. 예를 들어, 효소의 T 값은 0.5 이하일 수 있다. 바람직하게는, 효소의 T 값은 0.4 이하일 수 있다. 효

소의 T 값이 0.3 이하인 것이 더 바람직할 수 있다.

[0091] 0.2 이하와 같이 더 작은 T 값이 바람직할 수 있다.

[0092] 유용한 효소는 예를 들어 서열 번호 1의 DNA 서열에 의해 코딩되는 웨티드로부터 유래될 수 있다. 유용한 효소의 기원이 될 수 있는 웨티드의 예로는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 웨티드가 있다.

[0093] 서열 번호 1 및 서열 번호 2는 PCT 출원 WO 01/90,317 A2에서 확인할 수 있으며, 이들 서열은 서열 번호 및 서열 번호 2로서 언급되어 있다. 또한, 추가의 유용한 효소를 WO 01/90,317 A2에서 확인할 수도 있다.

[0094] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 효소는 서열 번호 2의 웨티드 서열에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 효소는 서열 번호 2의 웨티드에 대해 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 더욱 더 바람직하게는 97.5% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, 효소는 서열 번호 2의 웨티드에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0095] 본 발명의 내용에 있어서, 용어 "서열 동일성"은 동일한 길이의 2개의 아미노산 서열 또는 동일한 길이의 2개의 핵산 서열 간의 동일성 정도의 정량적 척도를 의미한다. 비교하고자 하는 2개의 서열이 길이가 동일하지 않다면, 이들을 최적 가능 피트(best possible fit)에 정렬해야 한다. 서열 동일성은 다음과 같이 계산될 수 있다.

$$(N_{ref} - N_{dif}) \times 100 / (N_{ref})$$

[0097] 여기서,  $N_{dif}$ 는 두 서열이 정렬될 때 두 서열 내의 동일하지 않은 잔기의 총수이고,  $N_{ref}$ 는 서열들 중 하나의 잔기의 수이다. 따라서, DNA 서열 AGTCAGTC는 서열 AATCAATC와 75%의 서열 동일성을 갖는다( $N_{dif}=2$  및  $N_{ref}=8$ ). 갑은 특정 잔기(들)의 비동일성으로서 카운팅되며, 즉, DNA 서열 AGTGTC는 DNA 서열 AGTCAGTC와 75%의 서열 동일성을 갖는다( $N_{dif}=2$  및  $N_{ref}=8$ ). 서열 동일성은, 예를 들어 미국 국립 생명공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information: NCBI)에 의해 제공되는 적절한 BLAST-프로그램, 예컨대 BLASTp-알고리즘을 이용하여 계산할 수 있다.

[0098] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에서, 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 2의 웨티드 서열에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 예를 들어, 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 2의 웨티드에 대해 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 더욱 더 바람직하게는 97.5% 이상의 동일성을 갖는다. 몇몇 경우에, 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 2의 웨티드 서열에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0099] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Gly(1752)에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Gly(1752)에 대해 90% 이상, 바람직하게는 95%, 더욱 더 바람직하게는 97.5% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Gly(1752)에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0100] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에서, 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Gly(1752)에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 예를 들어, 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Gly(1752)에 대해 90% 이상, 바람직하게는 95%, 더욱 더 바람직하게는 97.5% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 경우에, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Gly(1752)에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 따라서, 효소는, 예를 들어 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Gly(1752)을 가질 수 있다.

[0101] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Ile(1174)에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Ile(1174)에 대해 90% 이상, 바람직하게는 95%, 더욱 더 바람직하게는 97.5% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Ile(1174)에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0102] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에서, 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Ile(1174)에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 예를 들어, 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Ile(1174)에 대해 90% 이상, 바람직하게는 95%, 더욱 더 바람직하게는 97.5% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 경우에, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Ile(1174)에 대해 99% 이상의

서열 동일성을 가질 수 있다. 따라서, 효소는, 예를 들어 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Ile(1174)을 가질 수 있다.

[0103] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Ile(1174)을 갖는다.

[0104] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Val(33) ~ Ile(1174)에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Val(33) ~ Ile(1174)에 대해 90% 이상, 바람직하게는 95%, 더욱 더 바람직하게는 97.5% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Val(33) ~ Ile(1174)에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0105] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에서, 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(1) ~ Ile(1174)에 대해 80% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 예를 들어, 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 2의 아미노산 서열 Val(33) ~ Ile(1174)에 대해 90% 이상, 바람직하게는 95%, 더욱 더 바람직하게는 97.5% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 경우에, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Val(33) ~ Ile(1174)에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 따라서, 효소는, 예를 들어 서열 번호 2의 아미노산 서열 Val(33) ~ Ile(1174)을 가질 수 있다.

[0106] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 효소는 서열 번호 2의 아미노산 서열 Met(33) ~ Ile(1174)을 갖는다.

[0107] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 효소는, 예를 들어 표 1에 기재된 아미노산 서열에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 효소는 예를 들어 표 1에 기재된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안으로, 효소의 아미노산 서열은 표 1에 기재된 아미노산 서열에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 효소는 예를 들어 표 1에 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다.

## 표 1

유용한 아미노산 서열 (AAS).

AAS No.	서열 번호 2 에서의 위치		AAS No.	서열 번호 2 에서의 위치		AAS No.	서열 번호 2 에서의 위치	
	시작	끝		시작	끝		시작	끝
1	25	1122	26	27	1122	51	30	1122
2	25	1132	27	27	1132	52	30	1132
3	25	1142	28	27	1142	53	30	1142
4	25	1152	29	27	1152	54	30	1152
5	25	1162	30	27	1162	55	30	1162
6	25	1167	31	27	1167	56	30	1167
7	25	1168	32	27	1168	57	30	1168
8	25	1169	33	27	1169	58	30	1169
9	25	1170	34	27	1170	59	30	1170
10	25	1171	35	27	1171	60	30	1171
11	25	1172	36	27	1172	61	30	1172
12	25	1173	37	27	1173	62	30	1173
13	25	1174	38	27	1174	63	30	1174
14	25	1175	39	27	1175	64	30	1175
15	25	1176	40	27	1176	65	30	1176
16	25	1177	41	27	1177	66	30	1177
17	25	1178	42	27	1178	67	30	1178
18	25	1179	43	27	1179	68	30	1179
19	25	1180	44	27	1180	69	30	1180
20	25	1181	45	27	1181	70	30	1181
21	25	1186	46	27	1186	71	30	1186
22	25	1196	47	27	1196	72	30	1196
23	25	1206	48	27	1206	73	30	1206
24	25	1216	49	27	1216	74	30	1216
25	25	1226	50	27	1226	75	30	1226

[0108]

[0109] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 효소는, 예를 들어 표 2에 기재된 아미노산 서열에 대해 99% 이상의 서열 동일성

을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 효소는 예를 들어 표 2에 기재된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안으로, 효소의 아미노산 서열은 표 2에 기재된 아미노산 서열에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 효소는 예를 들어 표 2에 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다.

## 표 2

유용한 아미노산 서열 (AAS).

AAS No.	서열 번호 2 에서의 위치		AAS No.	서열 번호 2 에서의 위치		AAS No.	서열 번호 2 에서의 위치	
	시작	끝		시작	끝		시작	끝
76	31	1122	101	32	1122	126	33	1122
77	31	1132	102	32	1132	127	33	1132
78	31	1142	103	32	1142	128	33	1142
79	31	1152	104	32	1152	129	33	1152
80	31	1162	105	32	1162	130	33	1162
81	31	1167	106	32	1167	131	33	1167
82	31	1168	107	32	1168	132	33	1168
83	31	1169	108	32	1169	133	33	1169
84	31	1170	109	32	1170	134	33	1170
85	31	1171	110	32	1171	135	33	1171
86	31	1172	111	32	1172	136	33	1172
87	31	1173	112	32	1173	137	33	1173
88	31	1174	113	32	1174	138	33	1174
89	31	1175	114	32	1175	139	33	1175
90	31	1176	115	32	1176	140	33	1176
91	31	1177	116	32	1177	141	33	1177
92	31	1178	117	32	1178	142	33	1178
93	31	1179	118	32	1179	143	33	1179
94	31	1180	119	32	1180	144	33	1180
95	31	1181	120	32	1181	145	33	1181
96	31	1186	121	32	1186	146	33	1186
97	31	1196	122	32	1196	147	33	1196
98	31	1206	123	32	1206	148	33	1206
99	31	1216	124	32	1216	149	33	1216
100	31	1226	125	32	1226	150	33	1226

[0110]

[0111] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 효소는, 예를 들어 표 3에 기재된 아미노산 서열에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 효소는 예를 들어 표 3에 기재된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안으로, 효소의 아미노산 서열은 표 3에 기재된 아미노산 서열에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 효소는 예를 들어 표 3에 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다.

## 표 3

유용한 아미노산 서열 (AAS).

AAS No.	서열 번호 2 에서의 위치		AAS No.	서열 번호 2 에서의 위치		AAS No.	서열 번호 2 에서의 위치	
	시작	끝		시작	끝		시작	끝
151	34	1122	176	35	1122	201	36	1122
152	34	1132	177	35	1132	202	36	1132
153	34	1142	178	35	1142	203	36	1142
154	34	1152	179	35	1152	204	36	1152
155	34	1162	180	35	1162	205	36	1162
156	34	1167	181	35	1167	206	36	1167
157	34	1168	182	35	1168	207	36	1168
158	34	1169	183	35	1169	208	36	1169
159	34	1170	184	35	1170	209	36	1170
160	34	1171	185	35	1171	210	36	1171
161	34	1172	186	35	1172	211	36	1172
162	34	1173	187	35	1173	212	36	1173
163	34	1174	188	35	1174	213	36	1174
164	34	1175	189	35	1175	214	36	1175
165	34	1176	190	35	1176	215	36	1176
166	34	1177	191	35	1177	216	36	1177
167	34	1178	192	35	1178	217	36	1178
168	34	1179	193	35	1179	218	36	1179
169	34	1180	194	35	1180	219	36	1180
170	34	1181	195	35	1181	220	36	1181
171	34	1186	196	35	1186	221	36	1186
172	34	1196	197	35	1196	222	36	1196
173	34	1206	198	35	1206	223	36	1206
174	34	1216	199	35	1216	224	36	1216
175	34	1226	200	35	1226	225	36	1226

[0112]

[0113] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 효소는, 예를 들어 표 4에 기재된 아미노산 서열에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 효소는 예를 들어 표 4에 기재된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안으로, 효소의 아미노산 서열은 표 4에 기재된 아미노산 서열에 대해 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 효소는 예를 들어 표 4에 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다.

표 4

유용한 아미노산 서열 (AAS).

AAS No.	서열 번호 2 에서의 위치	시작	끝	AAS No.	서열 번호 2 에서의 위치	시작	끝
226	39	1122		251	42	1122	
227	39	1132		252	42	1132	
228	39	1142		253	42	1142	
229	39	1152		254	42	1152	
230	39	1162		255	42	1162	
231	39	1167		256	42	1167	
232	39	1168		257	42	1168	
233	39	1169		258	42	1169	
234	39	1170		259	42	1170	
235	39	1171		260	42	1171	
236	39	1172		261	42	1172	
237	39	1173		262	42	1173	
238	39	1174		263	42	1174	
239	39	1175		264	42	1175	
240	39	1176		265	42	1176	
241	39	1177		266	42	1177	
242	39	1178		267	42	1178	
243	39	1179		268	42	1179	
244	39	1180		269	42	1180	
245	39	1181		270	42	1181	
246	39	1186		271	42	1186	
247	39	1196		272	42	1196	
248	39	1206		273	42	1206	
249	39	1216		274	42	1216	
250	39	1226		275	42	1226	

[0114]

본 발명의 몇몇 실시형태에서, 효소는 1종 이상의 글리코실화 아미노산을 포함할 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 효소는 1종 이상의 인산화 아미노산을 포함할 수 있다. 대안으로, 효소의 아미노산 중 어느 것도 글리코실화되거나 인산화되지 않는다.

[0116]

본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 효소는 2개 이상의 서브유닛을 포함하며, 각각의 서브유닛은 상기에 정의된 효소로 이루어진다.

[0117]

효소는 바람직하게는 혼합물과 접촉하여, 갈락토실 억셉터와 갈락토실 도너 둘 다와 접촉하게 된다.

[0118]

본 발명의 몇몇 실시형태에서, 혼합물은 효소를 포함한다. 효소는, 예를 들어 혼합물 중에 용해된 형태로, 예를 들어 단일 효소 분자로서 또는 효소 분자의 가용성 응집체로서 존재할 수 있다.

[0119]

본 발명의 다른 실시형태에서, 효소는 혼합물로부터 분리되지만, 효소와 혼합물의 접촉에 의해 갈락토실 억셉터 및 갈락토실 도너와 접촉하게 된다. 예를 들어, 정지 고체상에 고정화된 효소가 사용될 수 있다. 유용한 정지 고체상의 예로는, 예를 들어 필터, 효소 함유 입자의 충전층, 또는 유사한 구조가 있다.

[0120]

대안으로, 고체상은, 예를 들어 혼합물의 일부를 형성하는, 자유 유동형 미립자 고체상, 예를 들어 유기 또는 무기 비드일 수 있다.

[0121]

고정화 기법을 비롯한 효소의 산업적 사용에 관한 상세사항은 Buchholz의 문헌(2005)에서 확인할 수 있으며, 이 문헌은 모든 목적을 위해 본원에서 참고문헌으로 포함된다.

[0122]

효소는 바람직하게는 갈락토올리고당의 허용 가능한 수율을 얻기 위해 충분한 활성으로 사용된다. 최적 활성은 공정의 특수한 실시에 따라 달라지고 당업자가 용이하게 결정할 수 있다.

[0123]

갈락토실 도너의 높은 전환율(turn-over)과 갈락토올리고당의 높은 수율이 요구된다면, 비교적 높은 활성을 갖는 효소를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 효소의 활성은 갈락토실의 전환율이  $0.02 \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{h})$

이상이 되도록, 바람직하게는  $0.2 \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{h})$  이상이 되도록, 더욱 더 바람직하게는  $2 \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{h})$  이상이 되도록 할 수 있다.

- [0124] 효소 반응은 단계 c) 중에 일어난다. 혼합물이 적절한 조건에 노출되는 즉시(이것은 갈락토실 도너와 갈락토실 억셉터가 효소와 접촉한 후 거의 바로일 수 있음), 트랜스갈락토실화가 일반적으로 시작되고, 본 발명의 몇몇 실시형태에서 단계 b) 및 c)가 동시에 일어난다.
- [0125] 효소는 갈락토실 도너의 이탈기를 유리시켜 갈락토실 도너의 갈락토실 기를 갈락토실 억셉터로 이동시킬 수 있다. 예를 들어, 갈락토실 도너가 락토스일 경우, 글루코스가 유리되고 갈락토실 기가 억셉터로 이동된다. 효소는 효소 반응 중에 촉매로서 작용한다.
- [0126] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 효소는 또한 이미 갈락토실화 갈락토실 억셉터로 갈락토실 기를 이동시킴으로써, 2개, 3개 또는 더 많은 갈락토실 기를 포함하는 갈락토실 억셉터를 생성한다.
- [0127] 혼합물의 pH는 바람직하게는 효소의 최적 pH 부근이다. 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 단계 c) 중의 혼합물의 pH는 pH 3~9의 범위이다. 예를 들어, 단계 c) 중의 혼합물의 pH는 pH 4~8의 범위, 예컨대 pH 5~7.5의 범위일 수 있다.
- [0128] pH와 마찬가지로, 혼합물의 온도도 사용되는 효소의 최적 온도로 조정하는 것이 바람직하다. 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 단계 c)의 온도는 10~80°C의 범위이다. 단계 c)의 온도는 20~70°C의 범위, 바람직하게는 25~60°C의 범위, 더욱 더 바람직하게는 30~50°C의 범위일 수 있다.
- [0129] 본 발명의 내용에 있어서, 용어 "효소의 최적 pH"는 효소가 최고 트랜스갈락토실화 활성을 갖는 pH를 의미한다. 같은 맥락에서, 용어 "효소의 최적 온도"는 효소가 최고 트랜스갈락토실화 활성을 갖는 온도를 의미한다.
- [0130] 본 발명자들은 본 발명의 방법이 놀랍게도 비교적 낮은 농도의 갈락토실 도너가 사용됨에도 불구하고 높은 수율로 갈락토올리고당을 제공한다는 것을 발견하였다. 비교적 낮은 농도의 갈락토실 도너는 추가로 도너의 자체 갈락토실화 정도를 감소시키는데, 즉, 제1 갈락토실 도너의 갈락토실 기가 갈락토실 억셉터 대신에 제2 갈락토실 도너로 이동되는 정도를 감소시킨다.
- [0131] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 단계 c)는 추가의 갈락토실 도너를 혼합물에 첨가하는 것을 포함한다. 이것은 비교적 낮은 농도의 갈락토실 도너가 사용될 경우에 특히 바람직하다. 더 많은 갈락토실 도너를 첨가함으로써 갈락토실 도너가 혼합물에서 고갈되는 것을 막고, 효소 반응 중에 갈락토실 농도를 제어할 수 있다.
- [0132] 추가의 갈락토실 도너의 첨가는 갈락토실 도너의 따로따로의 첨가, 예를 들어 효소 반응 중에 1회 이상의 첨가를 포함할 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 추가의 갈락토실 도너의 첨가는 효소 반응 중에 연속적 첨가일 수 있다. 추가의 갈락토실 도너는 바람직하게는 단계 a)에서 사용되는 것과 동일한 유형이다.
- [0133] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 단계 c) 동안의 혼합물의 갈락토실 도너의 농도는  $0.01 \sim 1 \text{ mol/L}$ 의 범위, 바람직하게는  $0.01 \sim 0.5 \text{ mol/L}$ 의 범위, 바람직하게는  $0.03 \sim 0.3 \text{ mol/L}$ 의 범위의 농도로 유지된다.
- [0134] 예를 들어, 단계 c) 중의 혼합물의 갈락토실 도너의 농도는  $0.02 \sim 0.1 \text{ mol/L}$ 의 범위의 농도로 유지될 수 있다.
- [0135] 단계 c)는 추가의 갈락토실 억셉터를 첨가하는 것을 더 포함할 수 있다. 이로써 단계 c) 동안 혼합물의 갈락토실 억셉터의 농도를 제어하고, 예를 들어 갈락토실 억셉터 농도를, 이것이 필요하다면 실질적으로 일정하게 유지하는 것이 가능하다.
- [0136] 2개 또는 3개의 이동된 갈락토실 기를 포함하는 갈락토올리고당을 유의적인 양으로 제조하기 위해서는, 공정이 갈락토실 억셉터보다 갈락토실 도너를 더 많이 소비해야 한다. 이로써, 더 많은 갈락토실 억셉터가 2회 또는 3회 갈락토실화되어야 한다. 따라서, 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 소비된 갈락토실 도너와 소비된 갈락토실 억셉터 간의 몰비는 1:1 이상, 바람직하게는 5:1 이상, 더욱 더 바람직하게는 10:1 이상이다.
- [0137] 종종 조성물의 갈락토올리고당을 부화하고/하거나 정제하고 갈락토실 억셉터, 갈락토실 도너 및 유리된 이탈기의 농도를 감소시킬 것이 요구된다.
- [0138] 따라서, 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 본 방법은
- [0139] d) 단계 c)의 조성물의 갈락토올리고당을 부화하는 단계
- [0140] 를 추가로 포함한다.

- [0141] 본 발명의 내용에 있어서, 용어 "갈락토올리고당을 부화(enrich)하는"은 건조 중량 기준으로 조성물의 갈락토올리고당의 상대량을 증가시키는 것을 의미한다. 이것은 일반적으로 조성물의 다른 고체의 일부, 예를 들어 저급 당류를 제거하고, 경우에 따라 필요하다면 효소를 제거함으로써 수행한다.
- [0142] 단계 d)의 부화는, 예를 들어 크로마토그래피 분리 및/또는 나노여과를 포함할 수 있다. 이러한 공정에 관한 상세사항은 Walstra 등의 문헌(2006)에 기재되어 있으며, 이 문헌은 모든 목적을 위해 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- [0143] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 부화는 200 g/mol 이하의 물중량을 갖는 분자의 50% 이상(건조 중량 기준으로 w/w)이 단계 c)로부터 제거되는 것을 수반한다. 예를 들어, 농축은 200 g/mol 이하의 물중량을 갖는 분자의 80% 이상(건조 중량 기준으로 w/w)이 단계 c)의 조성물로부터 제거되는 것을 수반할 수 있다.
- [0144] 본 발명의 다른 실시형태에서, 부화는 350 g/mol 이하의 물중량을 갖는 분자의 50% 이상(건조 중량 기준으로 w/w)이 단계 c)로부터 제거되는 것을 수반한다. 예를 들어, 농축은 350 g/mol 이하의 물중량을 갖는 분자의 80% 이상(건조 중량 기준으로 w/w)이 단계 c)의 조성물로부터 제거되는 것을 수반할 수 있다.
- [0145] 부화의 대안으로 또는 부화에 부가하여, 단계 d)가 조성물 중의 갈락토올리고당의 농도를 증가시키는 하나 이상의 공정을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 유용한 농축 단계의 예는, 예를 들어 역삼투, 증발 및/또는 분무건조이다.
- [0146] 상기 방법에 의해 제공되는 갈락토올리고당 함유 조성물은, 예를 들어 건조 분말 형태 또는 시럽 형태일 수 있다.
- [0147] 건조 분말의 제조는 일반적으로 농축, 증발 및/또는 분무 건조와 같은 하나 이상의 공정 단계를 필요로 할 수 있다. 따라서, 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 단계 d)는 액체 형태의 조성물을 농축, 증발 및/또는 분무 건조시켜서 분말 형태의 조성물을 얻는 것을 포함한다. 단계 d)의 액체 조성물을 분무 건조시켜서 분말화된 조성물을 얻는 것이 특히 바람직하다. 단계 d)는 예를 들어 부화, 이에 이은 농축 단계, 예를 들어 나노여과, 역삼투, 또는 증발, 이에 이은 분무 건조 단계를 포함할 수 있다. 부화 전의 조성물의 갈락토올리고당의 농축은 후속 부화 공정이 더 비용 효율적이 되게 할 수 있다.
- [0148] 효율적인 분무 건조는 말토덱스트린, 유단백질, 카제네이트, 유청 단백질 농축물 및/또는 탈지유 분말과 같은 1종 이상의 보조제의 첨가를 필요로 할 수 있다.
- [0149] 본 방법은, 예를 들어 회분식 공정으로서 실시될 수 있다. 본 방법은 대안으로 반회분식 공정으로 실시될 수 있다. 본 방법은 연속식 공정으로서 실시될 수 있다.
- [0150] 본 발명의 방법은 효소 및/또는 사용되지 않은 갈락토실 억셉터를 혼합물로 다시 재순환시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 재순환은 예를 들어 단계 d)의 일부를 형성할 수 있다. 예를 들어, 단계 d)는 갈락토올리고당 함유 조성물로부터 갈락토실 억셉터 및/또는 효소를 분리하여 갈락토실 억셉터 및/또는 효소를 단계 a) 또는 c)로 재순환시키는 것을 포함할 수 있다. 회분식 공정 또는 반회분식 공정의 경우, 갈락토실 억셉터 및/또는 효소를 다음 회분의 혼합물로 재순환시킬 수 있다.
- [0151] 연속식 공정의 경우, 갈락토실 억셉터를 단계 a) 또는 단계 c)에 상응하는 공정 라인의 일부로 재순환시킬 수 있다. 효소를 단계 b) 또는 단계 c)에 따른 공정 라인의 일부로 재순환시킬 수 있다.
- [0152] 단계 a) 및 b)와 관련된 상세사항과 특징은 제조 공정의 실제 시작과 관련된 것이 아니라 공정 중에 적어도 때때로 일어나야 한다는 점에 주목해야 한다. 그러나, 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 갈락토실 도너의 농도는 단계 c)의 전체 기간 동안 단계 a)에 기재된 범위 내에 유지된다.
- [0153] 본 방법이 회분식 또는 반회분식 공정으로서 실시된다면, 단계 a)는 바람직하게는 합성이 시작될 때의 혼합물의 조성에 관련된다. 본 방법이 연속식 공정이라면, 단계 a)는 바람직하게는 정상 상태 운전(steady-state operation) 하의 합성 중의 혼합물의 조성에 관련된다.
- [0154] 갈락토실화 갈락토실 도너의 수준을 가능한 한 낮게 유지하는 것이 바람직한 것으로 인식될 수 있는데, 그 이유는 갈락토실화 갈락토실 도너가 갈락토실화 갈락토실 억셉터로부터 분리하기가 까다로운 바람직하지 않은 불순물로서 인식될 수 있기 때문이다. 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 단계 a)의 혼합물은 0.5 mol/L 이하의 갈락토실화 갈락토실 도너를 포함한다. 갈락토실화 갈락토실 도너는 예를 들어 0.1 mol/L 이하의 갈락토실화 갈락토실 도너를 포함할 수 있다. 더욱 더 바람직하게는, 갈락토실화 갈락토실 도너는 0.01 mol/L 이하의 갈락

토실화 갈락토실 도너를 포함하고, 바람직하게는 갈락토실화 갈락토실 도너를 실질적으로 포함하지 않는다.

[0155] 본 발명의 다른 양태는, 본원에 정의된 방법에 의해 얻을 수 있는, 갈락토올리고당을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0156] 본 발명의 추가의 양태는 갈락토올리고당 함유 조성물, 예를 들어 상기에 언급된 조성물이고, 상기 갈락토올리고당 함유 조성물은

[0157] - 일반식  $\text{Gal-X}$ 를 갖는 제1 갈락토올리고당,

[0158] - 화학량론식  $(\text{Gal})_2\text{X}$ , 예를 들어 일반식  $\text{Gal-Gal-X}$ 를 갖는 제2 갈락토올리고당,

[0159] - 화학량론식  $(\text{Gal})_3\text{X}$ , 예를 들어 일반식  $\text{Gal-Gal-Gal-X}$ 를 갖는 제3 갈락토올리고당

[0160] 을 포함하며, 여기서  $\text{X}$ 는 글리코실 기이고, 이것은 락토실 또는 글루코실이 아니다.

[0161] 본원에 기재된 갈락토올리고당 함유 조성물은 예를 들어 식품 성분일 수 있다.

[0162] 상기에 기재된 바와 같이, " $\text{X}$ " 또는 " $-\text{X}$ "는 바람직하게는 본원에서 언급된 갈락토실 억셉터 중 하나의 글리코실 기이다.

[0163] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, " $\text{X}$ " 또는 " $-\text{X}$ "는 푸코실 기이다. 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에서, " $\text{X}$ " 또는 " $-\text{X}$ "는 갈락토실 기이다.

[0164] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 갈락토올리고당 함유 조성물은

[0165] - 갈락토올리고당  $\text{Gal-X}$ ,  $(\text{Gal})_2\text{X}$  및  $(\text{Gal})_3\text{X}$ 의 총량, 및

[0166] - 갈락토올리고당  $\text{Gal-Glc}$ ,  $\text{Gal}_2\text{Glc}$ ,  $\text{Gal}_3\text{Glc}$ 의 총량

[0167] 간의 몰비가 5:95 이상이다. 예를 들어, 상기에 언급된 몰비는 1:4 이상, 바람직하게는 1:1 이상, 더욱 더 바람직하게는 2:1 이상일 수 있다. 상기에 언급된 몰비가 5:1 이상, 바람직하게는 10:1 이상, 더욱 더 바람직하게는 20:1 이상인 것이 더욱 바람직할 수 있다.

[0168] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에서, 갈락토올리고당 함유 조성물은

[0169] - 갈락토올리고당  $\text{Gal-X}$ ,  $\text{Gal-Gal-X}$  및  $\text{Gal-Gal-Gal-X}$ 의 총량, 및

[0170] - 갈락토올리고당  $\text{Gal-Glc}$ ,  $\text{Gal-Gal-Glc}$ ,  $\text{Gal-Gal-Gal-Glc}$ 의 총량

[0171] 의 몰비가 5:95 이상이다. 예를 들어, 상기에 언급된 몰비는 1:4 이상, 바람직하게는 1:1 이상, 더욱 더 바람직하게는 2:1 이상일 수 있다. 상기에 언급된 몰비가 5:1 이상, 바람직하게는 10:1 이상, 더욱 더 바람직하게는 20:1 이상인 것이 더욱 바람직할 수 있다.

[0172] 갈락토올리고당 함유 조성물은 식  $\text{Gal-Glc}$ ,  $\text{Gal-Gal-Glc}$  및  $\text{Gal-Gal-Gal-Glc}$ 의 갈락토올리고당을 포함하지 않는 것도 가능하다.

[0173] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 갈락토올리고당 함유 조성물은 제1 갈락토올리고당, 제2 갈락토올리고당 및 제3 갈락토올리고당 간의 몰비가 50~99:1~45:0.5~25의 범위이다.

[0174] 본 발명의 다른 실시형태에서, 갈락토올리고당 함유 조성물은 제1 갈락토올리고당, 제2 갈락토올리고당 및 제3 갈락토올리고당 간의 몰비가 20~45:20~45:20~45의 범위이다.

[0175] 본 발명의 추가의 실시형태에서, 갈락토올리고당 함유 조성물은 제1 갈락토올리고당, 제2 갈락토올리고당 및 제3 갈락토올리고당 간의 몰비가 0.5~25:1~45:50~98의 범위이다.

[0176] 본 발명의 몇몇 바람직한 실시형태에서, 갈락토올리고당 함유 조성물은 갈락토올리고당 함유 조성물의 총 중량에 대해 10 중량% 이상의 제1 갈락토올리고당, 제2 갈락토올리고당 및 제3 갈락토올리고당의 총량을 포함한다. 예를 들어, 갈락토올리고당 함유 조성물은 갈락토올리고당 함유 조성물의 총 중량에 대해 20 중량% 이상, 바람직하게는 30 중량% 이상, 더욱 더 바람직하게는 40 중량% 이상의 제1 갈락토올리고당, 제2 갈락토올리고당 및 제3 갈락토올리고당의 총량을 포함할 수 있다.

[0177] 더욱 더 많은 수준의 제1, 제2, 및 제3 갈락토올리고당이 바람직할 수 있다. 따라서, 본 발명의 몇몇 바람직한

실시형태에서, 갈락토올리고당 함유 조성물은 갈락토올리고당 함유 조성물의 총 중량에 대해 50 중량% 이상의 제1 갈락토올리고당, 제2 갈락토올리고당 및 제3 갈락토올리고당의 총량을 포함한다. 예를 들어, 갈락토올리고당 함유 조성물은 갈락토올리고당 함유 조성물의 총 중량에 대해 60 중량% 이상, 바람직하게는 70 중량% 이상, 더욱 더 바람직하게는 80 중량% 이상의 제1 갈락토올리고당, 제2 갈락토올리고당 및 제3 갈락토올리고당의 총량을 포함한다.

[0178] 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 기재된 갈락토올리고당 함유 조성물을 포함하는 식품이다.

[0179] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 식품은 영아용 조제분유 또는 임상 영양식 제품과 같은 기능성 식품이다.

[0180] 본 발명의 다른 실시형태에서, 식품은 베이킹 도우, 예컨대 빵 또는 유사 제품과 같은 베이킹 제품이다.

[0181] 본 발명의 추가의 실시형태에서, 식품은 유제품, 예를 들어 우유와 같은 신선 유제품 또는 요구르트와 같은 발효 유제품이다.

[0182] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 식품은 애완동물 사료 제품이다.

[0183] 본 발명의 양태들 중 하나의 문맥에서 기재한 실시형태들과 특징들은 본 발명의 다른 양태들에도 적용된다는 점을 언급해둔다.

[0184] 이하에서는 본 발명을 하기 비한정적인 실시예를 통해 추가로 상세히 설명할 것이다.

### 실시예

#### 실시예 1: 효소의 제조

[0187] 750 mL의 작업량의 발효 배지에 100 mg/L의 암피실린을 함유하는 라이소제니 브로쓰(Lysogeny broth: LB) 배지 2 mL를 접종하고, OD<sub>600</sub> 3.0까지 12 시간 동안 배양하였다. 2%(w/v) 효모 추출물, 2%(w/v) 대두 펩톤, 1%(w/v) 글루코스 및 100 mg/L의 암피실린을 함유하는 EC 배지에서 발효를 수행하였다. OLGA347  $\beta$ -갈락토시다제를 발현하는 E. coli 균주를 이전에 개시된 바와 같이 제조하였다(Jørgensen et al., 미국 특허 제6,555,348호 B2, 실시예 1 및 2). 발효장치는 Applikon으로부터 입수한 것으로, 총 부피 2 L의 유리 디시 바탁 용기이고 2개의 러시톤(Rushton) 임펠러가 구비되었다. 발효 중에, 2 M NaOH 및 2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 적절히 첨가하여 pH를 pH 6.5로 조절하였고, 온도를 37°C로 제어하였다. 공기를 1~2 L/min의 속도로 베블링함으로써 산소를 공급하였으며, 진탕 속도를 증가시킴으로써 pO<sub>2</sub>를 30%로 유지하였다. 생육은 오프라인 OD<sub>600</sub> 관독으로 추적하였다. OD<sub>600</sub> 값 29.7에서 약 10 시간 동안 증식시킨 후 원심분리에 의해 배양물을 수거하였다. 650 mL의 배양물 상청액을 -20°C에 저장하였다. 세포 펠릿을 200 mL의 수크로스 완충제(30 mM Tris-HCl, 40% 수크로스, 2 mM EDTA, pH 7.5) 중에 재현탁시키고 실온에서 10분 동안 인큐베이션함으로써 삼투압 충격에 의해 세포 펠릿으로부터 주변세포질 단백질을 단리하였다. 원심분리 후, 상청액을 버리고, 펠릿을 20 mL의 냉수에 재현탁시켰다. 포화 MgCl<sub>2</sub> 용액 83  $\mu$ L를 첨가하고, 주변세포질 단백질을 포함하는 상청액을 원심분리 단계에 의해 수집하였다. 주변세포질 분획을 0.2  $\mu$ m 밀리팩(Millipak) 40 필터를 통해 여과하고 -20°C에 저장하였다.

[0188] 프로토콜(J. Sambrook and D.W. Russell, Molecular Cloning - A laboratory manual, 3판 (2001), pp. 17.48-17.51)에 따라, o-니트로페닐- $\beta$ -D-갈락토파라노시드(OPNG)를 기질로서 사용하여 200 mL의 주변세포질 분획 및 650 mL의 배양물 상청액의  $\beta$ -갈락토시다제 활성을 측정하였다. 활성의 대부분은 주변세포질 분획에서 확인되었다(525 유닛, 98%에 해당함).

#### 실시예 2: 베타-갈락토시다제 효소의 T 값 측정

[0190] 이하에 기재된 어세이와 식에 따라 베타-갈락토시다제 효소의 T 값을 측정하였다.

#### 어세이:

[0192] 테스트하고자 하는 베타-갈락토시다제 효소, 10 mM 시트르산나트륨, 1 mM 시트르산마그네슘, 1 mM 시트르산칼슘, Milli-Q 워터(Millipore, USA)로 이루어지고 pH가 6.5인 효소 용액 3.3 mL를 제조한다. 효소 용액은 현재의 어세이 조건 하에 1시간 내에 첨가된 락토스의 33%(w/w)를 사용하기에 충분한 양으로 베타-갈락토시다제 효소를 포함해야 한다. 효소 용액의 온도는 37°C여야 한다.

[0193] 시간 = T<sub>0</sub>일 때, 82.5 mg의 락토스 일수화물(생화학용, Merck Germany)을 효소 용액에 첨가하여 혼합하고, 그

후 혼합물을 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션한다.  $T_0$ 로부터 정확히 1시간 후, 100  $\mu\text{l}$ 의 샘플을 수집하여 Milli-Q 워터로 1:5로 희석하고, 85°C로 10분 동안 가열함으로써 불활성화시킨다. 불활성화된 혼합물을 특성분석 전까지 -20°C에서 유지한다.

[0194] 특성분석:

[0195] 임의의 적절한 분석 기법을 이용하여, 제조된 갈락토스의 양(mol)과 사용된 락토스의 양(mol)의 측정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 희석된 혼합물을 Richmond 등의 문헌(1982) 및 Simms 등의 문헌(1994)에 따라 HPLC에 의해 분석할 수 있다. 다른 유용한 분석 기법은 El Razzi(2002)에 기재되어 있다.

[0196] 적절한 분석 기법의 다른 예는 ISO 5765-2:2002 (IDF 79-2: 2002) "Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese - Determination of lactose content - Part 2: Enzymatic method utilizing galactose moiety of lactose"이다.

[0197] T 값의 계산:

[0198] T 값은 어세이의 희석 혼합물의 특성분석으로부터 얻은 데이터를 이용하여 하기 식에 따라 계산한다:

$$T \text{ 값} = \frac{\text{생성된 갈락토스의 양 (mol)}}{\text{사용된 락토스의 양 (mol)}}$$

[0199] 실시예 - OLGA347 효소의 T 값:

[0201] 상기에 언급된 어세이는 실시예 1의 OLGA347 효소를 사용하여 수행하였다.

[0202] 어세이로부터 얻은 희석된 혼합물을 전환된(즉, 사용된) 락토스 및 생성된 갈락토스에 대해 분석용 HPLC를 통해 분석하였다. HPLC 장치는 Waters로부터 입수한 것으로, 시차 굴절계(RI-검출기) 및 BioRad Aminex HPX-87C 컬럼( $300 \times 7.8 \text{ mm}$ , 125-0055)이 장착되었다. 당류의 용리는 0.05 g/L의 아세트산칼슘을 사용하여 등용매 용리로  $0.3 \text{ mL/min}$ 의 유량 및  $20 \mu\text{l}$ 의 주입 용량으로 수행하였다.

[0203] 얻어진 데이터를 자동화 소프트웨어에 의해 적절하게 베이스라인 보정하였고, 피크를 개별적으로 확인하고 적분하였다. 정량은 락토스 일수화물(생화학용, 독일 Merck 제품), D-(+)-글루코스 일수화물(생화학용, 프랑스 Merck Eurolab 제품) 및 D-(+)-갈락토스(=99%, 이탈리아 Sigma-Aldrich 제품)을 외부 표준으로서 사용하여 수행하였다.

[0204] 각각의 시간 T까지의 락토스의 전환 및 갈락토스의 형성은 정량화된 데이터로부터 계산하였다.  $T = 1 \text{ h}$ 에, 수집된  $100 \mu\text{l}$ 의 샘플 중의 락토스의 29%가 전환되었으며, 이는  $2.3 \mu\text{mol}$ 의 락토스에 해당한다.  $T = 1 \text{ h}$ 에, 수집된  $100 \mu\text{l}$ 의 샘플 중에  $0.5 \mu\text{mol}$ 의 락토스가 형성되었다. 따라서,  $T$  값은  $0.5 \mu\text{mol}/2.3 \mu\text{mol} = 0.2$ 로 계산될 수 있다.

[0205] 또한, 어세이로부터 얻은 희석된 혼합물을 전환된(즉, 사용된) 락토스 및 생성된 갈락토스에 대해 효소적 방법 ISO 5765-2를 통해 분석하였다. R-Biopharm(카탈로그 번호 10 176 303 035)로부터의 브링거 만하임(Boehringer Mannheim) 락토스/D-갈락토스 테스트 키트를 사용하였고, 테스트는 프로토콜에 따라 수행하였다. 효소적 방법은 OLGA347-효소의 T 값이 0.2임을 확인시켜 주었다.

[0206] 실시예 - 종래의 락타제 효소의 T 값:

[0207] 상기에 언급된 어세이를 락타제 효소 Lactozym Pure 2600L(덴마크 Novozymes 제품)을 사용하여 수행하였다. 어세이로부터 얻은 희석된 혼합물을 OLGA347 효소에 대해 기재된 바와 같이 분석하였다. 삼당 및 사당은 검출 가능한 양으로 존재하지 않았고, 동량의 글루코스와 갈락토스가 관찰되었다. 해당하는 T 값은 1이다.

[0208] 상업적으로 이용 가능한 에스케리치아 콜라이(Escherichia coli) 유래의 베타-갈락토시다제(제품 번호: G6008, 독일 Sigma-Aldrich 제품) 및 아스퍼지엘러스 오리자에(Aspergillus oryzae) 유래의 베타-갈락토시다제(제품 번호: G5160, 독일 Sigma-Aldrich 제품)의 T 값 역시 측정하였으며, 두 효소 모두 T 값이 약 1이었다.

[0209] 실시예 3: 도너 분자의 순차적 첨가에 의한 L-푸코실 함유 헤테로-갈락토올리고당의 합성

[0210] 700 mg의 L-(-)-푸코스(99%, 슬로바키아 Sigma-Aldrich 제품) 및 20 mg의 락토스 일수화물(생화학용, 독일 Merck 제품)을 5 mL의 완충제( $10 \text{ mM}$ 의 시트르산나트륨,  $20 \text{ mM}$ 의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.5) 중에 용해시키고, 37°C의 온

도에서 유지하였다. 실시예 1에서와 같이 제조된 2 mL의 OLGA347 효소를 첨가하였다. 이 시간은  $T = 0$ 으로서 정의된다. 6시간 동안, 30분 간격으로 20 mg의 락토스 일수화물을 첨가하였다. 100  $\mu\text{l}$ 의 샘플을 시간  $T = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  및 7 h에 얻었다. 샘플 취득과 특성분석은 실시예 2에서와 동일하게 수행하였다. 질량 분광분석은 Agilent 1100 API-ES LC/MSD 쿼드로폴(Quadropole)을 이용하여 100 ~ 1,000의 스캐닝 질량으로(기체 온도: 350 °C, 진조 기체 유량: 13.0 L/min, 네뷸라이저 압력: 60 psig) 수행하였다. 검출된 이온은 피분석물과 용액 유래의 나트륨 양이온 간의 착물형성으로부터 발생하여,  $M(\text{Na}^+) = M + 23 \text{ Da}$ 의 질량을 생성한다.

[0211]  $T = 0$  h 및  $T = 7$  h로부터의 HPLC 크로마토그램은 각각 도 1a 및 도 1b에 제시된다. 피크는 MS에 의해 확인되었고(데이터는 제시되지 않음), 도면에 표시되어 있다. 범례: 1 = 락토스, 2 = 글루코스, 3 = 갈락토스, 4 = L-푸코스, 5 = 수크로스, 6 = Gal-Fuc 이당, 7 = Gal-Gal-Fuc & Gal-Gal-Glc 삼당, 8 = Gal-Gal-Gal-Fuc & Gal-Gal-Gal-Glc 사당. 도면에서, 글루코스와 갈락토스 농도가 증가하며, 글루코스가 갈락토스보다 약 4배 더 많이 존재한다는 것을 확인할 수 있다. 이것은 갈락토스가 갈락토올리고당의 형성을 위한 도너 분자로서 사용되고 나머지 글루코스가 용액 중으로 유리된다는 가정과 일치한다. 락토스 농도는 락토스를 첨가를 계속하는 것에 의해 증가한다. 이 피크는 또한 효소 반응에서 형성된 알로락토스 및 Gal-Gal 이당을 포함한다. 또한, Gal-Fuc 이당, Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Fuc 삼당 및 Gal-Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Gal-Fuc 사당이 형성된다.

[0212] 락토스, 글루코스 및 갈락토스에 대한 시간의 함수로서의 계산된 피크 면적의 플롯이 도 2에 제시된다. 범례: ◆ = 락토스, × = 글루코스, ▲ = 갈락토스. 락토스, 알로락토스 및 Gal-Gal 이당의 농도가 증가하며, 글루코스는 효소 반응 중에 용액으로 유리되기 때문에 글루코스의 농도가 선형으로 증가한다는 것을 확인된다. 갈락토스의 농도는 글루코스에 비해 적고 그 농도는 단지 천천히 증가한다. 이것은 락토스의 절단으로부터 제공된 거의 모든 갈락토스가 갈락토올리고당을 형성하는 데 사용되었음을 나타낸다. 또한, L-푸코스의 농도는 실험 진행 중에 감소하는데, 왜냐하면 L-푸코스는 효소 반응에서 억셉터 분자로서 사용되어 갈락토올리고당을 형성하기 때문이다(데이터는 제시되지 않음).

[0213] 도 3은 효소 반응으로부터의 생성물에 대한 시간의 함수로서의 계산된 피크 면적의 플롯을 도시한다. 범례: \* = Gal-Fuc 이당, ● = Gal-Gal-Glc & Gal-Gal-Fuc 삼당, □ = Gal-Gal-Gal-Glc & Gal-Gal-Gal-Fuc 사당. Gal-Fuc 이당과 삼당 및 사당 모두 형성된다. 삼당은 Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Fuc의 형태이고, 사당은 Gal-Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Gal-Fuc의 형태이다.

[0214] Gal-Fuc 이당의 농도는 선형으로 증가하여  $T = 6$  h ~  $T = 7$  h로부터 평탄역에 도달하는 경향을 보인다. Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Fuc 사당의 농도는 선형으로 증가하고,  $T = 4$  h로부터 기하급수적 증가 경향을 보인다. Gal-Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Gal-Fuc 사당의 농도는 선형으로 증가한다.

[0215] L-푸코스 함유 갈락토올리고당의 양(총 탄수화물의 w/w)은  $T = 7$  h에서 HPLC 및 MS를 기초로 평가된다: Gal-Fuc = 8%, Gal-Gal-Fuc = 3%, Gal-Gal-Gal-Fuc = 1%. 모두에 있어서, L-푸코스 함유 갈락토올리고당이  $T = 7$  h의 반응 시간 후에 12%를 구성한다. 크로마토그래피에 의해 유리 L-푸코스를 제거한 후, L-푸코스 함유 갈락토올리고당의 계산량은 28%이다.

#### 실시예 4: D-푸코실 함유 헤테로-갈락토올리고당의 합성

[0217] 110 mg의 D-(+)-푸코스( $\geq 98\%$ , 슬로바키아 Sigma-Aldrich 제품) 및 55 mg의 락토스 일수화물(생화학용, 독일 Merck 제품)을 1 mL의 완충제(10 mM 시트르산나트륨, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.5)에 용해시켰다. 실시예 1에서와 같이 제조한 100  $\mu\text{l}$ 의 OLGA347 효소를 첨가하였다. 이 시간은  $T = 0$ 으로서 정의된다.  $T = 0, 2, 4, 6$  및 22 h에 100  $\mu\text{l}$ 의 샘플을 취득하였다. 샘플 취득과 HPLC 특성분석은 실시예 2에서와 같이 수행하였다. MS 특성분석은 실시예 3에서와 같이 수행하였다.

[0218] 도 4는 효소 반응으로부터의 생성물에 대한 시간의 함수로서의 계산된 피크 면적의 플롯을 보여준다. 범례: \* = Gal-Fuc 이당, ● = Gal-Gal-Glc & Gal-Gal-Fuc 삼당, □ = Gal-Gal-Gal-Glc & Gal-Gal-Gal-Fuc 사당. Gal-Fuc 이당과 삼당 및 사당이 모두 형성된다. 삼당은 Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Fuc의 형태이고, 사당은 Gal-Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Gal-Fuc의 형태이다.

[0219] Gal-Fuc 이당의 농도는  $T = 0$  h ~  $T = 6$  h에서 최대 증가를 나타낸다.  $T = 6$  ~  $T = 22$  h에서 증가율은 더 낮아진다. Gal-Gal-Glc 삼당 및 Gal-Gal-Fuc 삼당의 농도는  $T = 0$  h ~  $T = 6$  h에서 2차 최대 증가를 나타낸다.  $T = 6$  h ~  $T = 22$  h에서, 농도는  $T = 4$  h의 수준까지 떨어진다. Gal-Gal-Gal-Glc 사당 및 Gal-Gal-Gal-Fuc 사당의 농

도는  $T = 0$  h ~  $T = 6$  h에서 증가한다.  $T = 6$  h ~  $T = 22$  h에서, 농도는  $T = 4$  h의 수준까지 떨어진다.

[0220] D-푸코스 함유 갈락토올리고당의 양(총 탄수화물의 w/w)은  $T = 22$  h에서부터 HPLC 및 MS 데이터에 기초하여 평가한다. Gal-Fuc = 20%, Gal-Gal-Fuc = 6% 및 Gal-Gal-Gal-Fuc = 1%. 모두에 있어서, D-푸코스 함유 갈락토올리고당은  $T = 22$  h의 반응 시간 후 27%를 구성한다. 크로마토그래피에 의해 D-푸코스를 제거한 후, D-푸코스 함유 갈락토올리고당의 계산량은 55%이다.

[0221] 실시예 5: N-아세틸 갈락토사민 함유 헤테로-갈락토올리고당의 합성

이 실험은 실시예 4에서와 같이 수행하였고, 다만 110 mg의 N-아세틸-D-갈락토사민(GalNAc)(98%, 독일 Sigma-Aldrich 제품)을 억셉터 분자로서 사용하였다.  $T = 0$ , 4 및 23 h에 100  $\mu\ell$ 의 샘플을 취득하였다. 샘플 취득과 HPLC 특성분석은 실시예 2에서와 같이 수행하였다. MS 특성분석은 실시예 3에서와 같이 수행하였다.

[0223] 도 5는 효소 반응으로부터의 생성물에 대한 시간의 함수로서의 계산된 피크 면적의 플롯을 보여준다. 범례: \* = Gal-GalNAc 이당, ● = Gal-Gal-Glc & Gal-Gal-GalNAc 삼당, □ = Gal-Gal-Gal-Glc & Gal-Gal-Gal-GalNAc 사당. Gal-GalNAc 이당과 삼당 및 사당이 형성된다. 삼당은 Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-GalNAc의 형태이고, 사당은 Gal-Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Gal-GalNAc의 형태이다.

[0224] Gal-GalNAc 이당의 농도는  $T = 0$  h ~  $T = 23$  h로부터 선형으로 증가하며,  $T = 23$  h에서 갈락토올리고당이 가장 풍부하다. Gal-Gal-Glc 삼당 및 Gal-Gal-GalNAc 삼당의 농도는  $T = 0$  h ~  $T = 4$  h에서 최대 증가를 나타낸다.  $T = 4$  h ~  $T = 23$  h로부터, 농도 증가율이 낮아져서  $T = 23$  h에서의 Gal-GalNAc 수준에 거의 도달한다. Gal-Gal-Gal-Glc 사당 및 Gal-Gal-Gal-Fuc 사당의 농도는  $T = 0$  h ~  $T = 23$  h에서 증가하며,  $T = 0$  h ~  $T = 4$  h에서 최대 증가를 나타낸다.

[0225] N-아세틸-갈락토사민 함유 갈락토올리고당의 양(총 탄수화물의 w/w)은  $T = 23$  h에서부터 HPLC 및 MS를 기초로 평가된다. Gal-GalNAc = 8%, Gal-Gal-GalNAc = 5%, 및 Gal-Gal-Gal-GalNAc = 2%. 모두에 있어서,  $T = 23$  h의 반응 시간 후에 GalNAc 함유 갈락토올리고당이 15%를 구성한다. 크로마토그래피에 의해 유리 GalNAc를 제거한 후, N-아세틸-갈락토사민 함유 갈락토올리고당의 계산량은 40%이다.

[0226] 실시예 6: 크실로실 함유 헤�테로-갈락토올리고당의 합성

이 실험은 실시예 4에서와 같이 수행하였으나, 다만 110 mg의 D-(+)-크실로스(≥99%, 미국 Sigma-Aldrich 제품)를 억셉터 분자로서 사용하였다.  $T = 0$ , 5 및 23 h에 100  $\mu\ell$ 의 샘플을 취득하였다. 샘플 취득과 HPLC 특성분석은 실시예 2에서와 같이 수행하였다. MS 특성분석은 실시예 3에서와 같이 수행하였다.

[0228] 도 6은 효소 반응으로부터의 생성물에 대한 시간의 함수로서의 계산된 피크 면적의 플롯을 보여준다. 범례: \* = Gal-Xyl 이당, ● = Gal-Gal-Glc & Gal-Gal-Xyl 삼당, □ = Gal-Gal-Gal-Glc & Gal-Gal-Gal-Xyl 사당. Gal-Xyl 이당과 삼당 및 사당이 모두 형성된다. 삼당은 Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Xyl의 형태이고, 사당은 Gal-Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Gal-Xyl의 형태이다.

[0229] Gal-Xyl 이당의 농도는  $T = 0$  h ~  $T = 5$  h에서 최대 증가를 나타낸다.  $T = 5$  h ~  $T = 23$  h에서, 농도는  $T = 4$  h의 수준까지 떨어진다. Gal-Gal-Glc 및 Gal-Gal-Xyl 삼당의 농도는  $T = 0$  h ~  $T = 5$  h에서 증가한다.  $T = 5$  h ~  $T = 23$  h에서 농도는  $T = 4$  h의 수준까지 떨어진다. Gal-Gal-Gal-Glc 사당 및 Gal-Gal-Gal-Fuc 사당은  $T = 0$  h ~  $T = 5$  h에서 증가한다.  $T = 5$  h ~  $T = 23$  h에서, 농도는 관찰 가능한 수준으로 변화하지 않는다.

[0230] 크실로실 함유 갈락토올리고당의 양(총 탄수화물의 w/w)은  $T = 23$  h에서부터 HPLC 및 MS를 기초로 평가된다. Gal-Xyl = 15%, Gal-Gal-Xyl = 3%, Gal-Gal-Gal-Xyl = 0.5%. 모두에 있어서,  $T = 23$  h의 반응 시간 후 크실로실 함유 갈락토올리고당은 18.5%를 구성한다. 크로마토그래피에 의해 유리 크실로스를 제거한 후, 크실로실 함유 갈락토올리고당의 계산량은 41%이다.

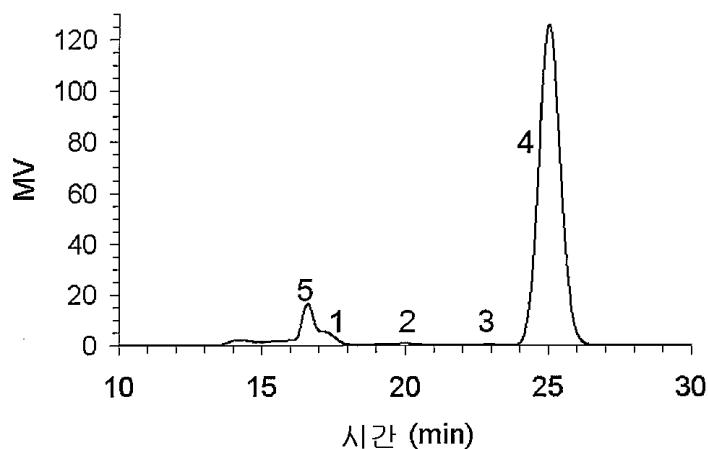
## 참고문헌

- Buchholz (2005) "Biocatalysts and Enzyme technology", Klaus Buchholz *et al.*, ISBN-10: 3-527-30497-5, 2005, Wiley VCH Verlag GmbH
- Franck (2002) "Technological functionality of inulin and oligofructose", A. Franck, British Journal of Nutrition (2002), 87, Suppl. 2, S287-S291
- Yun (1996) "Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation, and application", J. W. Yun, Enzyme and Microbial Technology 19: 107-117, 1996
- Kunz (2000) "Oligosaccharides in human milk: Structural, functional and metabolic aspects", Kunz *et al.*, Ann. Rev. Nutr. 2000, 20:699-722
- Simms *et al.* (1994) Simms, P.J.; Hicks, K.B.; Haines, R.M.; Hotchkiss, A.T. and Osman, S.F.; (1994) Separations of lactose, lactobionic and lactobionolactose by high performance liquid chromatography. J. of Chromatography, 667, 67-73.
- Richmond *et al.* (1982) Richmond, M.L.; Barfuss, D.L.; Harte, B.R.; Gray, J.I. and Stine, C.M.; (1982) Separation of Carbohydrates in Dairy Products by High Performance Liquid Chromatography, J. of Dairy Science, 65 (8), 1394-1400.
- El Razzi (2002) "Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis", volume 66, Journal of Chromatography Library, Elsevier Science, 2002, ISBN-10: 0444500618
- Walstra *et al.* (2006) "Dairy science and technology", Walstra *et al.*, CRC Press, Second edition, 2006

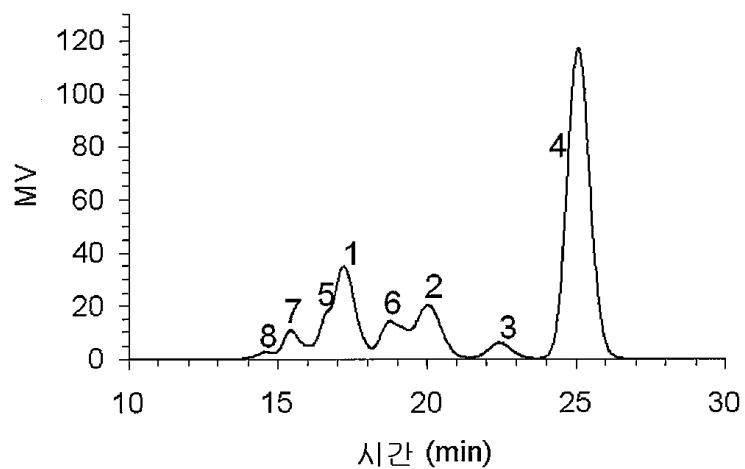
[0231]

## 도면

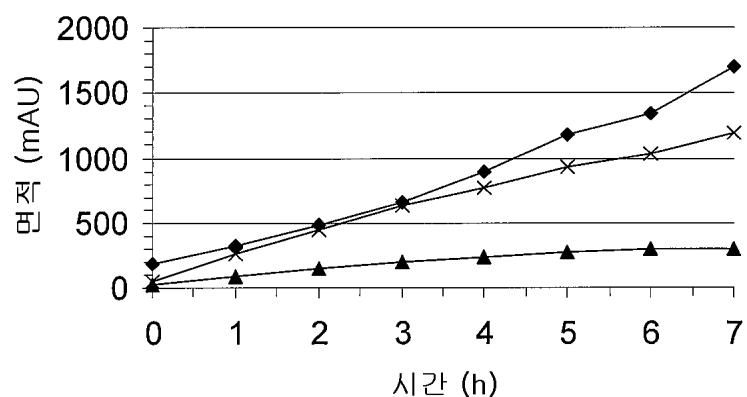
## 도면1a



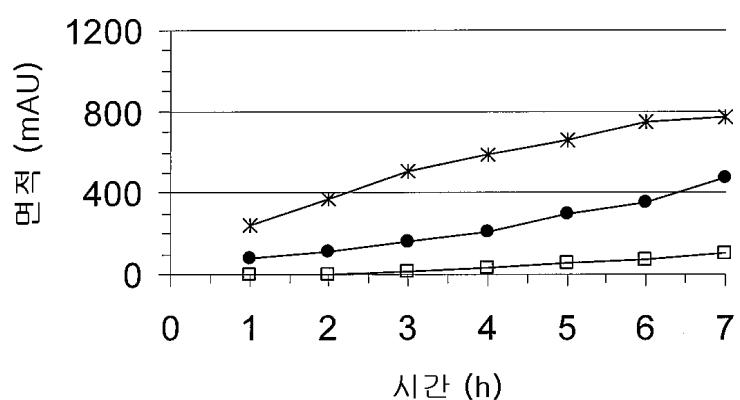
## 도면1b



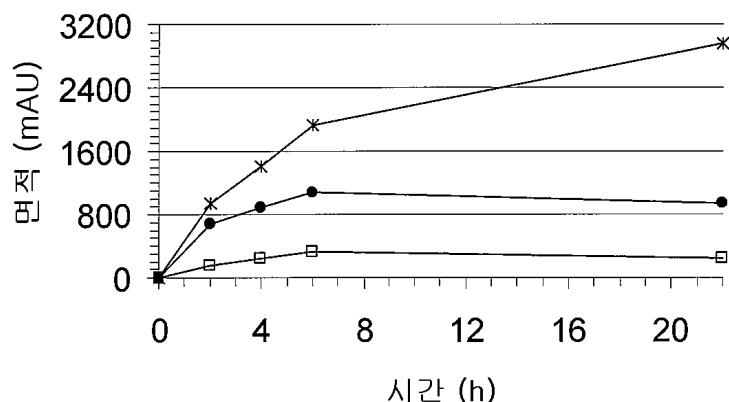
## 도면2



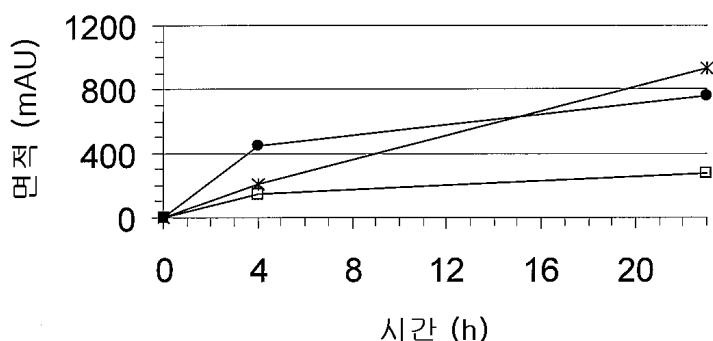
## 도면3



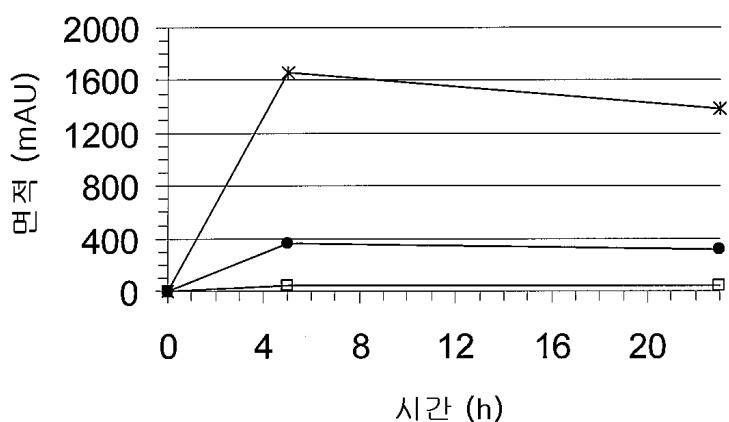
## 도면4



## 도면5



## 도면6



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

- <110> Arla Foods amba
- <120> Galacto-oligosaccharide-containing composition and a method of producing it
- <130> P1018PC00
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1

<211> 5509  
 <212> DNA  
 <213> *Bifidobacterium bifidum*  
 <220><221> CDS  
 <222> (212)..(5470)  
 <223>  
 <400> 1  
 atgcgttgcg ttgcgattt tccggccctg tatggggat acaggattgg cgatggcgcac  
 acggcgttt tgtaatggc attiacatga aatacaggta atgagatatc attctcatga  
 tcaccgtgtg gatatcgcat tggtgcgtat acactaacag caacagagcg gcgcggcagg  
 cgctcgtgga ttcaatgaag aaggaacgtt t atg gca gtt cgc aga ctt ggt  
 Met Ala Val Arg Arg Leu Gly  
 1 5  
 ggc cgc atc gtg gct ttc gcc gcc aca gtg gcc ttg tca ata ccg tta  
 Gly Arg Ile Val Ala Phe Ala Ala Thr Val Ala Leu Ser Ile Pro Leu  
 10 15 20  
 ggg ttg tta aca aat tca gcg tgg gcg gtc gag gac gcc acc cga tcc  
 Gly Leu Leu Thr Asn Ser Ala Trp Ala Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser  
 25 30 35  
 gac tcc acc acg cag atg agc tcc acg ccg gag gtg gtc tac tcc agc  
 Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser  
 40 45 50 55  
 gcc gtg gat tcc aag cag aat cgc acc tcg gat ttc gac gcc aac tgg  
 Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp  
 60 65 70  
 aag ttc atg ctg tcc gat tcc gtg cag gcg cag gat ccg gcg ttc gac  
 Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp  
 75 80 85  
 gat tcg gcc tgg cag cag gtc gac ctg ccg cat gac tac agc atc acg  
 Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr  
 90 95 100

cag aag tat tcg cag agc aac gag gcc gaa agc gca tac ctt ccc ggc	568		
Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly			
105	110	115	
gac acc ggc tgg tac cgc aag tcc ttc acc atc gac cggt gac ctc gcc	616		
Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala			
120	125	130	135
gac aag cgc atc gcc atc aac ttc gac ggc gtg tac atg aac gcc acc	664		
Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr			
140	145	150	
gtc tgg ttc aac ggc gtc aag ctc ggc acc cat ccg tac ggc tac tcg	712		
Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser			
155	160	165	
ccg ttc tcc ttc gac ctg acc ggc aac gcc aag ttc ggt ggg gag aac	760		
Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn			
170	175	180	
acc atc gtc gtc aag gtc gag aac agg ctg ccg tcc agc cgc tgg tac	808		
Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr			
185	190	195	
tcc ggc tcc ggc atc tac cgc gac gtc acc ctc acc gtc acc gac ggc	856		
Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly			
200	205	210	215
gtg cac gtc ggc aat aac ggc gtg gcc atc aag acc ccg agc ctc gcc	904		
Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala			
220	225	230	
acc caa aac ggc ggc gac gtg acg atg aac ctc acc acc aag gtc gcc	952		
Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala			
235	240	245	
aac gac acc gag gcc ggc aac atc acc ctc aag cag acc gtg ttc	1000		
Asn Asp Thr Glu Ala Ala Asn Ile Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe			
250	255	260	
ccc aag gga ggc aag acc gac gcc gcc acc gtc acc acc gca	1048		

Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala  
 265 270 275  
 tcc aag tcc atc gcg gcc ggt gcc agc gcg gac gtg acc tcc acg atc 1096  
 Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile  
  
 280 285 290 295  
 acc gcc gct tcg ccc aag ctg tgg agc atc aag aac ccg aac ctg tac 1144  
 Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr  
 300 305 310  
 acc gtg cgc acc gaa gtg ctc aac ggc ggc aag gtg ctc gac act tac 1192  
 Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr  
 315 320 325  
  
 gac acc gaa tat ggc ttc cgc tgg acc ggc ttc gat gcg acc agc ggt 1240  
 Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly  
 330 335 340  
 ttc tcg ctc aac ggc gag aaa gtc aag ctc aag ggc gtc tca atg cat 1288  
 Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys Leu Lys Gly Val Ser Met His  
 345 350 355  
 cat gac cag gga tcg ctc ggc gcg gtc gcc aac cgc cgc gcc atc gag 1336  
  
 His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu  
 360 365 370 375  
 cgc cag gtc gag att ctc cag aag atg ggc gtc aac tcg atc cgc acc 1384  
 Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr  
 380 385 390  
 acg cac aac ccc gca gcc aag gcg ctg att gac gtc tgc aac gag aag 1432  
 Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys  
  
 395 400 405  
 ggc gtc ctc gtg gtc gaa gag gtc ttc gac atg tgg aac cgg tcg aag 1480  
 Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys  
 410 415 420  
 aac ggc aac acc gag gat tac ggc aag tgg ttc ggc cag gcc atc gcc 1528  
 Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys Trp Phe Gly Gln Ala Ile Ala

425	430	435	
ggt gac aac gcc gtc ctg ggt ggc gac aag gac gag acc tgg gcc aag 1576			
Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys			
440	445	450	455
ttc gac ctg acc agc acc atc aac cgt gac agg aac gcc ccg tcc gtc 1624			
Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val			
460	465	470	
atc atg tgg tcg ctc ggc aac gag atg atg gaa ggc atc agc ggc agc 1672			
Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser			
475	480	485	
gtc tcg ggc ttc ccg gct acc tcc gcc aag ctg gtc gca tgg acg aag 1720			
Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys			
490	495	500	
gcc gcg gac agc acc cgc ccg atg acc tac ggc gac aac aag atc aag 1768			
Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys			
505	510	515	
gcc aac tgg aac gag tcg aac acc atg ggc gac aac ctg acc gcc aac 1816			
Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met Gly Asp Asn Leu Thr Ala Asn			
520	525	530	535
ggc ggc gtg gtc ggc acc aac tac tcc gac ggc gcg aac tac gac aag 1864			
Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys			
540	545	550	
atc cgc acg acc cac ccc tca tgg gcc atc tat ggt tcc gag acg gcg 1912			
Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala			
555	560	565	
tcc gcc atc aac agc cga ggc atc tac aac cgc acc acc ggc ggc gcc 1960			
Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr Asn Arg Thr Thr Gly Gly Ala			
570	575	580	
cag tca agc gac aag cag ctg acc agc tat gac aat tcc gca gtc ggc 2008			

Gln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly  
 585 590 595  
 tgg ggc gcc gtc gcc agc tcc gcc tgg tac gac gtg gtc cag cgc gat 2056  
 Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp Tyr Asp Val Val Gln Arg Asp  
 600 605 610 615  
 ttc gtc gcc ggc aca tac gtg tgg acc ggc ttc gac tac ctc ggc gaa 2104  
 Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Glu  
  
 620 625 630  
 ccc acc ccg tgg aac ggc acc ggc tcc ggc gcc gtg ggc tcc ttg gcc 2152  
 Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser Gly Ala Val Gly Ser Leu Ala  
 635 640 645  
 gtc gcc gaa gaa ctc gta ctt cgg cat cgt cga cac cgc agg ctt ccc 2200  
 Val Ala Glu Glu Leu Val Leu Arg His Arg Arg His Arg Arg Leu Pro  
 650 655 660  
  
 gaa gac acc tat tac ttc tat cag agc cag tgg aac gac gac gtg cac 2248  
 Glu Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser Gln Trp Asn Asp Asp Val His  
 665 670 675  
 acg ctg cac atc ctc ccc gca tgg aac gag aac gtc gtc gcc aag ggc 2296  
 Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn Glu Asn Val Val Ala Lys Gly  
 680 685 690 695  
 tcc ggc aac aac gtg ccg gtc gtc gtc tac acc gac gcg gcc aag gtc 2344  
  
 Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val  
 700 705 710  
 aag ctg tac ttc aca ccg aag ggc agt acc gaa aag cga ctg atc gga 2392  
 Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly  
 715 720 725  
 gag aag tcc ttc acc aag aag acc acc gcg gcc gga tac acc tat cag 2440  
 Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Gln  
  
 730 735 740  
 gtc tac gag ggc tcc gac aag gac tcc acc gcc cac aag aac atg tac 2488  
 Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser Thr Ala His Lys Asn Met Tyr

745	750	755	
ctg acc tgg aac gtg ccg tgg gcc gag ggc acc atc tcc gcc gaa gca			2536
Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu Gly Thr Ile Ser Ala Glu Ala			
760	765	770	775
tac gac gag aac aac agg ctg atc ccc gag ggg tcc acc gag ggc aac			2584
Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn			
780	785	790	
gcg tcg gtg acc acc acc ggc aag gcc gcg aag ctt aaa gcc gat gcc			2632
Ala Ser Val Thr Thr Gly Lys Ala Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala			
795	800	805	
gac cgc aag aeg atc acc gcg gac ggc aag gac ctg tcg tac atc gag			2680
Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly Lys Asp Leu Ser Tyr Ile Glu			
810	815	820	
gtc gac gtg acc gac gcc aac ggc cat atc gtc ccc gat gcc gcc aac			2728
Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn			
825	830	835	
cgc gtc acc ttc gac gtc aag ggc gcc ggc aaa ctg gtc ggc gtc gac			2776
Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala Gly Lys Leu Val Gly Val Asp			
840	845	850	855
aac ggc agc tcg ccg gat cac gac tcc tat cag gcc gac aac cgc aag			2824
Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser Tyr Gln Ala Asp Asn Arg Lys			
860	865	870	
gcg ttc agc ggc aag gtg ctc gcc atc gtc cag tcc acc aag gag gcg			2872
Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile Val Gln Ser Thr Lys Glu Ala			
875	880	885	
ggc gag atc acc gtc acc gcc aag gcc gac ggt ctg caa tca tcc aca			2920
Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala Asp Gly Leu Gln Ser Ser Thr			
890	895	900	
gtg aag atc gcc acc acc gcc gtc ccc ggc acc agc acc gag aag acg			2968
Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr			
905	910	915	

gtc cgc agc ttc tac tac tcg cgc aac tac tac gtc aag acc ggc aac 3016

Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn Tyr Tyr Val Lys Thr Gly Asn

920 925 930 935

aag ccg att ctg ccg agt gat gtc gag gtg cgc tac tcc gac ggc acg 3064

Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr

940 945 950

tcg gac cgt cag aac gtc aca tgg gac gca gtc agc gac gac cag atc 3112

Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp Ala Val Ser Asp Asp Gln Ile

955 960 965

gcc aag gcc ggt tcg ttc agc gtg gcc ggc acg gtc gcc ggg cag aag 3160

Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys

970 975 980

atc tcc gtg cgc gtg acg atg atc gac gag atc ggt gcg ctg ctc aac 3208

Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn

985 990 995

tat tcg gcc agc aca ccg gtc ggc acg ccc gcc gtg ctg cct ggc 3253

Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr Pro Ala Val Leu Pro Gly

1000 1005 1010

tcg cgt ccg gcc gtg ctg ccc gac ggc acc gtg acc agc gcg aac 3298

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

1015 1020 1025

ttc gcc gtc cac tgg acc aag ccc gcc gac acc gtg tac aac acg 3343

Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asp Thr Val Tyr Asn Thr

1030 1035 1040

gcc ggc acc gtc aag gtc ccc ggc acc gcc acc gtc ttc ggc aag 3388

Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val Phe Gly Lys

1045 1050 1055

gag ttc aag gtc acc gcg acg att cgc gtg cag cgg tcg cag gtc 3433

Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg Val Gln Arg Ser Gln Val

1060	1065	1070	
acc atc ggc agc agc gtc tcc ggc aat gcg ctg cgc ctg act cag			3478
Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Thr Gln			
1075	1080	1085	
aac atc ccc gcc gac aag cag tcc gac acg ctg gac gcc atc aag			3523
Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp Thr Leu Asp Ala Ile Lys			
1090	1095	1100	
gac ggc tcc acg acc gtc gac gcc aat acc ggc ggc ggc gac aac			3568
Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly Ala Asn			
1105	1110	1115	
ccg tca gca tgg acc aac tgg gcg tac tgc aag gcc ggc cac aac			3613
Pro Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly His Asn			
1120	1125	1130	
acc gcc gag atc acc ttc gag tac gcg acc gag cag cag ctc ggc			3658
Thr Ala Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala Thr Glu Gln Gln Leu Gly			
1135	1140	1145	
cag att gtc atg tac ttc ttc cgc gac agc aac gcg gtg agg ttc			3703
Gln Ile Val Met Tyr Phe Phe Arg Asp Ser Asn Ala Val Arg Phe			
1150	1155	1160	
ccc gac gcc ggc aag acg aag atc cag atc tcc gcg gac ggc aag			3748
Pro Asp Ala Gly Lys Thr Lys Ile Gln Ile Ser Ala Asp Gly Lys			
1165	1170	1175	
aac tgg acg gat ctc gct gcc acg gag acc atc gcg gcc cag gag			3793
Asn Trp Thr Asp Leu Ala Ala Thr Glu Thr Ile Ala Ala Gln Glu			
1180	1185	1190	
tcg tcc gac cga gtc aag ccg tac acc tat gac ttc gct ccg gtg			3838
Ser Ser Asp Arg Val Lys Pro Tyr Thr Tyr Asp Phe Ala Pro Val			
1195	1200	1205	
gga gcc acg ttc gtc aag gtc acg gtc acc aac gcc gac acc aca			3883
Gly Ala Thr Phe Val Lys Val Thr Val Thr Asn Ala Asp Thr Thr			
1210	1215	1220	

acc	ccc	agc	ggc	gtg	gtc	tgc	gcc	ggc	ctg	acc	gag	atc	gag	ctg	3928
Thr	Pro	Ser	Gly	Val	Val	Cys	Ala	Gly	Leu	Thr	Glu	Ile	Glu	Leu	
1225				1230					1235						
aag	acc	gcg	acc	agc	aag	ttc	gtc	acg	aac	acg	tcc	gcc	gcg	ctc	3973
Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Thr Asn Thr Ser Ala Ala Leu															
1240			1245			1250									
tcg	tcg	ctg	aca	gtg	aac	ggc	acg	aag	gtc	tcc	gac	tcc	gtg	ctc	4018
Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Gly	Thr	Lys	Val	Ser	Asp	Ser	Val	Leu	
1255			1260			1265									
gcc	gcc	ggc	tcc	tac	aac	acg	ccc	gcg	atc	atc	gcg	gac	gtc	aaa	4063
Ala	Ala	Gly	Ser	Tyr	Asn	Thr	Pro	Ala	Ile	Ile	Ala	Asp	Val	Lys	
1270			1275			1280									
gcc	gag	ggc	gaa	ggc	aac	gcc	agc	gtc	acc	gtg	ctg	ccc	gcg	cac	4108
Ala	Glu	Gly	Glu	Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Val	Leu	Pro	Ala	His	
1285			1290			1295									
gac	aac	gtg	atc	cgc	gtg	atc	acc	gag	tcc	gag	gac	cac	gtc	acg	4153
Asp	Asn	Val	Ile	Arg	Val	Ile	Thr	Glu	Ser	Glu	Asp	His	Val	Thr	
1300			1305			1310									
cgc	aag	acc	ttc	acc	atc	aac	ctg	ggc	acg	gag	cag	gaa	ttc	ccc	4198
Arg	Lys	Thr	Phe	Thr	Ile	Asn	Leu	Gly	Thr	Glu	Gln	Glu	Phe	Pro	
1315			1320			1325									
gca	gac	tcc	gat	gaa	cgc	gac	tac	ccg	gcc	gcc	gac	atg	acg	gtc	4243
Ala	Asp	Ser	Asp	Glu	Arg	Asp	Tyr	Pro	Ala	Ala	Asp	Met	Thr	Val	
1330			1335			1340									
acc	gtg	ggc	agc	gaa	cag	acg	tcc	ggc	acc	gcg	acc	gaa	ggc	ccg	4288
Thr Val Gly Ser Glu Gln Thr Ser Gly Thr Ala Thr Glu Gly Pro															
1345			1350			1355									
aag	aaa	ttc	gcg	gtc	gac	ggc	aac	acc	agc	acg	tac	tgg	cat	tcc	4333
Lys	Lys	Phe	Ala	Val	Asp	Gly	Asn	Thr	Ser	Thr	Tyr	Trp	His	Ser	
1360			1365			1370									
aac	tgg	acg	ccc	acc	acc	gtg	aac	gac	ctg	tgg	atc	gcc	ttc	gag	4378

Asn Trp Thr Pro Thr Thr Val Asn Asp Leu Trp Ile Ala Phe Glu

1375	1380	1385	
ctc cag aaa ccc acc aag	ctc gac gcg ctg cgc	tac ctg ccg cgc	4423
Leu Gln Lys Pro Thr Lys	Leu Asp Ala Leu Arg	Tyr Leu Pro Arg	
1390	1395	1400	
ccc gcg ggc agc aag aac	ggc tcc gtc acc gaa	tac aag gtt cag	4468
Pro Ala Gly Ser Lys Asn	Gly Ser Val Thr Glu	Tyr Lys Val Gln	
1405	1410	1415	
gtc agc gat gac ggc acc	aac tgg acc gac gcg	ggc tcc ggc aca	4513
Val Ser Asp Asp Gly Thr	Asn Trp Thr Asp Ala	Gly Ser Gly Thr	
1420	1425	1430	
tgg acc acc gat tac ggc	tgg aag ctc gcc gag	ttc aat cag ccg	4558
Trp Thr Thr Asp Tyr Gly	Trp Lys Leu Ala Glu	Phe Asn Gln Pro	
1435	1440	1445	
gtg acc acc aag cac gtg	cgg ctc aag gcc gtc	cac acc tat gcg	4603
Val Thr Thr Lys His Val	Arg Leu Lys Ala Val	His Thr Tyr Ala	
1450	1455	1460	
gat tcc ggc aac gac aag	ttc atg tcc gcc tcc	gaa atc cgc ctg	4648
Asp Ser Gly Asn Asp Lys	Phe Met Ser Ala Ser	Glu Ile Arg Leu	
1465	1470	1475	
cgc aag gcc gtc gac acc	acc gac atc agc ggc	gcg acc gtg acc	4693
Arg Lys Ala Val Asp Thr	Thr Asp Ile Ser Gly	Ala Thr Val Thr	
1480	1485	1490	
gtg ccc gcc aag ctg acc	gtc gac cgg gtg gac	gcc gac cat ccc	4738
Val Pro Ala Lys Leu Thr	Val Asp Arg Val Asp	Ala Asp His Pro	
1495	1500	1505	
gcc acc ttc gcc acg aag	gac gtg acg gtg acg	ttg ggc gac gcc	4783
Ala Thr Phe Ala Thr Lys	Asp Val Thr Val Thr	Leu Gly Asp Ala	
1510	1515	1520	

acg	ctg	cgc	tac	ggc	gtg	gac	tac	ctg	ctc	gac	tac	gcg	ggc	aac	4828
Thr	Leu	Arg	Tyr	Gly	Val	Asp	Tyr	Leu	Leu	Asp	Tyr	Ala	Gly	Asn	
1525															
1525	1530														1535
acc	gcc	gtc	ggc	aag	gcc	acg	gtg	acc	gtg	cgc	ggc	atc	gac	aag	4873
Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Arg	Gly	Ile	Asp	Lys	
1540															
1540	1545														1550
tac	tcc	ggc	acc	gtc	gcc	aag	acg	ttc	acc	atc	gaa	ctg	aag	aac	4918
Tyr	Ser	Gly	Thr	Val	Ala	Lys	Thr	Phe	Thr	Ile	Glu	Leu	Lys	Asn	
1555															
1555	1560														1565
gcc	ccg	gcg	ccg	gaa	ccg	acg	ctg	acc	tcg	gtg	agc	gtc	aag	acc	4963
Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Pro	Thr	Leu	Thr	Ser	Val	Ser	Val	Lys	Thr	
1570															
1570	1575														1580
aag	cct	tcc	aag	ctg	acc	tat	gtg	gtc	ggc	gac	gcg	ttc	gac	ccg	5008
Lys	Pro	Ser	Lys	Leu	Thr	Tyr	Val	Val	Gly	Asp	Ala	Phe	Asp	Pro	
1585															
1585	1590														1595
gca	gga	ctg	gtg	ctg	cag	cac	gac	aga	cag	gcc	gat	cgc	ccc	cca	5053
Ala	Gly	Leu	Val	Leu	Gln	His	Asp	Arg	Gln	Ala	Asp	Arg	Pro	Pro	
1600															
1600	1605														1610
cag	cca	ctt	gtt	gga	gaa	cag	gcc	gac	gaa	cgc	gga	ctg	acg	tgc	5098
Gln	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Gln	Ala	Asp	Glu	Arg	Gly	Leu	Thr	Cys	
1615															
1615	1620														1625
gga	acg	cga	tgc	gat	cgc	gtt	gaa	cag	ctg	cgc	aaa	cac	gag	aat	5143
Gly	Thr	Arg	Cys	Asp	Arg	Val	Glu	Gln	Leu	Arg	Lys	His	Glu	Asn	
1630															
1630	1635														1640
cgt	gaa	gcc	cat	cgt	acg	ggc	ctc	gat	cat	ctg	gaa	ttc	gtg	ggt	5188
Arg	Glu	Ala	His	Arg	Thr	Gly	Leu	Asp	His	Leu	Glu	Phe	Val	Gly	
1645															
1645	1650														1655
gcc	gcc	gat	gga	gcg	gtc	ggt	gaa	cag	gcc	acc	ttc	aag	gtg	cat	5233
Ala	Ala	Asp	Gly	Ala	Val	Gly	Glu	Gln	Ala	Thr	Phe	Lys	Val	His	
1660															
1660	1665														1670
gtc	cat	gcc	gat	caa	ggt	gac	ggc	cgc	cat	gat	gat	gcc	gat	gaa	5278

Val His Ala Asp Gln Gly Asp Gly Arg His Asp Asp Ala Asp Glu  
 1675 1680 1685  
 cgc gat atc gat cca cat gtc cct gtc gat cac gcg gtc ggt gag 5323  
 Arg Asp Ile Asp Pro His Val Pro Val Asp His Ala Val Gly Glu

1690 1695 1700  
 ctt gcg cgg gct gcg tgc cat cac gtc atc ggt ctg cgg gtc gac 5368  
 Leu Ala Arg Ala Ala Cys His His Val Ile Gly Leu Arg Val Asp  
 1705 1710 1715  
 acc cat cgc ctc aag gca tcc ggc ttc cag atc ccc gcc gac gac 5413  
 Thr His Arg Leu Lys Ala Ser Gly Phe Gln Ile Pro Ala Asp Asp  
 1720 1725 1730

atg gcc gag atc gac cgc atc acc ggc ttc cac cgc ttc gag cgc 5458  
 Met Ala Glu Ile Asp Arg Ile Thr Gly Phe His Arg Phe Glu Arg  
 1735 1740 1745  
 cac gtc ggc tga cgtgattggg cttcccgct gtctggtgcc ggctcgcgaa 5509  
 His Val Gly

1750  
 <210> 2  
 <211> 1752  
 <212> PRT  
 <213> Bifidobacterium bifidum

<400> 2  
 Met Ala Val Arg Arg Leu Gly Gly Arg Ile Val Ala Phe Ala Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Val Ala Leu Ser Ile Pro Leu Gly Leu Leu Thr Asn Ser Ala Trp Ala  
 20 25 30  
 Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr  
 35 40 45  
 Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr  
 50 55 60

Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln

65	70	75	80
Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu			
85	90	95	
Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala			
100	105	110	
Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe			
115	120	125	
Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp			
130	135	140	
Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly			
145	150	155	160
Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn			
165	170	175	
Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg			
180	185	190	
Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val			
195	200	205	
Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala			
210	215	220	
Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met			
225	230	235	240
Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile			
245	250	255	
Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala			
260	265	270	
Ile Gly Thr Val Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser			
275	280	285	
Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser			
290	295	300	
Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly			
305	310	315	320

Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr  
 325 330 335  
 Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys  
 340 345 350  
 Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val  
 355 360 365  
 Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met  
 370 375 380

Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu  
 385 390 395 400  
 Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe  
 405 410 415  
 Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys  
 420 425 430  
 Trp Phe Gly Gln Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp  
 435 440 445

Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg  
 450 455 460  
 Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met  
 465 470 475 480  
 Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala  
 485 490 495  
 Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr  
 500 505 510

Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met  
 515 520 525  
 Gly Asp Asn Leu Thr Ala Asn Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser  
 530 535 540  
 Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala  
 545 550 555 560  
 Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr

565 570 575

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

580 585 590

Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp

595 600 605

Tyr Asp Val Val Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr

610 615 620

Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser

625 630 635 640

Gly Ala Val Gly Ser Leu Ala Val Ala Glu Glu Leu Val Leu Arg His

645 650 655

Arg Arg His Arg Arg Leu Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser

660 665 670

Gln Trp Asn Asp Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn

675 680 685

Glu Asn Val Val Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val

690 695 700

Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser

705 710 715 720

Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Thr Thr

725 730 735

Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser

740 745 750

Thr Ala His Lys Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu

755 760 765

Gly Thr Ile Ser Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro

770 775 780

Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala

785 790 795 800

Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly

805 810 815

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

820 825 830

Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala

835 840 845

Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser

850 855 860

Tyr Gln Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile

865 870 875 880

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

885 890 895

Asp Gly Leu Gln Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro

900 905 910

Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn

915 920 925

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

930 935 940

Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp

945 950 955 960

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

965 970 975

Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp

980 985 990

Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr

995 1000 1005

Pro Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly

1010 1015 1020

Thr Val Thr Ser Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala

1025 1030 1035

Asp Thr Val Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr

1040 1045 1050

Ala Thr Val Phe Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg

1055	1060	1065
Val Gln Arg Ser Gln Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn		
1070	1075	1080
Ala Leu Arg Leu Thr Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp		
1085	1090	1095
Thr Leu Asp Ala Ile Lys Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn		
1100	1105	1110
Thr Gly Gly Ala Asn Pro Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr		
1115	1120	1125
Ser Lys Ala Gly His Asn Thr Ala Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala		
1130	1135	1140
Thr Glu Gln Gln Leu Gly Gln Ile Val Met Tyr Phe Phe Arg Asp		
1145	1150	1155
Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly Lys Thr Lys Ile Gln		
1160	1165	1170
Ile Ser Ala Asp Gly Lys Asn Trp Thr Asp Leu Ala Ala Thr Glu		
1175	1180	1185
Thr Ile Ala Ala Gln Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys Pro Tyr Thr		
1190	1195	1200
Tyr Asp Phe Ala Pro Val Gly Ala Thr Phe Val Lys Val Thr Val		
1205	1210	1215
Thr Asn Ala Asp Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala Gly		
1220	1225	1230
Leu Thr Glu Ile Glu Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Thr		
1235	1240	1245
Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Gly Thr Lys		
1250	1255	1260
Val Ser Asp Ser Val Leu Ala Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Pro Ala		
1265	1270	1275
Ile Ile Ala Asp Val Lys Ala Glu Gly Glu Gly Asn Ala Ser Val		
1280	1285	1290

Thr Val Leu Pro Ala His Asp Asn Val Ile Arg Val Ile Thr Glu  
 1295 1300 1305  
 Ser Glu Asp His Val Thr Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly  
 1310 1315 1320

Thr Glu Gln Glu Phe Pro Ala Asp Ser Asp Glu Arg Asp Tyr Pro  
 1325 1330 1335  
 Ala Ala Asp Met Thr Val Thr Val Gly Ser Glu Gln Thr Ser Gly  
 1340 1345 1350  
 Thr Ala Thr Glu Gly Pro Lys Lys Phe Ala Val Asp Gly Asn Thr  
 1355 1360 1365  
 Ser Thr Tyr Trp His Ser Asn Trp Thr Pro Thr Thr Val Asn Asp  
 1370 1375 1380

Leu Trp Ile Ala Phe Glu Leu Gln Lys Pro Thr Lys Leu Asp Ala  
 1385 1390 1395  
 Leu Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Gly Ser Lys Asn Gly Ser Val  
 1400 1405 1410  
 Thr Glu Tyr Lys Val Gln Val Ser Asp Asp Gly Thr Asn Trp Thr  
 1415 1420 1425  
 Asp Ala Gly Ser Gly Thr Trp Thr Thr Asp Tyr Gly Trp Lys Leu  
 1430 1435 1440

Ala Glu Phe Asn Gln Pro Val Thr Thr Lys His Val Arg Leu Lys  
 1445 1450 1455  
 Ala Val His Thr Tyr Ala Asp Ser Gly Asn Asp Lys Phe Met Ser  
 1460 1465 1470  
 Ala Ser Glu Ile Arg Leu Arg Lys Ala Val Asp Thr Thr Asp Ile  
 1475 1480 1485  
 Ser Gly Ala Thr Val Thr Val Pro Ala Lys Leu Thr Val Asp Arg  
 1490 1495 1500

Val Asp Ala Asp His Pro Ala Thr Phe Ala Thr Lys Asp Val Thr  
 1505 1510 1515  
 Val Thr Leu Gly Asp Ala Thr Leu Arg Tyr Gly Val Asp Tyr Leu

1520	1525	1530
Leu Asp Tyr Ala Gly Asn Thr Ala Val Gly Lys Ala Thr Val Thr		
1535	1540	1545
Val Arg Gly Ile Asp Lys Tyr Ser Gly Thr Val Ala Lys Thr Phe		
1550	1555	1560
Thr Ile Glu Leu Lys Asn Ala Pro Ala Pro Glu Pro Thr Leu Thr		
1565	1570	1575
Ser Val Ser Val Lys Thr Lys Pro Ser Lys Leu Thr Tyr Val Val		
1580	1585	1590
Gly Asp Ala Phe Asp Pro Ala Gly Leu Val Leu Gln His Asp Arg		
1595	1600	1605
Gln Ala Asp Arg Pro Pro Gln Pro Leu Val Gly Glu Gln Ala Asp		
1610	1615	1620
Glu Arg Gly Leu Thr Cys Gly Thr Arg Cys Asp Arg Val Glu Gln		
1625	1630	1635
Leu Arg Lys His Glu Asn Arg Glu Ala His Arg Thr Gly Leu Asp		
1640	1645	1650
His Leu Glu Phe Val Gly Ala Ala Asp Gly Ala Val Gly Glu Gln		
1655	1660	1665
Ala Thr Phe Lys Val His Val His Ala Asp Gln Gly Asp Gly Arg		
1670	1675	1680
His Asp Asp Ala Asp Glu Arg Asp Ile Asp Pro His Val Pro Val		
1685	1690	1695
Asp His Ala Val Gly Glu Leu Ala Arg Ala Ala Cys His His Val		
1700	1705	1710
Ile Gly Leu Arg Val Asp Thr His Arg Leu Lys Ala Ser Gly Phe		
1715	1720	1725
Gln Ile Pro Ala Asp Asp Met Ala Glu Ile Asp Arg Ile Thr Gly		
1730	1735	1740
Phe His Arg Phe Glu Arg His Val Gly		
1745	1750	