

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6976173号  
(P6976173)

(45) 発行日 令和3年12月8日(2021.12.8)

(24) 登録日 令和3年11月11日(2021.11.11)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 P</b>	<b>19/56</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 19/56
<b>A 2 3 L</b>	<b>33/20</b>	<b>(2016.01)</b>	A 2 3 L 33/20
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/54</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/54 Z N A
<b>C O 7 H</b>	<b>15/24</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 H 15/24
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/20</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/20 A

請求項の数 16 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2017-547452 (P2017-547452)	(73) 特許権者	514265131
(86) (22) 出願日	平成28年3月10日 (2016. 3. 10)		レイクスユニフェルシテイト フローニン
(65) 公表番号	特表2018-509902 (P2018-509902A)		ゲン
(43) 公表日	平成30年4月12日 (2018. 4. 12)		オランダ王国 N L - 9 7 1 2 C P フロ
(86) 国際出願番号	PCT/NL2016/050172		ーニンゲン ブレールストラート5
(87) 国際公開番号	W02016/144175	(74) 代理人	100095407
(87) 国際公開日	平成28年9月15日 (2016. 9. 15)		弁理士 木村 満
審査請求日	平成31年3月1日 (2019. 3. 1)	(74) 代理人	100132883
(31) 優先権主張番号	15158421.6		弁理士 森川 泰司
(32) 優先日	平成27年3月10日 (2015. 3. 10)	(74) 代理人	100148633
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 桜田 圭
		(74) 代理人	100147924
			弁理士 美恵 英樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ステビオールグリコシドの酵素的修飾方法、それによって得られる修飾ステビオールグリコシド、およびそれらの甘味料としての使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ステビオールグリコシド基質を、グルコース供与体としてのスクロース、および、ラクトバチルス・ロイテリ菌 (*Lactobacillus reuteri*) 180株のグルカンスクラーゼ G T F 1 8 0 の変異体である変異体 G T F 1 8 0 グルカンスクラーゼの存在下で、インキュベートすることを含み、

前記 G T F 1 8 0 は配列番号1のアミノ酸配列を有する全長グルカンスクラーゼ G T F 1 8 0 を含み、

前記変異体 G T F 1 8 0 グルカンスクラーゼは、( i ) 配列番号2のアミノ酸配列を有するN末端可変ドメイン断片を欠く切断型グルカンスクラーゼ G T F 1 8 0 ( G T F 1 8 0 - N )、( i i ) 配列番号3のアミノ酸配列を有するNおよびC末端ドメインV断片を欠く切断型グルカンスクラーゼ G T F 1 8 0 ( G T F 1 8 0 - N V )、ならびに、( i i i ) 配列番号1のアミノ酸配列での位置を用いて示して、S 1 1 3 7 Y、Q 1 1 4 0 E / F / N / Y、L 9 8 1 A、W 1 0 6 5 L / E / Q / F のアミノ酸置換の1つ以上を含む、前記 G T F 1 8 0、前記 G T F 1 8 0 - N、および前記 G T F 1 8 0 - N V の変異型(配列番号1のアミノ酸配列での S 1 1 3 7、Q 1 1 4 0、L 9 8 1、W 1 0 6 5 は、それぞれ、配列番号2のアミノ酸配列での S 3 9 8、Q 4 0 1、L 2 4 2、W 3 2 6 に対応し、配列番号1のアミノ酸配列での S 1 1 3 7、Q 1 1 4 0、L 9 8 1、W 1 0 6 5 は、それぞれ、配列番号3のアミノ酸配列での S 3 4 5、Q 3 4 8、L 1 8 9、W 2 7 3 に対応する)、からなる群より選択される1種類以上を含む、

10

20

C - 19位のみが修飾された修飾ステビオールグリコシドを酵素的に提供する方法。

【請求項2】

前記修飾ステビオールグリコシドが少なくとも1つのグルコース残基で修飾されている、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記修飾ステビオールグリコシドが、(16)グリコシド結合、(13)グリコシド結合、またはそれらの組み合わせを介して1つ以上のグルコースで修飾されている、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記修飾ステビオールグリコシドが、C - 19位においてのみ単一のグルコース残基で修飾されている、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項5】

前記ステビオールグリコシドが、レバウジオシドA [13 - ( { - D - グルコピラノシル - (12) - [ - D - グルコピラノシル - (13) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ) エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシルエステル]、またはステビオシド(13 - { [ - D - グルコピラノシル - (12) - - D - グルコピラノシル ] オキシ } エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシルエステル)である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記スクロースは、バッチ方式で添加される、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項7】

前記変異体GTF180グルカンスクラーゼは、S1137Y、Q1140E、L981A、W1065L/E/Q/Fの変異のうち1つ以上を有する、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記変異体GTF180グルカンスクラーゼは、N末端可変ドメイン断片(GTF180 - N)ならびに/またはNおよびC末端ドメインV断片(GTF180 - N V)を欠く切断型変異体である、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

30

前記変異体GTF180グルカンスクラーゼは、GTF180 - NQ1140E、GTF180 - NQ1140F、GTF180 - NQ1140N、GTF180 - NQ1140Y、GTF180 - NS1137Y、GTF180 - N L981A、GTF180 - N W1065L、GTF180 - N W1065E、GTF180 - N W1065 QおよびGTF180 - N W1065F、GTF180 - N VQ1140E、GTF180 - N VQ1140F、GTF180 - N VQ1140N、GTF180 - N VQ1140Y、GTF180 - N VS1137Y、GTF180 - N V L981A、GTF180 - N V W1065L、GTF180 - N V W1065E、GTF180 - N V W1065 QおよびGTF180 - N V W1065Fからなる群より選択される(ただし、変異の位置は配列番号1のアミノ酸配列での位置を用いて示す)、請求項8に記載の方法。

40

【請求項10】

(i) 13 - ( { - D - グルコピラノシル - (12) - [ - D - グルコピラノシル - (13) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ) エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシル - (16) - - D - グルコピラノシルエステル、

(ii) 13 - ( { - D - グルコピラノシル - (12) - [ - D - グルコピラノシル - (13) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ) エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシル - (16) - - D - グルコピラノシル - (16) - - D - グルコピラノシルエステル、および、

(iii) 13 - ( { - D - グルコピラノシル - (12) - [ - D - グルコピラ

50

ノシル - ( 1 3 ) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ ) エント - カウル - 1 6 - エン - 1 9 - 酸 - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 6 ) - - D - グルコピラノシルエステル、  
 からなる群から選択される、修飾ステビオールグリコシド。

【請求項 1 1】

低血糖甘味料としての請求項 1 0 に記載の修飾ステビオールグリコシドの使用。

【請求項 1 2】

請求項 1 0 に記載の少なくとも 1 つの修飾ステビオールグリコシドを含む、甘味組成物。

【請求項 1 3】

請求項 1 0 に記載の少なくとも 1 つの修飾ステビオールグリコシドを含む消耗品。

10

【請求項 1 4】

請求項 1 0 に記載の有効量の修飾ステアビオールグリコシドを消耗品に含めることを含む、前記消耗品を甘味化する方法。

【請求項 1 5】

ステビオールグリコシドの C - 1 9 位のみを修飾することにより、当該ステビオールグリコシドの苦味および / または後味を完全にまたは部分的に除去するための、所望のトランスグリコシル化活性を有するラクトバチルス・ロイテリ菌 ( L a c t o b a c i l l u s r e u t e r i ) 1 8 0 株の G T F 1 8 0 の変異体の使用であって、

前記 G T F 1 8 0 は配列番号 1 のアミノ酸配列を有する全長グルカンスクララーゼ G T F 1 8 0 を含み、

20

前記変異体は、( i ) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する N 末端可変ドメイン断片を欠く切断型グルカンスクララーゼ G T F 1 8 0 ( G T F 1 8 0 - N )、( i i ) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する N および C 末端ドメイン V 断片を欠く切断型グルカンスクララーゼ G T F 1 8 0 ( G T F 1 8 0 - N V )、ならびに、( i i i ) 配列番号 1 のアミノ酸配列での位置を用いて示して、S 1 1 3 7 Y、Q 1 1 4 0 E / F / N / Y、L 9 8 1 A、W 1 0 6 5 L / E / Q / F のアミノ酸置換の 1 つ以上を含む、前記 G T F 1 8 0、前記 G T F 1 8 0 - N、および前記 G T F 1 8 0 - N V の変異型 ( 配列番号 1 のアミノ酸配列での S 1 1 3 7、Q 1 1 4 0、L 9 8 1、W 1 0 6 5 は、それぞれ、配列番号 2 のアミノ酸配列での S 3 9 8、Q 4 0 1、L 2 4 2、W 3 2 6 に対応し、配列番号 1 のアミノ酸配列での S 1 1 3 7、Q 1 1 4 0、L 9 8 1、W 1 0 6 5 は、それぞれ、配列番号 3 のアミノ酸配列での S 3 4 5、Q 3 4 8、L 1 8 9、W 2 7 3 に対応する )、 からなる群より選択される 1 種類以上を含む、

30

使用。

【請求項 1 6】

a ) ラクトバチルス・ロイテリ菌 ( L a c t o b a c i l l u s r e u t e r i ) 1 8 0 株の G T F 1 8 0 の変異体の組を生成する工程、

b ) ステビオールグリコシドのグリコシル化を可能にする条件下で、水性反応混合物中のグルコース供与体の存在下で、各変異体をステビオールグリコシド基質とインキュベートする工程、及び

40

c ) 少なくとも部分的に反応混合物が濁るのを防ぐ能力を決定することにより、ステビオールグリコシドを修飾することができるラクトバチルス・ロイテリ菌 ( L a c t o b a c i l l u s r e u t e r i ) 1 8 0 株の G T F 1 8 0 の少なくとも 1 つの変異体を選択する工程、

d ) 修飾ステビオールグリコシドの構造を更に決定すると共に、ステビオールグリコシドの C - 1 9 位のみを修飾することができるラクトバチルス・ロイテリ菌 ( L a c t o b a c i l l u s r e u t e r i ) 1 8 0 株の変異体 G T F 1 8 0 を選択する工程、

を含む、C - 1 9 位のみでステビオールグリコシドを修飾することができるグルカンスクララーゼを同定する方法。

【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は概して、ステビオールグリコシドの製造に関する。特に、本発明は、新規ステビオールグリコシドへのステビオールグリコシドの酵素的修飾方法、およびその甘味料としての使用に関する。

## 【0002】

甘味料は、食品、飲料および菓子産業において最も一般的に使用される成分としてよく知られている。甘味料は、製造中またはスタンドアロン使用のために、例えば、適切に希釈された場合または卓上用甘味料として、最終食品に組み込まれ得る。甘味料には、スクロース、高フルクトースコーンシロップ、糖蜜、メープルシロップ、および蜂蜜などの天然甘味料、ならびにアスパルテーム、サッカリンおよびスクラロースなどの人工甘味料が含まれる。

10

## 【0003】

ハーブ植物ステビア・レバウジアナ・ベルトニー (*Stevia rebaudiana Bertoni*) の葉、キク科 (*Asteraceae*) [キク科雑草 (*Compositae*)] 科の根粒性多年草は、ステビオールグリコシドである天然の甘味化合物の高品種を含む (*Brandle et al. 1998*)。ステビオシド (乾燥葉 5 - 10% w/w) とレバウジオシド A (2 - 4% w/w 乾燥葉) が最も豊富で、それらはスクロース (0.4% 水溶液) より約 200 ~ 300 倍甘い。したがって、それらは、スクロースおよび人工 (合成) 甘味料のための「バイオ」代替物と考えられ得る (*Geuns 2003; Goyal et al. 2010; Puri et al. 2011*)。

20

## 【0004】

甘味に加えて、高用量および通常の消費量における、いくつかのステビオールグリコシドは、抗酸化剤、抗菌剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、胃腸保護剤 (下痢止め剤) のような多様な薬理的性質を有し、それらは、腎機能、血圧、および血糖値に正の効果があるようである (*Chatsudthipong and Muangprasat 2009; Madan et al. 2010; Brahmachari et al. 2011; Lemus-Mondaca et al. 2012; Shivanna et al. 2013*)。それらは、肥満、糖尿病、高血圧、フェニルケトン尿症、心臓病および虫歯に苦しむ人々にとって有益であり得る (*Yadav and Guleria 2012*)。ステビオールグリコシドは非カロリーであり、発がん性ではなく、遺伝毒性ではなく、ヒトの生殖/発生毒性に関係しない (*European Food Safety Authority, 2010*)。

30

## 【0005】

構造的に、ステビオールグリコシドは、アグリコンとしてエント - 13 - ヒドロキシカウル - 16 - エン - 19 - 酸を有するが、炭水化物組成物とは異なる (図 1 参照)。

## 【0006】

13 - tert - 水酸基のグルコース単位数と 19 - カルボキシル基のグルコース単位数との比は、甘味およびステビオールグリコシドの味の質との関係を有するようである (*Darise et al. 1984*)。例えば、レバウジオシド A はステビオシドより苦味が少ない。ステビオシドの酵素的グルコシル化研究は、グリコシド結合特異性がステビオールグリコシドの官能特性にも影響を及ぼすことを示している。*Fukunaga* ら (1989) は、C - 13 位でのステビオシドのモノ - およびジ - (14) - グルコシル化の両方が、甘味の強度および品質の両方において顕著な改善を伴う生成物を与えることを見出した。しかしながら、C - 19 位でのモノ - およびジ - (14) - グルコシル化の両方は、苦味のある後味を増加させ、より低い甘味強度をもたらした (*Fukunaga et al. 1989*)。一方、C - 19 位のグルコース単位の C - 6 ヒドロキシル基への - 結合グルコースの結合は、味の質において顕著な改善をもたらした (*Lobov et al. 1991*)。明らかに、グリコシド結合のアノメリック性

40

50

は、甘さおよび苦さ味覚に大きな影響を与えないが、いくつかの最近の研究は、19-O-グルコシル部分に1つおよび2つのβ-結合グルコース単位をそれぞれ余分に有する、レバウジオシドDおよびレバウジオシドM、両レバウジオシドA誘導体は、両方ともレバウジオシドAおよび多くの他のステピオールグリコシドよりも望ましい味プロファイルを有する(Hellfritsch et al. 2012; 特許文献1、特許文献2; Prakash et al. 2014)。レバウジオシドAと比較して、レバウジオシドDは甘味が増し、水および炭酸飲料系での苦味を減少させた。レバウジオシドMは、レバウジオシドAと比べて苦味が減少したが、水溶液中の類似の甘味強度を示した。酸性化した水では、レバウジオシドAと比較して、苦味の減少およびより高い甘味が認められた(Prakash et al. 2014)。更に、ステピオシドのC-19位のグルコース単位のC-2ヒドロキシル基への(1→2)-または(1→2)-(レバウジオシドE)結合グルコースの結合は、ステピオシドの感覚刺激生成物を改善し、同様の甘味を有するが苦味を低減した化合物を生成した(Ye et al. 2013)。

10

## 【0007】

ステビア甘味料の商業化の成功の主な欠点は、そのわずかな苦味と渋み(特にステピオシド)である。これらの望ましくない特性は、ステピオールグリコシドのグリコシル部分を修飾することによって低減または排除することができる。

## 【0008】

ステピオールグリコシドの化学修飾は、これらの化合物の味の質を改善する目的で行われてきた。例えば、ステピオシドおよびレバウジオシドAは、(ソジオスルホ)プロピル[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>Na]部分による19-O-グルコシル残基の置換によって改善され得る(DuBois et al. 1981; DuBois and Stephenson 1985)。更に、ステピオシドのいくつかの類似体は、別の単糖(例えば、β-D-Xyl、β-L-Ara、β-D-Man、またはβ-L-Rha)のC-19-O-β-D-グルコシル部分を置換すること、あるいは単糖(β-L-Rhaまたはβ-L-Qui)を有するC-19-β-D-グルコシル部分の伸長によって合成されている。しかしながら、選択的保護-脱保護合成戦略において多段階配列の必要性のために、ステピオールグリコシドを修飾するための化学的方法の適用は実用的でないと考えられている。更に、有機溶媒および金属塩の使用は、食品産業において得られた誘導体の降心に問題を引き起こす。これらの問題を克服するために、生物触媒の代替物がより好ましく、「グリーン」ケミストリーの目的にも好ましい。

20

30

## 【0009】

有望な手順は、酵素的なトランスグリコシル化の反応にステピオールグリコシドを供することであり、それによって分子に新しい単糖残基を導入する。単糖残基の数、位置およびアノマー性(anomericity)に依存して、化合物の味の質および効力は変化する。

## 【0010】

味を改善するために、UDP-グルコシルトランスフェラーゼ(UGTアーゼ)(特許文献3、特許文献2)およびシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(CGTAアーゼ)の間で、異なる酵素システムを用いてステピオールグリコシドの炭水化物部分の酵素的修飾を行った(Darise et al 1984; Li et al 2013; 特許文献4)。UGTaseは、高い位置特異性を有する効率的な酵素であり、β-またはβ-結合グルコースの特定の位置への転移を触媒する。しかしながら、UGTaseは、グリコシル供与体として高価なヌクレオチド活性化糖を必要とするため、工業的用途にはそれほど魅力的ではない。CGTaseは、カップリングおよび不均化反応を触媒し、グルコース残基をデンプンまたはシクロデキストリンから受容体分子に転移させる。分子間のトランスグリコシル化反応は、CGTase酵素の受容体特異性のために、ステピオールグリコシドの非還元末端グルコース残基のC-4-ヒドロキシル基でのみ起こると予想される。しばしば高収率が得られるが、CGTaseは、ほとんどC-13およびC-19にβ-D-グルコシル伸長を有する化合物の混合物であるステピオールグリコシ

40

50

ドを生成する C - 13 / C - 19 レジオ特異性が低い。更に、CGTase 酵素によって導入された ( 1 4 ) 結合は、唾液中に存在するデンプン分解酵素によってヒトの口腔内で急速に加水分解され、それによりステビオールグリコシドのカロリー含量を増加させる。したがって、( 1 6 ) および ( 1 3 ) 結合のような - アミラーゼ耐性グリコシド結合の導入は、低カロリー食品およびゼロカロリー食品に対する消費者の要求に答えるので、より望ましい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】米国特許出願公開第2013/00771521号明細書

10

【特許文献2】国際公開第2014/122227号

【特許文献3】国際公開第2013/176738号(A9)

【特許文献4】米国特許出願公開第2014/0227421号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

したがって、本発明者らは、酵素的に修飾されたステビオールグリコシドを提供するための新規な手段および方法を目指した。特に、彼らは、非修飾ステビオールグリコシドと比較して、減少した苦味および/またはより高い甘味を示す化合物を産生する酵素的方法を開発することに着手した。好ましくは、該方法は工業規模で経済的に魅力的であり、好ましくはグリコシル供与体として高価なヌクレオチド活性化糖を必要としない。

20

【課題を解決するための手段】

【0013】

この目的のために、ラクトバチルス・ロイテリ菌 (*Lactobacillus reuteri*) のような、酵素の大部分のメンバーが一般に安全と認められる (GRAS) というステータスを有する、種々の乳酸桿菌 (*lactobacilli*) のグルカンスクラーゼ酵素およびフルクタンスクラーゼ酵素のグルコシル化潜在性をスクリーニングした。グルカンスクラーゼは細胞外酵素であり、これは乳酸菌においてのみ起こることが報告されている。それらは、安価な供与体基質スクロースから - グルカンポリマーを合成する。グルカンスクラーゼ酵素に依存して、種々のグリコシド結合 (の混合)、すなわち ( 1 2 ) -、( 1 3 ) -、( 1 4 ) - および ( 1 6 ) 結合がそのグルカン生成物に導入される (Leemhuis et al., 2013)。グルカンスクラーゼ酵素によって使用されるグルコシル供与体基質スクロースの低コストは、それらの工業的用途にとって大きな利点である。最も重要なことに、グルカンスクラーゼ酵素によって導入された ( 1 2 ) -、( 1 3 ) - および ( 1 6 ) 結合は、唾液中に存在するアミロリシス酵素によって口腔内で加水分解されない。種々のラクトバチルス・ロイテリ菌 (*Lactobacillus reuteri*) 株からの種々の産物特異性を有する野生型および変異体グルカンスクラーゼおよびフルクタンスクラーゼ酵素からなる 100 を超える酵素を、ステビオールグリコシドレバウジオシド A をグルコシル化する能力についてスクリーニングした。セミ分取 NP - HPLC によりレバウジオシド A グルコシドを単離し、その構造を MALDI - TOF 質量分析および  $1D/2D$   $^1H/^{13}C$  NMR 分光法により解明した。新しいレバウジオシド A グルコシドの味覚属性を決定するために官能評価を行った。

30

40

【0014】

驚くべきことに、ラクトバチルス・ロイテリ菌 (*Lactobacillus reuteri*) 180 由来のグルカンスクラーゼ GTF180 (GenBank アクセッション番号 AY697430) のみがレバウジオシド A をグルコシル化することができたことが判明した。レバウジオシド A グルコシル化生成物の NMR 構造分析は、GTF180 が、C - 19 - 結合グルコース残基においてのみ特異的にレバウジオシド A をグルコシル化することを示した。興味深いことに、いくつかの GTF180 点変異体は、レバウジオ

50

シド A に対してより高いトランスグルコシル化活性を示した。1つの変異体 Q 1 1 4 0 E は、約 9 6 % のレバウジオシド A 変換率を示した。ステピオシドの修飾に関しても同様の結果が観察された。

【 0 0 1 5 】

したがって、一実施形態では、本発明は、ステピオールグリコシド基質をグルコース供与体およびラクトバチルス・ロイテリ菌 (*Lactobacillus reuteri*) 1 8 0 株のグルカンスクラーゼ G T F 1 8 0、または所望のトランスグリコシル化活性を有するその変異体の存在下でインキュベートすることを含む、修飾ステピオールグリコシドを酵素的に提供する方法を提供する。

【 0 0 1 6 】

私たちの知るところでは、グルカンスクラーゼを用いたステピオシドのグルコシル化に関する唯一の報告がある。M u s a らは、ステピオシドの生物変換におけるロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*) S K 2 4 . 0 0 2 からのアルテルナンスクラーゼによる酵素修飾が、ステピオシドの苦味を完全にまたは部分的に除去することを報告している。最適化された反応条件では、ステピオシドで 4 3 . 7 % の最大トランスグルコシル化収率が達成された。1 ~ 3 個の - グルコース単位が結合したステピオシドグリコシドが得られた。フォローアップ研究では、生成物の構造が、1 3 - { [ - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 6 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 2 ) - - D - グルコピラノシル ] オキシ } エント - カウル - 1 6 - エン - 1 9 - 酸 - D - グルコ 20  
ピラノシルエステルであると特徴づけられた ( M u s a e t a l . 2 0 1 4 ) 。したがって、M u s a らの方法は、異なる酵素を使用し、より低い収率を示し、C - 1 9 位ではなく C - 1 3 位で異なるタイプの修飾、すなわち - グルコシル化をもたらす。

【 0 0 1 7 】

本発明の一実施形態では、ステピオールグリコシドは、C - 1 9 - 結合グルコース残基において少なくとも1つの - グルコース残基により修飾される。例えば、ステピオールグリコシドには、( 1 6 )、( 1 3 ) グリコシド結合、またはそれらの組み合わせを介して1つ以上のグルコースが備わる。特定の態様では、修飾は、( 1 6 ) グリコシド結合 ( - イソマルトース ) または ( 1 3 ) グリコシド結合 ( - ニゲロース ) を介した1つのグルコースの付加を含む ( 図 5 A ) 。別の特定の態様では、修飾は、 30  
結合グルコースにおける ( 1 6 ) グリコシド結合を介したグルコシルグルコース単位の付加を含む。単位内では、グルコース残基は ( 1 6 ) グリコシド結合 ( イソマルトース ) または ( 1 3 ) グリコシド結合 ( ニゲロース ) ( 図 5 B および 5 C ) を介して結合することができる。

【 0 0 1 8 】

ステピオールグリコシドは、複数の位置で修飾され得る。例えば、ステピオールアグリコンの C - 1 3 位および / または C - 1 9 位 ( 複数可 ) で修飾が起こり得る。レバウジオシド D およびレバウジオシド M の魅力的な味覚特徴の観点から、ステピオールグリコシドは、好ましくは、少なくともステピオールグリコシドの C - 1 9 位で修飾されている。

【 0 0 1 9 】

より好ましくは、修飾ステピオールグリコシドは、ステピオールグリコシドの C - 1 9 位でのみ修飾される。例えば、一実施形態では、本発明は、ステピオールアグリコンの C - 1 9 位においてのみ単一のグルコース残基により修飾された修飾ステピオールグリコシドの酵素的生産方法を提供する。一実施形態では、修飾は、C - 1 9 結合グルコース残基における単一の ( 1 6 ) グルコースの付加を含む。

【 0 0 2 0 】

ステピオールグリコシド基質は、いかなるタイプのものであってもよい。例えば、それは、ステピオシド、ルブソシド、レバウジオシド A、レバウジオシド C、レバウジオシド D、レバウジオシド E を含むレバウジオシドおよびズルコシド化合物からなる群から選択される。一実施形態では、ステピオールグリコシド基質は、ステピオールグリコシドの C 50

10

20

30

40

50

- 19位に少なくとも1つの単糖部分を有する。

【0021】

特定の実施形態では、ステピオールグリコシド基質はレバウジオシドである。本発明者らは、C-19位でのレバウジオシドAの-D-グルコシル化が、レバウジオシドDおよびレバウジオシドMよりも類似またはより良好な味プロファイルを有するレバウジオシドDおよびレバウジオシドMアノマー異性体を生じることができると仮定した。したがって、好ましい実施形態では、本発明は、レバウジオシドA [13-( { -D-グルコピラノシル-(1-2)-[ -D-グルコピラノシル-(1-3)- ] -D-グルコピラノシル } オキシ) エント-カウル-16-エン-19-酸 -D-グルコピラノシルエステル] の酵素的修飾方法を提供する。

10

【0022】

別の特定の実施形態では、ステピオールグリコシド基質はステピオシドであり、最も豊富で最も苦い味の1つである、ステビア抽出物に存在するステピオールグリコシドである。

【0023】

典型的には、乾燥重量に基づき、ステビアの葉に見られる4つの主要なステピオールグリコシドは、ズルコシドA(0.3%)、レバウジオシドC(0.6-1.0%)、レバウジオシドA(2-4%)およびステピオシド(5-10%)である。ステビア抽出物において合理的な量で同定される他のグリコシドは、レバウジオシドB、D、E、およびF、ステピオールピオシドおよびルブソシドを含む。これらの中でも、現在、商業的規模では、ステピオシドおよびレバウジオシドAのみが入手可能である。

20

【0024】

ステピオールグリコシドは、典型的には水または有機溶媒抽出のいずれかを含む当該技術分野で公知の方法を用いて葉から抽出することができる。超臨界流体抽出法および水蒸気蒸留法もまた記載されている。超臨界CO<sub>2</sub>、膜技術、および水、またはメタノールおよびエタノールなどの有機溶媒を使用するステビア・レバウジアナ(*Stevia rebaudiana*)からのジテルペン甘味グリコシドの回収方法も使用することができる。

【0025】

米国特許出願公開第2014/343262号明細書は、以下の工程を含む、ステピオールグリコシドを精製する方法を開示する：a. 吸着されたステピオールグリコシドを有する少なくとも1つのカラムを提供するために、吸着樹脂を充填した複数のカラムを含むマルチカラムシステムにステピオールグリコシドの溶液を通す工程、およびb. ステピオールグリコシドを吸着した少なくとも1つのカラムからの低含量のレバウジオシドX(米国特許出願公開第2014/0227421号明細書；Prakash et al 2014)を有する画分を溶出して、ステピオールグリコシドを含む溶出溶液を提供する工程。

30

【0026】

レバウジオシドAは一般的に80%の純度で入手可能である。主な不純物は、ステピオシド、ステピオールピオシド、レバウジオシドB、レバウジオシドC、レバウジオシドD、ズルコシドA、レバウジオシドFおよび他のステピオールグリコシドを含む。多くの研究は、高い回収率での高純度のレバウジオシドAの回収に焦点を当てていた。米国特許第5,962,678号明細書は、80%純度のレバウジオシドAを得るために無水メタノール溶液を用いてレバウジオシドAを再結晶化することを開示している。無水メタノールで再結晶を何度も繰り返すことにより、レバウジオシドAの純度を95%以上に高めることができる。米国特許出願公開第2006/0083838号明細書は、エタノールと4~15%の水とを含む溶媒による再結晶によるレバウジオシドAの精製を開示している。特願昭第55-23756号は、水性エタノール(>70%)からの結晶化によりレバウジオシドAおよびステピオシドを精製して純度80%のレバウジオシドAを得る方法を開示している。米国特許出願公開第2007/0082103号明細書は、エタノール水

40

50

溶液からの再結晶化によってレバウジオシド A を精製する方法を開示しており、粗レバウジオシド (60%) からの 2 段階再結晶により 97% 収率で少なくとも純度 98% のレバウジオシド A が生成される。米国特許第 8,791,253 号明細書は、単一の再結晶化工程のみを使用して、実質的に純粋なレバウジオシド A 組成物を提供する。

**【0027】**

本発明の方法におけるステピオールグリコシド基質の濃度は、例えば、基質の種類、所望の修飾等によって異なる。典型的には、反応混合物は、少なくとも 20 mM、好ましくは少なくとも 30 mM、より好ましくは少なくとも 50 mM、例えば 60、70、80、90 ~ 100 mM の修飾されるステピオールグリコシドを含む。最大濃度は、とりわけ、水性反応媒体中の基質溶解度に依存する。例えば、基質として 50 ~ 100 mM のレバウジオシド A またはステピオシドを用いて良好な結果が得られた。

10

**【0028】**

本発明の方法は、グルコース供与体としてスクロースを使用する。スクロースは安価で広く入手可能である。スクロースが少なくとも 50 mM、好ましくは少なくとも 100 mM、より好ましくは少なくとも 500 mM の濃度で使用される場合、良好な結果が得られた。例えば、反応混合物は、少なくとも 500 mM、600 mM、700 mM、800 mM、900 mM または 1 M スクロースを含む。2 M または 3 M までのより高い濃度を使用することもできる。グルコース供与体は、反応の開始時にその総量で添加され得る。いくつかの実施形態では、バッチ方式でスクロースを添加することが有利である。例えば、スクロースは、バッチ方式で、例えば、開始時に、1.5 時間後および 3 時間後に、少なくとも 1 μM、より好ましくは少なくとも 2 μM の最終量まで添加される。

20

**【0029】**

反応は、典型的には約 20 ~ 70 の温度、3 ~ 7 の pH 範囲で実施される。好ましくは、約 37 の温度が使用される。

**【0030】**

反応は、所望の量の修飾ステピオールグリコシドが生成されるまで進行させる。典型的には、インキュベーションは、約 1 時間 ~ 一晚にわたり実施される。

**【0031】**

当業者は、所与の反応条件下で所望の程度の酵素修飾を得るために使用される GTF180 グルカンスクラーゼ酵素の量を決定することができるであろう。例えば、1 ~ 50 U / mL を使用することができる。好ましくは、少なくとも 3 U / mL が使用される。経済的理由から、35 U / mL まで使用することが有利であり得る。一実施形態では、5 ~ 30 U / mL が使用される。1 単位 (U) の酵素は、25 mM の酢酸ナトリウム (pH 4.7)、1 mM の CaCl<sub>2</sub>、および 37 での 1 M のスクロースを含む反応混合物中で 1 分間あたり 1 μmol の単糖を生成するのに必要な酵素の量として定義される。

30

**【0032】**

一実施形態では、ラクトバチルス・ロイテリ菌 (*Lactobacillus reuteri*) 株 180 由来の野生型 GTF180 グルカンスクラーゼが使用される (GenBank アクセッション番号 AY697430)。別の実施形態では、変異体 GTF180 グルカンスクラーゼが使用される。本明細書中で使用される場合、変異体 GTF180 グルカンスクラーゼは、野生型アミノ酸配列と比較して、1 つ以上のアミノ酸置換、アミノ酸欠失および / またはアミノ酸挿入を含む酵素を指す。

40

**【0033】**

好ましい実施形態では、本発明によるステピオールグリコシドの酵素的修飾のための GTF180 変異体は、S1137、Q1140、L981 および / または W1065 (GenBank 配列 AY697430 に基づくナンバリング) 位に置換変異体を含む。好ましくは、変異体は非保存的置換、すなわち天然アミノ酸とは異なる性質を有するアミノ酸変化をもたらす変異体である。例えば、前記変異体は、以下のアミノ酸置換の 1 つ以上を有する: S1137Y、Q1140E、L981A、W1065L/E/Q/F。

**【0034】**

50

別の実施形態では、変異体GTF180は、欠失変異体または切断型変異体であり、少なくとも10アミノ酸のストレッチがN-および/またはC-末端から除去される。一態様では、切断型変異体は、N末端可変ドメインが欠失している残基742-1772を含むGTF180-Nである。例えば、GTF180全長野生型タンパク質の117kDaのN末端切断型(741残基)断片であるGTF180-Nで良好な結果が得られた。GTF180-Nは完全に活性であり、全長酵素と同様のサイズおよび結合分布を有する-グルカンポリマーを産生する(Kralj et al., 2004a)。レバウジオシドAグルコシル化生成物のNMR構造分析は、GTF180-Nが、C-19-結合グルコース残基においてのみ特異的にレバウジオシドAをグルコシル化することを示した。興味深いことに、いくつかのGTF180-N置換変異体は、レバウジオシドAに対してGTF180-Nよりもはるかに高いトランスグルコシル化活性を示した。1つの変異体Q1140Eは、GTF180-Nによる約55%のレバウジオシドA変換と比較して約96%のレバウジオシドA変換を示した(図3および図4)。したがって、好ましい実施形態では、本発明の方法は、例えばQ1140、S1137、L981および/またはW1065の位置に、1つ以上のアミノ酸置換を有するGTF180-Nを用いる。具体的な例示的変異体酵素には、GTF180-NQ1140E、GTF180-NQ1140F、GTF180-NQ1140N、GTF180-NQ1140Y、GTF180-NQ1140R、GTF180-NS1137Y、GTF180-NL981A、GTF180-NW1065L、GTF180-NW1065E、GTF180-NW1065QおよびGTF180-NW1065Fを含む。

10

20

#### 【0035】

別の態様では、切断変異体は、N末端可変ドメインおよびN末端ドメインV断片(最初の793個のN末端アミノ酸に対応する)と、ドメインVC末端断片(最後の136個のC末端アミノ酸に対応する)が欠失して(Meng et al., 2015a)、アミノ酸794-1636からなるGTF180変異体との両方をもたらすGTF180-NVである。「触媒コア」と見なすことができるこのGTF180-NV切断変異体は、全長GTF180野生型と比較して約50%のサイズの減少を有し、完全に活性であり、GTF180野生型と同様のグリコシド結合分布を生成するが、高分子量の多糖類合成においては、著しく害される。

30

#### 【0036】

本発明の切断変異体は、例えばその触媒特性を改善するために付加的な置換変異体(複数可)を更に含んでいてもよい。一実施形態では、変異体はGTF180-NVであり、更に位置(複数可)S1137、Q1140、L981および/またはW1065において置換変異体を含む。例えば、前記変異体は、以下のアミノ酸置換の1つ以上を有する:S1137Y、Q1140E、L981A、W1065L/E/Q/F。具体的な例示的変異体酵素には、GTF180-NVQ1140E、GTF180-NVQ1140F、GTF180-NVQ1140N、GTF180-NVQ1140R、GTF180-NVQ1140Y、GTF180-NVS1137Y、GTF180-NVL981A、GTF180-NVW1065L、GTF180-NVW1065E、GTF180-NVW1065QおよびGTF180-NVW1065Fを含む。

40

#### 【0037】

変異GTF180グルカンスクラーゼは、例えば、Van Leeuwenらにより説明され、それは、GTF180-N酵素の特定のアミノ酸残基の変異誘発を報告し、スクロースから修飾されたエキソポリサッカライド(mEPS)を産生する12の変異体酵素を産生した(van Leeuwen et al., 2009)。本発明者らは、GTF180-Nの単一変異体のうちの2つであるQ1140EおよびS1137Yが、GTF180-NよりもレバウジオシドAに対するトランスグルコシル化活性はるかに高く、GTF180-Nによる約55%レバウジオシドA変換と比べて、それぞれ約

50

96%および約73%のレバウジオシドA変換を示すことを見出した(図3および図4)。変異体Q1140Eは主としてモノ-β-グルコシル化レバウジオシドAを産生したが、GTF180-Nおよび変異体S1137Yは少なくとも8までのDPを有する複数のβ-グルコシル化形態を産生した。β-グルコシル化生成物のNMR構造解析は、GTF180-Nおよび変異体Q1140EおよびS1137Yが、C-19位においてのみ特異的にレバウジオシドAをグルコシル化することを示した。3つの酵素は、C-19-結合グルコースにおいて専ら(1-6)結合グルコースでレバウジオシドAをグルコシル化し、RebAG1を生成した。GTF180-Nおよび変異体S1137Yのジ-グルコシル化レバウジオシドA生成物は、末端β-グルコース残基において結合した(1-3)結合グルコース(約75%)または別の(1-6)結合グルコース(約25%)による両方のRebAG1の伸長であった。したがって、特に好ましい変異体は、GTF180-NのQ1140EおよびS1137Yを含む。

#### 【0038】

GTF180-N変異体L981AおよびW1065L/E/Q/F(Meng et al., 2015b)は、レバウジオシドAをβ-グルコシル化することができるが、重合(すなわち、オリゴ糖およびグルカン形成)活性をほとんど示さない。これは、下流の処理、単糖、二糖、オリゴ糖およびグルカンからの伸長レバウジオシドA生成物の精製の間の明確な利点である。最も重要な副反応であるβ-グルカン合成を排除することにより、より高いグリコシル化収率がレバウジオシドAについて得られた。200mMスクロースにおいて、および1.5時間のインキュベーション時間で、これらの変異体は、レバウジオシドA上のGTF180-Nおよび変異体Q1140EおよびS1137Yと同等またはそれ以上のトランスグルコシル化活性を有する。レバウジオシドAを受容体分子として観察すると、変異体Q1140Eもステビオシドを主にモノ-β-グルコシル化生成物に変換した。したがって、一実施形態では、変異体酵素は変異体L981Aおよび/またはW1065L、W1065E、W1065Q、W1065Fを含む。

#### 【0039】

また、ステビオールグリコシドの感覚刺激特性を増強または改善するために、例えば、甘味を完全に増強するために、または苦味および/もしくはステビオールグリコシド、好ましくはレバウジオシドAもしくはステビオシドの後味を部分的に除去するために、ラクトバチルス・ロイテリ菌(Lactobacillus reuteri)180株のグルカンスクラゼGTF180、または所望のトランスグリコシル化活性を有するその変異体の使用が本明細書において提供される。

#### 【0040】

レバウジオシドAを修飾するのに有用な置換変異体のスクリーニングにおいて、レバウジオシドAをβ-グルコシル化することができない不活性変異体または酵素を含む反応混合物が、レバウジオシドAの経時的な漸進的沈殿によりに濁ったことが観察された一方で、レバウジオシドAをβ-グリコシル化することができる活性酵素を含むものは透明のままであった。理論に縛られることを望むものではないが、レバウジオシドAにグルコース部分を付加すると、その溶解性が増大する。この現象は、好ましくは最終レバウジオシドA濃度が最低50mMの場合には約6時間のインキュベーション後、最終レバウジオシドA濃度が最低30mMの場合には約16時間インキュベーション後に、反応混合物の外観を評価することによって活性変異体の迅速な選択を可能にする。例えば、反応がマイクロタイタープレートまたは他のタイプの透明容器で行われる場合、更なる特徴付けのために1つ以上の変異体を同定するには単なる目視検査のみで十分であり得る。

#### 【0041】

したがって、本発明はまた、ステビオールグリコシド、好ましくはレバウジオシドAまたはステビオシドを修飾することができるグルカンスクラゼを同定する方法であって、該方法は、

a) ラクトバチルス・ロイテリ菌(Lactobacillus reuteri)株180のGTF180の変異体のパネルを生成する工程、

10

20

30

40

50

b) ステビオールグリコシドのグリコシル化を可能にする条件下で、水性反応混合物中のグルコース供与体の存在下で、各変異体をステビオールグリコシドとインキュベートする工程、及び

c) 少なくとも部分的に反応混合物が濁るのを防ぐ能力を決定することにより、ステビオールグリコシドを修飾することができるラクトバチルス・ロイテリ菌 (*Lactobacillus reuteri*) 180 の GTF180 の少なくとも1つの変異体を選択する工程、

d) 任意に、修飾ステビオールグリコシドの構造を更に決定すると共に、ステビオールグリコシドの C - 19 位を修飾することができるラクトバチルス・ロイテリ菌 (*Lactobacillus reuteri*) 180 の変異体 GTF180 を選択する工程、を含む。

10

【0042】

好ましくは、変異体パネルは、N末端可変ドメイン (GTF180 - N) ならびに/またはNおよびC末端ドメインV断片 (GTF180 - N V) を欠く切断型変異体のような、切断型 GTF180 酵素から出発して調製される。

【0043】

一実施形態では、変異体パネルは、異なる置換変異体、好ましくは非保存的置換変異体を含む。例えば、スクリーニング方法は、Q1140位に異なる(非保存的)アミノ酸置換を有する GTF180 (切断型) 変異体のパネルを作製し、ステビオールグリコシド - グルコシル化について Q1140 変異体を全て試験することを含む。本明細書の以下の

20

図8を参照。

【0044】

本発明の更なる態様は、本発明による方法によって得ることができる修飾ステロイドグリコシドに関する。一実施形態では、ステビオールグリコシドは、少なくとも1つのグルコース残基で修飾される。特定の態様では、修飾は、(1 6)グリコシド結合(イソマルトース)を介して1つのグルコースの付加を含む(図5A)。別の特定の態様では、修飾は、結合グルコースにおける(1 6)グリコシド結合を介したグルコシルグルコース単位の付加を含む。単位内では、グルコース残基は(1 6)グリコシド結合(イソマルトース)または(1 3)グリコシド結合(ニゲロース)(図5Bおよび5C)を介して結合することができる。

30

【0045】

本発明は、好ましくは、ステビオールグリコシドの C - 19 位で修飾されたステビオールグリコシドを提供する。より好ましくは、修飾ステビオールグリコシドは、ステビオールグリコシドの C - 19 位でのみ修飾される。例えば、一実施形態では、本発明は、ステビオールグリコシドの C - 19 位で単一の - グルコース残基でのみ修飾された修飾ステビオールグリコシドを提供する。一実施形態では、C - 19 位は、単一の (1 6) 結合グルコースで修飾される。

【0046】

本発明の例示的な修飾ステビオールグリコシドは、

(i) 13 - ( { - D - グルコピラノシル - (1 2) - [ - D - グルコピラノシル - (1 3) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ) エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシル - (1 6) - - D - グルコピラノシルエステル (図5A)

40

(ii) 13 - ( { - D - グルコピラノシル - (1 2) - [ - D - グルコピラノシル - (1 3) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ) エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシル - (1 6) - - D - グルコピラノシル - (1 6) - - D - グルコピラノシルエステル (図5B)

(iii) 13 - ( { - D - グルコピラノシル - (1 2) - [ - D - グルコピラノシル - (1 3) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ) エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシル - (1 3) - - D - グルコピラノシル - (1

50

6) - - D - グルコピラノシルエステル ( 図 5 C ) からなる群から選択される。

【 0 0 4 7 】

レバウジオシド A の 1 9 - O - グルコシル部分における ( 1 6 ) グルコシル化のレバウジオシド A の甘味および苦味に対する効果を測定するために、新規レバウジオシド A グルコシドの 1 つ、つまり、( i ) 1 3 - ( { - D - グルコピラノシル - ( 1 2 ) - [ - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ ) エント - カウル - 1 6 - エン - 1 9 - 酸 - D - グルコピラノシル - ( 1 6 ) - - D - グルコピラノシルエステルをレバウジオシド A と比較して味の評価を行った。このために、ブライントテストでは、ステピオールグリコシドの苦い後味を知覚することができた 1 2 人の試験者に、0 から 5 の尺度で甘味と苦味を評価するように要求した。ここで、スコア 0 は甘味 / 苦味を示さない、5 は非常に甘い / 非常に苦いことを示す。新規レバウジオシド A グルコシドがレバウジオシド A と比較してより自然な甘味を増大させかつ苦味を減少させたことを示す明確な傾向が観察された ( 図 7 ) 。

10

【 0 0 4 8 】

また、低血糖甘味料としての本発明による修飾ステピオールグリコシドの使用、および場合によっては他の食用成分、甘味料および / または甘味増強剤と組み合わせた、有効量の修飾ステピオールグリコシドを消耗品に含めることを含む、消耗品を甘味化する方法が提供される。

【 0 0 4 9 】

更なる態様は、本明細書で提供される少なくとも 1 つの修飾ステピオールグリコシドを含む甘味組成物に関する。特定の実施形態では、甘味料組成物は、調理に使用されるか、または消費者によって飲料または他の食品に添加されるのに適した卓上甘味料である。そのような甘味料組成物は、包装してバルクで販売され得る。あるいは、特定の実施形態では、甘味料組成物は、消費者によって使用されるときに開封される一回分のパッケージに包装される。特定の実施形態による甘味組成物の少なくとも 1 つの他の食用成分は、風味料、例えば、閾値知覚レベルでもしくはそれ未満もしくはわずかにそれを上回っている風味料、または消費者が容易に知覚できる量の風味料、流動剤、着色料、甘味料組成物が使用される飲料および他の食品中の取り扱いの容易さおよび / または改善された口当たりを提供する増量剤、ならびに / または他の適切な成分、またはそれらの任意の 2 つ以上の組み合わせであり得る。特定の実施形態では、増量剤 ( 複数可 ) は、甘味料組成物によって前もってもたらされた甘味を増大させることによって、改善された甘味プロファイルを提供することができる。特定の実施形態では、少なくとも 1 つの他の食用成分は、エリスリトール、D - タガトース、および / または D - プシコースであり、例えば、これらの成分の 2 つ以上の組み合わせが、甘味料組成物に含まれ、組み合わせは、例えば、エリスリトールおよび D - タガトース、またはエリスリトールおよび D - プシコース、または D - タガトースおよび D - プシコースである。

20

30

【 0 0 5 0 】

また、本発明による少なくとも 1 つの修飾ステピオールグリコシドを含み、任意に他の甘味料および / または甘味増強剤と組み合わせられた消耗品も提供される。例えば、消耗品は、飲料、食料品、口腔ケア製品、たばこ製品、医薬品および栄養補助製品の群から選択される。

40

【 0 0 5 1 】

典型的には、食料品は、甘味化量の本発明の修飾ステピオールグリコシドと、少なくとも 1 つの他の食品成分とを含む。本明細書で使用される場合、「食品成分」という用語は、風味、栄養、色、増量剤、食感または他の口当たり、安定性、酸味度、増粘性、固化防止性等またはこれらの任意の 2 つ以上の組み合わせを提供するのに適した任意の食用物質を意味する。以下に更に論じるように、本明細書で開示する新規な食品に使用するのに適した典型的な食品成分には、穀物成分、炭酸または非炭酸水、他の甘味料、例えば、甘味化量の少なくとも 1 つの栄養甘味料、風味料、酸味料、着色料、増量剤などを含む。特定の例示的な ( すなわち、非限定的な ) 実施形態では、食品は、一回分の量で包装される。

50

本開示のこの態様の食品には、例えば、固形食品、ゲル、飲料などが含まれる。

【0052】

適切な甘味料および甘味増強剤の例には、スクロース、フルクトース、グルコース、高フルクトースコーンシロップ、コーンシロップ、キシロース、アラビノース、ラムノース、エリスリトール、キシリトール、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、アセスルフェームカリウム、アスパルテーム、ネオテーム、スクラロース、サッカリン、およびそれらの混合物；トリロパチン、ヘスペレチンジヒドロカルコングルコシド、ナリンジンジヒドロカルコン、モグロシドVを含むモグロシド、羅漢郭抽出物、ルブソシド、ルブス抽出物、グリシフィリン、イソモグロシドV、モグロシドIV、シアメノシドI、ネオモグロシド、ムクロジオシドIib (mukurozioside Iib)、(+)-ヘルナンズルチン、4'-ヒドロキシヘルナンズルチン、バイユノシド、フロミソシドI、ブリオドコシド、ブリオシドブリオノシド、アブルソシドA~E、シクロカリオシドA、シクロカリオシドI、アルビジアサポニンA-E、グリチルリチン、アラボグリシルリチン、ペリアアンドリン1-V、プテロカリオシドAおよびB、オスラジン、ポリポドシドAおよびB、テロスモシドA8-18、フィロズルチン、ハンキオシドE (Huangqiioside E)ネオアスチルビン (neoaustilbin)、モナチン、3-アセトキシ-5,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシフラバノン、2R,3R-(+)-3-アセトキシ-5,7,4'-トリヒドロキシフラバノン、(2R,3R)-ジヒドロケルセチン3-O-アセテート、ジヒドロケルセチン3-O-アセテート4-メチルエーテル、ブラゼイン、クルクリン、マビンリン、モネリン、ネオクリン、ペンタジン、タウマチン、およびそれらの組み合わせを含む。上記の化合物のいくつかは、甘味増強剤および甘味料として知られている。甘味増強剤として使用される場合、それらは通常、甘味検出閾値未満で使用される。

【0053】

飲料には、例えば、ジュース飲料（例えば、1つ以上の果汁および/または1つ以上の野菜ジュースを含む飲料）、水分補給飲料、炭酸飲料(CSD)、冷凍飲料、凍結炭酸飲料、ダイエットまたは他の減カロリー飲料などを含む。これらのカテゴリー間に重複があることは、当業者には認識されるであろう。本明細書で使用される場合、「減カロリー飲料」とは、フルカロリーバージョン（通常は以前市販されていた完全カロリーバージョン）と比較して飲料を提供する8オンスあたり少なくとも25%のカロリーを減少させた飲料を意味し、（例えば、甘味料の実質的に全てが、スクロース、HFCSなどの栄養甘味料に由来する）。少なくとも特定の実施形態では、低カロリー飲料は、完全カロリーバージョンと比較して提供する8オンスあたり約50%のカロリーを減少させる。本明細書で使用する「低カロリー飲料」は、飲料と比較して提供する8オンスあたり40カロリー未満である。本明細書で使用される場合、「ゼロカロリー」または「ダイエット」は、1回の提供あたり、例えば、飲料の8オンスあたり5カロリー未満を意味する。

【0054】

別の態様によれば、水、および少なくとも1つの酸を含む酸味料構成成分、少なくとも1つの風味成分を含む風味構成成分、甘味化量の修飾ステビオールグルコシドを含む甘味料構成成分、ならびに任意で甘味化量の1つ以上の他の甘味料を含む飲料製品が提供される。この態様による飲料製品の特定の例示的な実施形態では、飲料製品は、3.0より高く4.0より低いpHを有するすぐに飲める飲料である。そのようなすぐに飲める飲料は、例えば、水分補給飲料（スポーツ飲料とも呼ばれ、電解質を加えたもの）であってもよい。他の例示的な実施形態では、すぐに飲める飲料は、炭酸飲料、例えば減カロリーまたはダイエットコーラ飲料である。この態様による飲料製品の特定の例示的な実施形態では、飲料製品は、例えば、炭酸水又は非炭酸水で1:5の割合で希釈してすぐに飲める飲料を製造するのに適したシロップである。

【0055】

特定の実施形態によれば、本発明の修飾ステビオールグリコシドは、消耗品の全甘味料の少なくとも10%を提供し、例えば、ダイエットコーラシロップ、すぐに飲めるダイエ

10

20

30

40

50

ットコーラ飲料、別の飲料製品、または本開示に従った別の食品を提供する。特定の実施形態によれば、それは全甘味料の少なくとも20%、または全甘味料の少なくとも30%、または全甘味料の少なくとも40%、または全甘味料の少なくとも半分、または全甘味料の少なくとも60%または少なくとも70%、または全甘味料の少なくとも80%、または全甘味料の少なくとも90%を提供する。任意に、それぞれの追加の甘味料成分は有機甘味料である。任意に、それぞれの甘味料成分は天然甘味料である。任意に、それぞれの甘味料成分はステビオールグリコシドである。任意に、それぞれの成分は、有機および/または天然の成分であり、従って、カロリー低減(例えば、ダイエット)炭酸コーラ飲料製品は対応して有機および/または天然の飲料製品である。

【0056】

10

好ましくは、消耗品は、図5に示すものから選択される少なくとも1つの修飾レバウジオシドAを含む。

【0057】

例えば、飲料は、約30ppm~約750ppm(例えば、約50ppm~350ppm)の濃度の修飾レバウジオシドAを含み得る。しかしながら、追加される量は、主に所望の甘味のレベルに依存し、他の成分の存在に依存し得る。例えば、果汁は糖を含み、したがって甘味のレベルに寄与する。一実施形態では、修飾レバウジオシドAは、風味付けされた飲料に追加される唯一の甘味料である。別の実施形態において、修飾レバウジオシドAは、他の甘味料および/または甘味増強剤と組み合わせることができる。好ましい実施形態において、修飾レバウジオシドAは、モグロシドVのようなモグロシドと組み合わせ

20

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】ステビオシド、レバウジオシドAおよびB、およびステビオールピオシドの化学構造。[Glc1]など、NMR割り当てのためのグルコース残基の表示。

【図2】0.12mg/mLの精製酵素を用いたトランスグルコシル化(黒棒)および加水分解(斜線棒)活性に対するレバウジオシドAおよびスクロース濃度の影響:(A)GTF180-N、(B)GTF180-N変異体S1137Yおよび(C)GTF180-N変異体Q1140E。

【図3】10U/mL GTF180-N(WT)、変異体S1137Y、ならびに50mMレバウジオシドA(\*)および1Mスクロース(\*\*=RebAG1)を有する変異体Q1140Eの4時間のインキュベーションのNP-HP LC生成物プロファイル。

30

【図4】10U/mLの酵素を用いたレバウジオシドA利用(破線)およびグルコシル化(実線)によるRebAG1形成の時間経過:(A)GTF180-N、(B)GTF180-N変異体S1137Yおよび(C)GTF180-N変異体Q1140Eはそれぞれ、55%、73%および96%の転換率を示した。

【図5(A)】GTF180-Nおよび変異体GTF180-NS1137YおよびGTF180-NQ1140Eによって産生される修飾レバウジオシドAグルコシドの構造:(A)RebAG1=13-( { -D-グルコピラノシル-(12)-[ -D-グルコピラノシル-(13)-] -D-グルコピラノシル } オキシ)エント-カウル-16-エン-19-酸 -D-グルコピラノシル-(16)- -D-グルコピラノシルエステル

40

【図5(B)】GTF180-Nおよび変異体GTF180-NS1137YおよびGTF180-NQ1140Eによって産生される修飾レバウジオシドAグルコシドの構造:(B)13-( { -D-グルコピラノシル-(12)-[ -D-グルコピラノシル-(13)-] -D-グルコピラノシル } オキシ)エント-カウル-16-エン-19-酸 -D-グルコピラノシル-(16)- -D-グルコピラノシル-(16)- -D-グルコピラノシルエステル

【図5(C)】GTF180-Nおよび変異体GTF180-NS1137YおよびGTF180-NQ1140Eによって産生される修飾レバウジオシドAグルコシドの

50

構造：(C)13 - ( { - D - グルコピラノシル - ( 1 2 ) - [ - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ) エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 6 ) - - D - グルコピラノシルエステル

【図5(D)】334KでD<sub>2</sub>Oに記録されたGTF180 - N(a)および変異体Q1140E(b)およびS1137Y(c)のRebAG1生成物の500MHz <sup>1</sup>H NMRスペクトル。

【図6】50mMステビオシドおよび50mMレバウジオシドAと100mMスクロースとの1時間のインキュベーションで、20U/mlのQ1140E有りおよび無しで、1MのNaOHによるアルカリ鹸化の前後で得られた生成物のTLC分析。

【図7】いくつかの甘味料の官能評価(n=12)：ステビオシド(250mg/L)、レバウジオシドA(300mg/L)、RebAG1(350mg/mL)、およびスクロース(60g/L)。評価された味覚属性は、甘味(ハッチングされた棒)および苦味(実線)であった。スコア0=甘くない/苦くない、スコア5=非常に甘い/非常に苦い。

【図8】GTF180 - N V(Q)、GTF180 - N VQ1140アミノ酸置換変異体Q1140G/S/I/V/W/D/M/C/E/L/K/T/P/R/F/N/Y、またはGTF180 - NQ1140E(E\*)での50mMのレバウジオシドAおよび200mMスクロースの2時間のインキュベーションで得られた生成物のTLC分析。

【図9(A)】ラクトバチルス・ロイテリ菌(Lactobacillus reuteri)180由来のグルカンスクララーゼGTF180のアミノ酸配列。パネル(A)全長タンパク質。

【図9(B)】ラクトバチルス・ロイテリ菌(Lactobacillus reuteri)180由来のグルカンスクララーゼGTF180のアミノ酸配列。パネル(B)N末端切断型変異体GTF180 - N。

【図9(C)】ラクトバチルス・ロイテリ菌(Lactobacillus reuteri)180由来のグルカンスクララーゼGTF180のアミノ酸配列。パネル(C)N末端切断型およびドメインV切断型変異体GTF180 - N V。

【発明を実施するための形態】

【0059】

実験セクション

以下のセクションは、ラクトバチルス・ロイテリ菌(Lactobacillus reuteri)株180のグルカンスクララーゼGTF180 - Nおよびその誘導された単一アミノ酸置換変異体が、-グルコシル化レバウジオシドAに有利に使用されることを例示する。GTF180 - Nおよび誘導された変異体酵素は、唾液中に存在するデンプン分解酵素による加水分解に対して耐性である(16)および(13)グリコシド結合を導入して、C-19位に特異的にレバウジオシドAをグルコシル化する。いくつかのGTF180 - N変異体は、GTF180 - NよりもレバウジオシドAに対してはるかに高いトランスグルコシル化活性を示した。興味深いことに、1つの変異体Q1140Eは、レバウジオシドAのほぼ100%の変換を示し、レバウジオシドAのC-19位でほとんどが単一の(16)-グルコースに結合した。

【0060】

生成された新規レバウジオシドAグルコシドは、非常に興味深く、C-19-結合グルコースにおいて特異的に1つおよび2つの(16)結合グルコース単位を運ぶ。モノ-グルコシル化レバウジオシドA生成物、RebAG1は、レバウジオシドAと比較して、より天然の甘味を増大させ、かつ苦味を減少させる。本発明のこれらの改良された新規ステビオールグリコシドは、機能性食品成分として非常に興味深い。

【0061】

材料および方法

## ステビオールグリコシド基質

レバウジオシドA(2)およびステビオシド(1)はSigma Aldrichから購入した。

## 【0062】

## グルカンスクラーゼ酵素

全てのグルカンスクラーゼおよびフルクタンスクラーゼ酵素は、Meng et al (2014)に記載されているように製造され、Kralj et al (2004b)に記載されているように精製された。GTF180-Nは、117kDaのGTF180全長タンパク質のN末端切断型(741残基)断片である(Kralj et al, 2004a)。GTF180酵素のアミノ酸794-1636からなる切断型変異体GTF180-NVの構築物は、Meng et al. (2015a)に記載され、GTF180-N変異体酵素はvan Leeuwen et al. (2009)、Meng et al. (2015a)、及びMeng et al. (2015b)によって生成された。切断型変異体GTF180-NVにおけるアミノ酸置換は、Meng et al. (2015b)に記載されているように生成された。

10

## 【0063】

## 酵素活性アッセイ

酵素活性アッセイは、25mM酢酸ナトリウム(pH4.7); 1mMのCaCl<sub>2</sub>; 37で0.12mg/mLの精製したGTF180-N酵素またはGTF180-N変異体酵素中の50mMレバウジオシドAの有無にかかわらず、100mMおよび1000mMスクロースで実施した。100μLのサンプルを30秒ごとに4分間採取し、20μLの1000mMであるNaOHと共に30分間インキュベートすることにより反応を直ちに停止させた。前述のように、不活性化サンプルを脱イオン水で2倍に希釈し、ヘキソキナーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ/ホスホグルコースイソメラーゼアッセイ(Roche)を用いたNADPの還元をモニターすることにより、10μLの希釈サンプルからグルコースおよびフルクトース濃度を酵素的に測定した(Mayer 1987)。スクロースからのグルコースおよびフルクトースの放出の定量的決定は、グルカンスクラーゼ酵素の活性の推定を可能にした(van Geel-Schutten et al. 1999)。フルクトース放出は、全酵素活性に対応し、グルコース放出は、加水分解活性に対応する。トランスグリコシル化活性は、全活性から加水分解活性を差し引くことによって得ることができる。1単位(U)の酵素は、25mMの酢酸ナトリウム(pH4.7)、1mMのCaCl<sub>2</sub>、および37での1000mMのスクロースを含む反応混合物中で1分間当たり1μmolの単糖を生成するのに必要な酵素の量として定義される。

20

30

## 【0064】

## ステビオールグリコシドの酵素的グリコシル化

インキュベーション反応は、25mMの酢酸ナトリウム(pH4.7)、1mMのCaCl<sub>2</sub>、50~1000mMのスクロース、50~100mMのステビオールグリコシド、および2~30U/mLの精製したGTF180-N酵素またはGTF180-N変異体酵素中で37で15分~24時間行った。熱不活性化(100で15分間)により反応を停止させた。不活性化サンプルから250μLを1000mLの10mMであるカテコール(内部標準)と混合し、続いてStrata-X 33u Polymeric Reversed Phaseカラム(Phenomenex)を用いた固相抽出によって精製した。HPLC分析のために、20μLの精製サンプルを、Luna10μmNH<sub>2</sub>クロマトグラフィーカラム(250mmx4.6mm; Phenomenex)に注入した。反応構成成分を勾配溶出条件下で1mL/分の流速で分離し、70%溶媒Aの2分間のアイソクラティックステップから開始し、続いて9分間にわたる70~55%溶媒Aの直線勾配(溶媒A=アセトニトリル; 溶媒B=0.025%酢酸)を行った。レバウジオシドAおよびモノ- - グルコシル化レバウジオシドA生成物の濃度は、対応する1.56~50mMの校正曲線を用いてNP-HPLCで測定した。全てのデータは、

40

50

カテコールを内部標準として標準化した。反応の標準偏差は5%未満であった。Enduranceオートサンプラー(Spark Holland, The Netherlands)を備えたUltimate 3000クロマトグラフィーシステム(ThermoFischer Scientific, Amsterdam, the Netherlands)上で全てのNP-HPLC分析を実施した。

#### 【0065】

- グルコシル化レバウジオシドA生成物の定量的合成

GTF180-Nおよびその誘導された変異体を用いた - グルコシル化レバウジオシドA生成物の定量的合成のために、5 mL、25 mMの酢酸ナトリウム(pH 4.7)、1 mMのCaCl<sub>2</sub>、50 mMのステビオールグリコシド中で、合計2,000 mMのスクロースに対する、1000 mM当量のスクロース供与体の2つのバッチ(t = 0および3時間)と共に、37 °Cで10 U/mLの酵素を用いて24時間インキュベートした。Strata-X 33uポリマー逆相カラム(Phenomenex)を用いた固相抽出によって、インキュベーション混合物から生成物を精製した。生成物をLuna 10 μm NH<sub>2</sub>セミ分取クロマトグラフィーカラム(250 mm x 10 mm、Phenomenex)上で分離し、流速4.6 mL/分で手動で回収し、80%溶媒Aの2分間のアイソクラティックステップから開始して、80分~50%の溶媒Aの38分にわたる直線勾配(溶媒A = アセトニトリル; 溶媒B = 0.025%酢酸)が続いた。集めた画分の溶媒を窒素ガスの気流下で蒸発させ、乾燥した材料を脱イオン水に溶解した。

#### 【0066】

薄層クロマトグラフィー

n-ブタノール:酢酸:水 = 2:1:1で展開したTLCシート(Merck Kieselgel 60 F254、20 x 20 cm)上にサンプルをスポットした。スポットは、オルシノール/硫酸染色によって視覚化し、標準化合物の同時分析と比較した。

#### 【0067】

アルカリ鹼化

19-O結合グリコシル部分を放出させるために、4 mgの各ステビオールグリコシド生成物を1 MのNaOH(1 mL)に溶解し、80 °Cで2.5時間加熱した。

#### 【0068】

質量分析

窒素レーザー(337 nm、3 nsのパルス幅)を備えたAxima(商標)質量分析計(Shimadzu Kratos Inc., Manchester, UK)を用いて、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF-MS)実験を行った。陽イオンモードスペクトルは、5000 FWHMの分解能および450 nsの遅延抽出で反射モードを使用して記録した。加速電圧は19 kVであり、グリッド電圧は75.2%であった。ミラー電圧比は1.12であり、取得質量範囲は200-6000 Daであった。マトリックス溶液として70%ACN中の1 μL、10%の2,5-ジヒドロキシ安息香酸と1 μLのサンプル溶液を混合することによってサンプルを調製した。

#### 【0069】

NMR分光法

解像度が向上した1D/2D 500 MHz <sup>1</sup>H NMRスペクトルは、Bruker DRX-500スペクトロメータ(Bijvoet Center, Department of NMR Spectroscopy, Utrecht University)のD<sub>2</sub>Oで334 Kのプローブ温度で記録した。データ収集および処理はBruker Topspin 2.1で行った。分析前に、中間凍結乾燥したD<sub>2</sub>O(99.9原子%D、Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA)中でサンプルを2回交換し、次いで0.6 mLのD<sub>2</sub>Oに溶解した。重水素水信号(4.40 ppmでのHOD)の抑制は、1D NMR実験にWEFT(水除去フーリエ変換)パルスシーケンスを適用し、2D実験で緩和遅延の

10

20

30

40

50

間に1秒の事前飽和を適用することによって達成された。2D TOCSYスペクトルは、40~200m秒のスピンロック時間を有するMLEV-17(Levitte et al (1982))によって考案された複合パルス)混合シーケンスを使用して記録した。2D ROESYスペクトルは、200m秒の混合時間で標準Bruker XWINNMRソフトウェアを用いて記録した。搬送周波数は、スピンロック中のTOCSY転送を最小にするために、スペクトルのダウンフィールドエッジで設定した。<sup>1</sup>H FIDの取得中にデカップリングすることなく、自然の豊富な2D <sup>1</sup>3C-<sup>1</sup>H HSQC実験(<sup>1</sup>H周波数500.0821MHz、<sup>1</sup>3C周波数125.7552MHz)を記録した。スペクトルの分解能向上は、1Dスペクトルのローレンツ-ガウス変換、または2Dスペクトルに対して/(2.3)シフトした二乗ベル関数位相を用いた乗算によって行われ、必要に応じて5次の多項式ベースライン補正を行った。化学シフト( )は、内部アセトン(<sup>1</sup>Hでは2.225、<sup>1</sup>3Cでは31.07)を基準としてppmで表される。

10

## 【0070】

レバウジオシドAの新規 - グルコシル化生成物の官能評価

レバウジオシドA(350mg/L)の新規 - グルコシル化生成物をスクロース(60g/L)、レバウジオシドA(300mg/L)、ステビオシド(250mg/L)と比較した味覚の評価を行った。ブラインドテストでは、ステビオールグリコシドの苦い後味を知覚することができた12人の試験者に、0から5の尺度で甘味と苦味を評価するように要求した。ここで、0は甘味/苦味を示さない、5は非常に甘い/非常に苦いことを示す。

20

## 【0071】

結果

レバウジオシドAの - グルコシル化のためのグルカンおよびフルクタンサクラゼ酵素のスクリーニング

主にラクトバチルス・ロイテリ菌(Lactobacillus reuteri)由来の100以上のグルカンおよびフルクタンスクラーゼ野生型および変異体酵素を、レバウジオシドA - グルコシル化についてスクリーニングした。このために、酵素を50mMのレバウジオシドA(図1)および1000mMのスクロース中で3時間インキュベートした。反応混合物のHPLCおよびTLC分析は、GTF180-N酵素およびGTF180-Nの変異体酵素のみがレバウジオシドAをグリコシル化し得ることを示した(表1)。興味深いことに、移行状態安定化残基D1136(van Leeuwen et al. 2009)に近い単一のアミノ酸置換である2つの単一のGTF180-N変異体S1137YおよびQ1140Eは、レバウジオシドAに対するGTF180-Nよりも優れたトランスグルコシル化活性を示した。また、GTF180-N変異体L981AおよびW1065L(Meng et al. 2015b)は、レバウジオシドA(表1)を - グルコシル化することができたが、重合(すなわち、スクロースからのオリゴ糖およびグルカン形成)活性はほとんど示されなかった(データを示していない)。これは、下流の処理、単糖、二糖、オリゴ糖およびグルカンからの - グルコシル化レバウジオシドA生成物の精製の間の明確な利点である。 - グルカン合成を排除することにより、最も重要な副反応である、より高いグリコシル化収率がレバウジオシドAについて得られた。より低いスクロース濃度(200mM)では、これらの変異体は、GTF180-Nならびに変異体S1137YおよびQ1140EよりもレバウジオシドAと同等またはそれより高いトランスグルコシル化活性を有していた(データを示していない)。

30

40

## 【0072】

【表 1】

表 1.様々なラクトバチルス (Lactobacillus) 株からのグルカンスクラーゼおよびフルクタンスクラーゼ酵素のレバウジオシド A α-グリコシル化潜在性の概要

酵素	変異体	→1)Glp (→	→3)Glp (→	→4)Glp (→	→6)Glp (→	→3,6)Glp (→	RebA の活性
GTF180-ΔN <sup>a</sup>	N末端切断型 GTF180 <sup>a</sup> (AY697430); Met-Gly-742-1772-His <sub>6</sub>	12	24		52	12	+
GTF180-ΔNAV <sup>b</sup>	GTF180-ΔNのドメインV欠失変異体; Met-794-1636-His <sub>6</sub>	12	23		52	13	+
GTF180-ΔN-PNNS <sup>c</sup>	GTF180-ΔNの三重アミノ酸変異体 (V1027P; S1137N; A1139S)	18	10	12	42	18	+
GTF180-ΔN-SNAE <sup>d</sup>	GTF180-ΔNの単一アミノ酸変異体 (Q1140E)	12	16	2	52	18	+++++
GTF180-ΔN-SNAA <sup>d</sup>	GTF180-ΔNの単一アミノ酸変異体 (Q1140A)	11	6		69	14	+/-
GTF180-ΔN-SNAH <sup>d</sup>	GTF180-ΔNの単一アミノ酸変異体 (Q1140H)	8	8		76	8	+/-
GTF180-ΔN-NNA <sup>d</sup>	GTF180-ΔNの単一アミノ酸変異体 (S1137N)	12	26	3	47	12	++
GTF180-ΔN-YDA <sup>d</sup>	GTF180-ΔNの二重アミノ酸変異体 (S1137Y;N1138D)	19	23	7	31	20	++++
GTF180-ΔN-YNA <sup>d</sup>	GTF180-ΔNの単一アミノ酸変異体 (S1137Y)	18	21	4	39	18	++++
GTF180-ΔN-SDA <sup>d</sup>	GTF180-ΔNの単一アミノ酸変異体 (N1138D)	10	24		56	10	+
GTF180-ΔN-XM1 <sup>e</sup>	GTF180-ΔNの単一アミノ酸変異体 (L981A)						++
GTF180-ΔN-XM2 <sup>e</sup>	GTF180-ΔNの単一アミノ酸変異体 (W1065L)						++
GTFA-ΔN <sup>f</sup>	N末端切断型 GTFA (AX306822) <sup>f</sup>	9		46	34	12 <sup>***</sup>	- <sup>****</sup>
GTFA-ΔN N1134S <sup>h</sup>	GTFA-ΔNの単一アミノ酸変異体 (N1134S)	8		12	76	4 <sup>***</sup>	-
GTFA-ΔN N1134E <sup>h</sup>	GTFA-ΔNの単一アミノ酸変異体 (N1134E)	8		49	36	7 <sup>***</sup>	-
GTFA-ΔN N1134A <sup>h</sup>	GTFA-ΔNの単一アミノ酸変異体 (N1134A)	13		25	49	13 <sup>***</sup>	-
GTFA-ΔN NEV <sup>g</sup>	二重アミノ酸変異体 (N1135E; S1136V)	10		49	29	12 <sup>***</sup>	-
GTFB <sup>a</sup>	野生型 (AY697435)						-
GTFMLI <sup>a</sup>	N末端切断型 GTFMLI (AY697431) <sup>a</sup>		47		10	26 <sup>***</sup>	-
GTFO <sup>a</sup>	N末端切断型 GTFO (AY911856) <sup>j</sup>			67	13	15	-
Inu <sup>j</sup>	N末端切断型 Inu <sup>j</sup> フラクタンスクラーゼ						-
InuGA-RM <sup>k</sup>	野生型フラクタンスクラーゼ						-
InuGB-R <sup>k</sup>	野生型フラクタンスクラーゼ						-
LevG-R <sup>k</sup>	野生型フラクタンスクラーゼ						-

<sup>a</sup>Kralj et al (2004a); <sup>b</sup>Meng et al (2015a); <sup>c</sup>Van Leeuwen et al (2008); <sup>d</sup>Van Leeuwen et al (2009); <sup>e</sup>Meng et al (2015b); <sup>f</sup>Kralj et al (2004b); <sup>g</sup>Kralj et al (2002); <sup>h</sup>Kralj et al (2006);

<sup>i</sup>Kralj et al (2005); <sup>j</sup>Anwar et al (2008); <sup>k</sup>Anwar et al (2010); \* 結合分布; \*\* Genbank アクセッション番号; \*\*\* →4,6)Glp (→; \*\*\*\* レバウジオシド A (RebA) の活性なし

10

20

【 0 0 7 3 】

レバウジオシド A のグルコシル化に対する反応条件を最適化するために、G T F 1 8 0 - N ならびに変異体 S 1 1 3 7 Y および Q 1 1 4 0 E のトランスグルコシル化活性に対するレバウジオシド A およびスクロースの効果を測定した。このために、5 0 m M レバウジオシド A の有無にかかわらず、1 0 0 m M および 1 0 0 0 m M のスクロースで酵素活性アッセイを実施した。3 つの酵素は全て、低スクロース濃度でより加水分解した ( 図 2 ) 。両方の変異体酵素は 1 0 0 m M スクロースでほぼ完全に加水分解した。しかし、5 0 m M レバウジオシド A を反応に添加した場合、またはスクロース濃度を 1 0 0 0 m M に増加させた場合、3 つの酵素全てのトランスグルコシル化活性が顕著に増加し、1 M のスクロースおよび 5 0 m M のレバウジオシド A で最高の全活性および最も高いトランスグルコシル化対加水分解比を示した。これらの反応条件は、G T F 1 8 0 - N ならびに変異体 S 1 1 3 7 Y および Q 1 1 4 0 E によるレバウジオシド A の α-グルコシル化をより詳細に追跡するために用いられた。

30

【 0 0 7 4 】

5 0 m M のレバウジオシド A 、 1 0 0 0 m M のスクロース、および 1 0 U / m L 酵素を使用した場合、G T F 1 8 0 - N による約 5 5 % と比較して、変異体 S 1 1 3 7 Y および Q 1 1 4 0 E はそれぞれ約 7 3 % および約 9 6 % のレバウジオシド A をグルコシル化した ( 図 4 ) 。驚くべきことに、変異体 Q 1 1 4 0 E は、主にモノグルコシル化レバウジオシド A ( R e b A G 1 ) を産生し、5 0 m M のレバウジオシド A から約 3 5 m M の R e b A G 1 を産生した ( 図 3 および 図 4 ) 。変異体 S 1 1 3 7 Y は、G T F 1 8 0 - N 酵素 ( 約 1 3 m M ) と同様の量の R e b A G 1 を産生したが ( 図 3 ) 、より多い量の複合グリコシドを合成した ( 図 3 ) 。

40

【 0 0 7 5 】

試験した全てのグルカンおよびフルクタンスクラーゼ酵素から、変異体 G T F 1 8 0 - N Q 1 1 4 0 E は最も高いレバウジオシド A グルコシル化活性を示し、主にレバウジオシド A のモノグルコシル化を示した。したがって、変異体 Q 1 1 4 0 E / A / H に加えて、変異体 G T F 1 8 0 - N V において位置 Q 1 1 4 0 における更なるアミノ酸置換も生じ、レバウジオシド A グルコシル化について試験された ( 図 8 ) 。このために、1 m g / m l の酵素を緩衝液 ( 2 5 m M の酢酸ナトリウム ( p H 4 . 7 ) 、 1 m M の C a C l 2 ) 中の 5 0 m M のレバウジオシド A および 2 0 0 m M のスクロースと共に 3 7 ° C で 2 時間

50

インキュベートした。インキュベーション混合物をTLCで分析した(図8)。これらの条件下で、いくつかのQ1140置換変異体(例えばQ1140F/N/Yの場合)は、変異体Q1140Eよりも高いレバウジオシドAグルコシル化を示したが、後者はまだ最高のモノ-グルコシル化収率を有していた。いくつかの変異体(例えば、Q1140D)は、レバウジオシドAグルコシル化に対してわずかに負の効果を示した。興味深いことに、変異体Q1140Rはスクロースに対してほとんど活性を示さなかったが、レバウジオシドAのグルコシル化は変異体の影響をほとんど受けなかった。スクロースは主にレバウジオシドAのグルコシル化に使用され、オリゴ糖形成などの副反応には使用されなかったようである。

【0076】

GTF180-NならびにGTF180-N変異体S1137YおよびQ1140Eによって産生されるレバウジオシドAグルコシドの - グルコシル化生成物の単離および特徴付け

レバウジオシドA(図1)の分子構造を見ると、総14個の遊離ヒドロキシル基を有する4つのGlc p残基(Glc1、Glc2、Glc3およびGlc4)があり、これらはトランスグルコシル化の受容体として作用することができる。

【0077】

GTF180-Nは、スクロースをオリゴ糖および多糖に変換し、(13)-および(16)-結合におけるGlc p残基のトランスグルコシル化を触媒し(van Leeuwen et al., 2008)、Glc残基の最初の結合のためにレバウジオシドAに存在する3つの潜在的(13)部位および4つの潜在的(16)部位が存在する。

【0078】

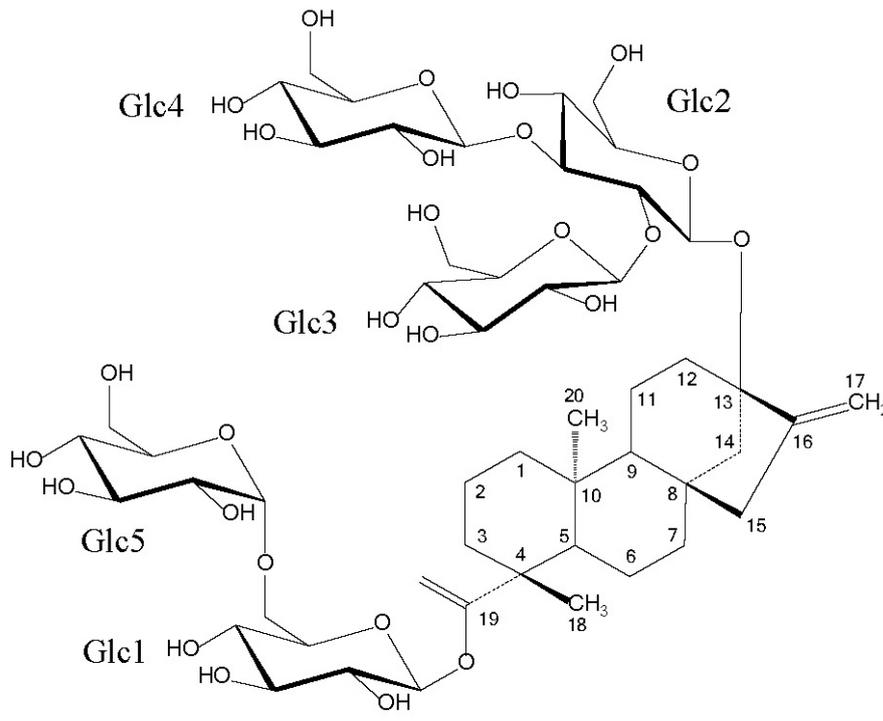
構造的な特徴付けのレバウジオシドAグルコシドの - グルコシル化生成物を単離するために、50mMのレバウジオシドAおよび1000mMのスクロースを含む10U/mL酵素と共にインキュベーションを行った。3時間後、1000mMの過剰のスクロースを反応混合物に添加し、更に21時間インキュベーションした。セミ分取NP-HPLCを用いて反応混合物からグルコシドを単離した。興味深いことに、モノ- - グルコシル化生成物のNMR構造分析およびメチル化分析は、C-19結合グルコースにおいてのみ、GTF180-Nならびに変異体S1137YおよびQ1140Eが特異的にレバウジオシドAをグルコシル化し、(16)結合グルコース(100%)を結合して、RebAG1を産生する(図5Aも参照のこと)ことを示した。

10

20

30

## 【化1】



RebAG1

## 【0079】

GTF180-Nおよび変異体S1137Yのジ-グルコシル化レバウジオシドA生成物は、(13)結合グルコース(約75%) (図5C)または別の(16)結合グルコース(約25%)によるRebAG1の構造の両線状伸長であった(図5B)。図5Dのパネル(a)、(b)および(c)は、それぞれGTF180-N、GTF180-NQ1140EおよびGTF180-NS1137Yによって産生されたRebAG1の500MHz  $^1\text{H}$  NMRスペクトルを示す。

## 【0080】

レバウジオシドAのC-19-グルコシル部分のみに生じるGTF180-Nによるトランスグルコシル化による過剰のGlc残基の導入が起きたことを確認するために、単離された画分をアルカリ鹼化に付して、19-カルボキシル-グルコシルエステル結合を特異的に加水分解した(図1および図6)。TLC、MALDI-TOF-MS ( $m/z$  826  $[M+H]^+$ ) およびNMR分光法により、同一の生成物をレバウジオシドAおよびレバウジオシドAの-グルコシル化生成物から得た。ここで、レバウジオシドAは、C-19において完全なグルコシル部分を欠いている。得られた構造体は、レバウジオシドB(3) (図1)として知られている。

## 【0081】

GTF180-N変異体Q1140EによるステビオシドのC-19位特異的-グルコシル化

商業的目的のために、全ステビオールグリコシド葉抽出物の甘味を改善し、苦味を減少させることが望ましい場合がある。ステビオシド(約5~10% w/w 乾燥葉)は最も豊富で最も苦味のあるステビオールグリコシドの1つであるため、我々の目的はステビオシドの味覚を高めることでもあった。したがって、GTF180-Nおよび受容体分子としてのステビオシドを有するその誘導された置換変異体を用いたグルコシル化反応も行った。3つの酵素は全てステビオシドを-グルコシル化することもできた。受容体分子としてのレバウジオシドAを観察すると、変異体Q1140Eはステビオシドを主に単一のモノ-グルコシル化生成物に変換した(データ示さず)。GTF180-N変異体

10

20

30

40

50

Q1140EがステビオシドをC-19位で特異的にグルコシル化するか否かを決定するために、Q1140Eによって産生されたステビオールグルコシドを、1MのNaOHで19-カルボキシル-グルコシルエステル結合をアルカリ鹸化して、C-19部分を特異的に除去した。Q1140Eステビオールグルコシドのアルカリ鹸化によりステビオールピオシド(4)(図1)(すなわち、ステビオシドからC-19部分を除いた)が得られると、グルコシル化はステビオシドのC-19位で特異的に起こった。TLCプレート上で、複数のステビオールグリコシドがQ1140Eを有するステビオシドの1時間のインキュベーションで視認された(図6)。しかし、インキュベーション混合物を1MのNaOHで処理し、ステビオシド陽性対照の鹸化後に生成した生成物と同じ高さで移動した場合には、ただ1つのスポットしか観察されなかった。MALDI-TOF分析により、665.59の分子量が検出され、これはステビオールピオシドのナトリウム付加物に対応する。これらの結果は、GTF180-NQ1140EがまたC-19結合グルコシル部分においてステビオシドを特異的にグルコシル化することを示している。

10

#### 【0082】

レバウジオシドAの新規合成 - グルコシル化生成物の味覚評価

レバウジオシドAの19-O-グルコシル部分における(16)グルコシル化が甘味および苦味に及ぼす影響を決定するために、レバウジオシドAの新規グルコシル化生成物の1つである、RebAG1をレバウジオシドAと比較して味覚の評価を行った。このために、ブラインドテストでは、ステビオールグリコシドの苦い後味を知覚することができた12人の試験者に、0から5の尺度で甘味と苦味を評価するように要求した。ここで、0は甘味/苦味を示さない、5は非常に甘い/非常に苦いことを示す。新規RebAG1がレバウジオシドAと比較してより自然な甘味を増大させかつ苦味を減少させたことを示す明確な傾向が観察された(図7)。

20

#### 【0083】

参考文献

Brahmachari G, Mandal LC, Roy R, Mondal S, Brahmachari AK (2011) Stevioside and related compounds - molecules of pharmaceutical promise: a critical overview. Arch Pharm (Weinheim) 344:5-19. doi: 10.1002/ardp.201000181

30

#### 【0084】

Brandle JE, Starratt AN, Gijzen M (1998) Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties. Can J plant Sci 78:527-536.

#### 【0085】

Chatsudthipong V, Muanprasat C (2009) Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. Pharmacol Ther 121:41-54. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.09.007

40

#### 【0086】

Ciucanu I, Kerek F (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydr Polym 131:209-217.

#### 【0087】

Darise M, Mizutani K, Kasai R, Tanaka O (1984) Enzymic transglucosylation of ru

50

busoside and the structure - sweetness relationship of steviol - bisglycosides. Agric Biol Chem 10:2483 - 2488. doi: 10.1080/00021369.1984.10866520

【0088】

DuBois GE, Dietrich PS, Lee JF, McGarrugh GV, Stephenson RA (1981) Diterpenoid sweeteners. Synthesis and sensory evaluation of stevioside analogues nondegradable to steviol. J Med Chem 24:1269 - 71. 10

【0089】

DuBois GE, Stephenson RA (1985) Diterpenoid sweeteners. Synthesis and sensory evaluation of stevioside analogues with improved organoleptic properties. J Med Chem 28:93 - 8.

【0090】

Fukunaga Y, Miyata T, Nakayasu N, Mizutani K, Kasai R, Tanaka O (1989) Enzymic transglucosylation products of stevioside: Separation and sweetness - evaluation. Agric Biol Chem 53:1603 - 1607. doi: 10.1271/bbb1961.53.1603 20

【0091】

Geuns J (2003) Stevioside. Phytochemistry 64:913 - 921. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00426-6

【0092】

Goyal SK, Samsher, Goyal RK (2010) Stevia (Stevia rebaudiana) a bio-sweetener: a review. Int J Food Sci Nutr 61:1 - 10. doi: 10.3109/09637480903193049 30

【0093】

Hellfritsch C, Brockho A, Sta F, Meyerhof W, Hofmann T (2012) Human psychometric and taste receptor responses to steviol glycosides. J Agric Food Chem 60:6782 - 6793.

【0094】

Kamerling JP, Vliegenthart JFG (1989) Clinical Biochemistry - Principles, Methods, Applications. Walter de Gruyter, Berlin 40

【0095】

Kralj S, van Geel - Schutten GH, Dondorff MMG, Kirsanovs S, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L (2004a) Glucan synthesis in the genus Lactobacillus: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six di 50

fferent strains. Microbiol 150:3681-3690  
. doi: 10.1099/mic.0.27321-0

【0096】

Kralj S, van Geel-Schutten GH, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L (2004b) Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase. Microbiol 150:2099-2112. doi: 10.1099/mic.0.27105-0

【0097】

Leemhuis H, Pijning T, Dobruchowska JM, van Leeuwen SS, Kralj S, Dijkstra BW, Dijkhuizen L (2013) Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. J Biotechnol 163:250-272. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.06.037

10

【0098】

Lemus-Mondaca R, Vega-Galvez A, Zura-Bravo L, Ah-Hen K (2012) *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chem 132:1121-1132. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140

20

【0099】

Levitt MH, Freeman R, Frenkiel T (1982) Broadband Heteronuclear Decoupling. J Magn Reson 47:328-330.

30

【0100】

Li S, Li W, Xiao Q, Xia Y (2013) Transglycosylation of stevioside to improve the edulcorant quality by lower substitution using cornstarch hydrolyzate and CGTase. Food Chem 138:2064-9. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.124

【0101】

Lobov SV, Kasai R, Ohtani K, Yamasaki K (1991) Enzymic production of sweet stevioside derivatives: Transglucosylation by glucosidases. Agric Biol Chem 55:2959-2965.

40

【0102】

Madan S, Ahmad S, Singh GN, Kohli K, Kumar Y, Singh R, Garg M (2010) *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni - A review. Indian J Nat Prod Resour 1:267-286.

【0103】

Mayer RM (1987) Dextransucrase: a gluco

50

syltransferase from *Streptococcus sanguis*. *Methods Enzymol* 138:649-661.

**【0104】**

Meng X, Dobruchowska JM, Pijning T, Gerwig GJ, Kamerling JP, Dijkhuizen L (2015a) Truncation of domain V of the multidomain glucansucrase GTF180 of *Lactobacillus reuteri* 180 heavily impairs its polysaccharide-synthesizing ability. *Appl Microbiol Biotechnol* 5885-5894. doi: 10.1007/s00253-014-6361-8

10

**【0105】**

Meng X, Dobruchowska JM, Pijning T, Lopez CA, Kamerling JP, Dijkhuizen L (2014) Residue Leu940 has a crucial role in the linkage and reaction specificity of the glucansucrase GTF180 of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* 180. *J Biol Chem* 289:32773-32782. doi: 10.1074/jbc.M114.602524

20

**【0106】**

Meng X, Pijning T, Dobruchowska JM, Gerwig GJ, Dijkhuizen L (2015b) Characterization of the functional roles of amino acid residues in acceptor binding subsite +1 in the active site of the glucansucrase GTF180 enzyme of *Lactobacillus reuteri* 180. *J Biol Chem* 290:30131-30141. doi: 10.1074/jbc.M115.687558

30

**【0107】**

Musa A, Gasmalla MAA, Miao M, Zhang T, Aboshora W, Eibaid A, Jiang B (2014) Separation and structural characterization of tri-glucosyl-stevioside. *J Acad Ind Res* 2:593-598.

**【0108】**

Prakash I, Markosyan A, Bunders C (2014) Development of Next Generation Stevia Sweetener: Rebaudioside M. *Foods* 3:162-175. doi: 10.3390/foods3010162

40

**【0109】**

Puri M, Sharma D, Tiwari AK (2011) Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnol Adv* 29:781-91. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.006

**【0110】**

Shivanna N, Naika M, Khanum F, Kaul VK (2013) Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia reba*

50

udiana. J Diabetes Complications 27:103-13. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.10.001

【0111】

van Geel-Schutten GH, Faber EJ, Smit E, Bonting K, Smith MR, Ten Brink B, Kamerling JP, Vliegenthart JFG, Dijkhuizen L (1999) Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. Appl Environ Microbiol 65:3008-3014.

10

【0112】

van Leeuwen SS, Kralj S, Eeuwema W, Gerwig GJ, Dijkhuizen L, Kamerling JP (2009) Structural characterization of bioengineered -D-Glucans produced by mutant glucansucrase GTF180 enzymes of *Lactobacillus reuteri* strain 180. Biomacromolecules 10:580-588.

20

【0113】

van Leeuwen SS, Kralj S, van Geel-Schutten IH, Gerwig GJ, Dijkhuizen L, Kamerling JP (2008) Structural analysis of the alpha-D-glucan (EPS180) produced by the *Lactobacillus reuteri* strain 180 glucansucrase GTF180 enzyme. Carbohydr Res 343:1237-50. doi: 10.1016/j.carres.2008.01.042

【0114】

Yadav SK, Guleria P (2012) Steviol glycosides from Stevia: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. Crit Rev Food Sci Nutr 52:988-98. doi: 10.1080/10408398.2010.519447

30

【0115】

Ye F, Yang R, Hua X, Shen Q, Zhao W, Zhang W (2013) Modification of stevioside using transglucosylation activity of *Bacillus amyloliquefaciens* -amylase to reduce its bitter aftertaste. LWT - Food Sci Technol 51:524-530. doi: 10.1016/j.lwt.2012.12.005

40

【0116】

(付記)

(付記1)

ステビオールグリコシド基質を、グルコース供与体としてのスクロース、およびラクトバチルス・ロイテリ菌 (*Lactobacillus reuteri*) 180株のグルカンスクラーゼGTF180、または所望のトランスグリコシル化活性を有するその変異体の存在下でインキュベートすることを含む、修飾ステビオールグリコシドを酵素的に提

50

供する方法。

【0117】

(付記2)

前記修飾ステビオールグリコシドが少なくとも1つのグルコース残基で修飾されている、付記1に記載の方法。

【0118】

(付記3)

前記修飾ステビオールグリコシドが、(16)グリコシド結合、(13)グリコシド結合、またはそれらの組み合わせを介して1つ以上のグルコースで修飾されている、付記1または2に記載の方法。

10

【0119】

(付記4)

前記修飾ステビオールグリコシドが、ステビオールグリコシドのC-13位および/またはC-19位において修飾されている、付記1から3のいずれか1つに記載の方法。

【0120】

(付記5)

前記修飾ステビオールグリコシドがC-19位においてのみ修飾される、付記4に記載の方法。

【0121】

(付記6)

前記修飾ステビオールグリコシドが、C-19位においてのみ単一のグルコース残基で修飾されている、付記5に記載の方法。

20

【0122】

(付記7)

前記ステビオールグリコシド基質がステビオールグリコシドである、付記1~6のいずれか1つに記載の方法。

【0123】

(付記8)

前記ステビオールグリコシドが、レバウジオシドA [13 - ( { - D - グルコピラノシル - (12) - [ - D - グルコピラノシル - (13) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ) エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシルエステル]、またはステビオシド (13 - { [ - D - グルコピラノシル - (12) - - D - グルコピラノシル ] オキシ } エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシルエステル) である、付記7に記載の方法。

30

【0124】

(付記9)

前記スクロースは、バッチ方式で、好ましくは最終量が少なくとも1M、より好ましくは少なくとも2Mになるまで添加される、付記1から8のいずれか1つに記載の方法。

【0125】

(付記10)

前記変異体GTF180グルカンスクラーゼは、S1137、Q1140、L981および/またはW1065においてアミノ酸置換基を含み、好ましくは前記変異体が、S1137Y、Q1140E、L981A、W1065L/E/Q/Fの変異体のうちの1つ以上を有する、付記1から9のいずれか1つに記載の方法。

40

【0126】

(付記11)

前記変異体GTF180グルカンスクラーゼは、N末端可変ドメイン断片(GTF180 - N)ならびに/またはNおよびC末端ドメインV断片(GTF180 - N V)を欠く切断型変異体である、付記1から10のいずれか1つに記載の方法。

【0127】

50

## (付記12)

前記変異体GTF180グルカンスクラーゼは、GTF180 - NQ1140E、GTF180 - NQ1140F、GTF180 - NQ1140N、GTF180 - NQ1140Y、GTF180 - NS1137Y、GTF180 - NL981A、GTF180 - NW1065L、GTF180 - NW1065E、GTF180 - NW1065QおよびGTF180 - NW1065F、GTF180 - NVQ1140E、GTF180 - NVQ1140F、GTF180 - NVQ1140N、GTF180 - NVQ1140Y、GTF180 - NVS1137Y、GTF180 - NVL981A、GTF180 - NVW1065L、GTF180 - NVW1065E、GTF180 - NVW1065QおよびGTF180 - NVW1065Fである、付記11に記載の方法。

10

## 【0128】

## (付記13)

付記1から12のいずれか1つに記載の方法によって得られる修飾ステビオールグリコシド。

## 【0129】

## (付記14)

(i) 13 - ( { - D - グルコピラノシル - ( 1 2 ) - [ - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ ) エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシル - ( 1 6 ) - - D - グルコピラノシルエステル、

20

(ii) 13 - ( { - D - グルコピラノシル - ( 1 2 ) - [ - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ ) エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシル - ( 1 6 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 6 ) - - D - グルコピラノシルエステル、および、

(iii) 13 - ( { - D - グルコピラノシル - ( 1 2 ) - [ - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - ] - D - グルコピラノシル } オキシ ) エント - カウル - 16 - エン - 19 - 酸 - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 6 ) - - D - グルコピラノシルエステル、

からなる群から選択される、修飾ステビオールグリコシド。

30

## 【0130】

## (付記15)

低血糖甘味料としての付記13または14に記載の修飾ステビオールグリコシドの使用。

## 【0131】

## (付記16)

付記13または14に記載の少なくとも1つの修飾ステビオールグリコシドを含む、甘味組成物。

## 【0132】

## (付記17)

任意に他の甘味料および/または甘味増強剤と組み合わせられた、付記13または14に記載の少なくとも1つの修飾ステビオールグリコシドを含む消耗品。

40

## 【0133】

## (付記18)

飲料、食料品、口腔ケア製品、たばこ製品、医薬品および栄養補助製品からなる群から選択される、付記17に記載の消耗品。

## 【0134】

## (付記19)

任意に他の甘味料および/または甘味増強剤と組み合わせた、付記13または14に記載の有効量の修飾ステアビオールグリコシドを消耗品に含めることを含む、前記消耗品を甘味化する方法。

50

## 【 0 1 3 5 】

( 付 記 2 0 )

ラクトバチルス・ロイテリ菌 ( *Lactobacillus reuteri* ) 180 の GTF180、または所望のトランスグリコシル化活性を有するその変異体の、ステビオールグリコシドの感覚刺激特性を増強するための使用であって、好ましくは前記ステビオールグリコシドがレバウジオシドAまたはステビオシドである、使用。

## 【 0 1 3 6 】

( 付 記 2 1 )

ステビオールグリコシドの苦味および/または後味を完全にまたは部分的に除去するための、付記20に記載の使用。

10

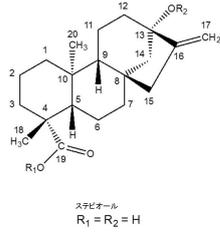
## 【 0 1 3 7 】

( 付 記 2 2 )

- a) 変異体のパネル、好ましくはラクトバチルス・ロイテリ菌 ( *Lactobacillus reuteri* ) 株180のGTF180の置換変異体を生成する工程、
  - b) ステビオールグリコシドのグリコシル化を可能にする条件下で、水性反応混合物中のグルコース供与体の存在下で、各変異体をステビオールグリコシド基質、好ましくはレバウジオシドAとインキュベートする工程、及び
  - c) 少なくとも部分的に反応混合物が濁るのを防ぐ能力を決定することにより、ステビオールグリコシドを修飾することができるラクトバチルス・ロイテリ菌 ( *Lactobacillus reuteri* ) 180のGTF180の少なくとも1つの変異体を選択する工程、
  - d) 任意に、修飾レバウジオシドAの構造を更に決定すると共に、ステビオールグリコシドのC-19位を修飾することができるラクトバチルス・ロイテリ菌 ( *Lactobacillus reuteri* ) 180の変異体GTF180を選択する工程、
- を含む、ステビオールグリコシド、好ましくはレバウジオシドAを修飾することができるグルカンスクラーゼを同定する方法。

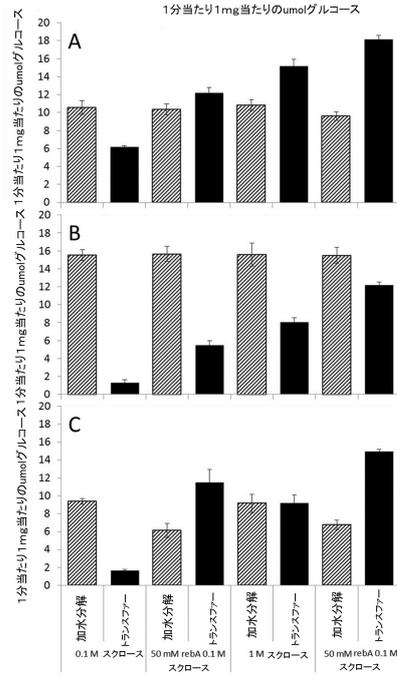
20

【 図 1 】

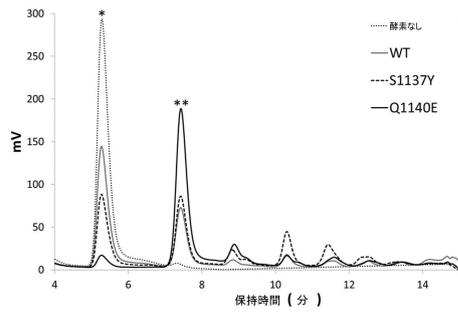


グリコンド	R <sub>1</sub> (C-19)	R <sub>2</sub> (C-13)
(1) ステロイド	GlcP(β1-[Glc1])	GlcP(β1-2)[GlcP(β1-[Glc3] [Glc2]) (ソホロース)
(2) レバウジオンド A	GlcP(β1-[Glc1])	GlcP(β1-2)[GlcP(β1-3)]GlcP(β1-[Glc3] [Glc4] [Glc2])
(3) レバウジオンド B	H-	GlcP(β1-2)[GlcP(β1-3)]GlcP(β1-[Glc3] [Glc4] [Glc2])
(4) ステロイドレバウジオンド H-	H-	GlcP(β1-2)GlcP(β1-[Glc3] [Glc2])

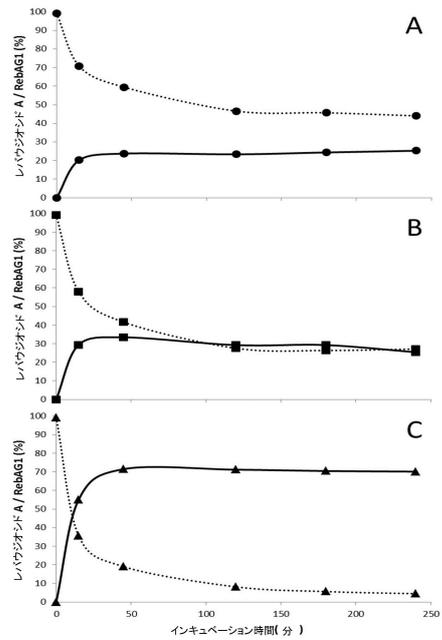
【 図 2 】



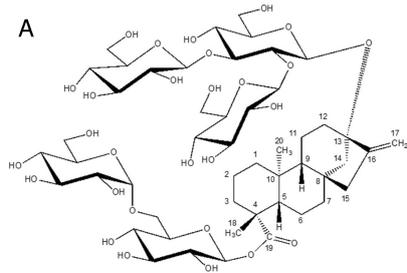
【 図 3 】



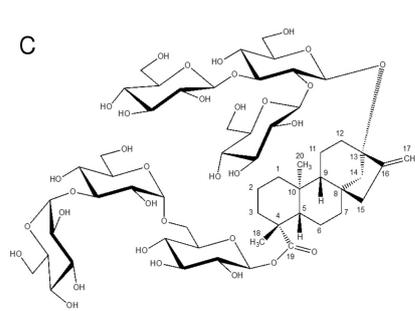
【 図 4 】



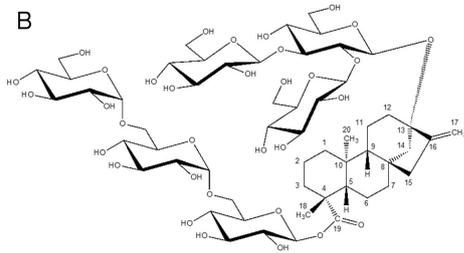
【 図 5 ( A ) 】



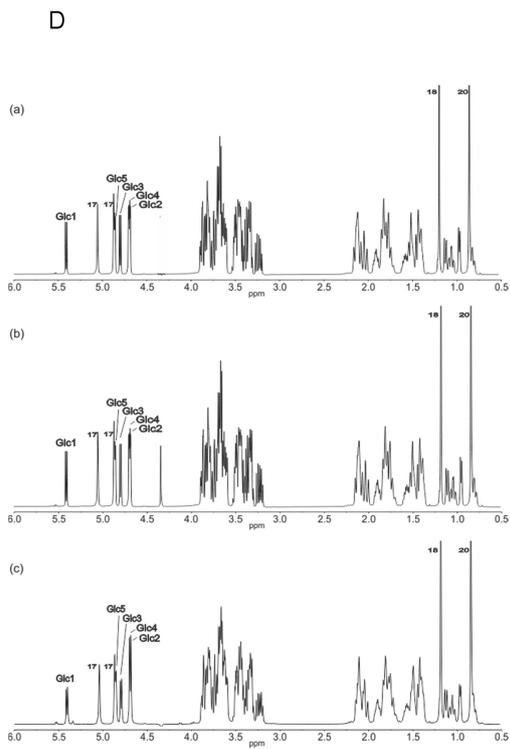
【 図 5 ( C ) 】



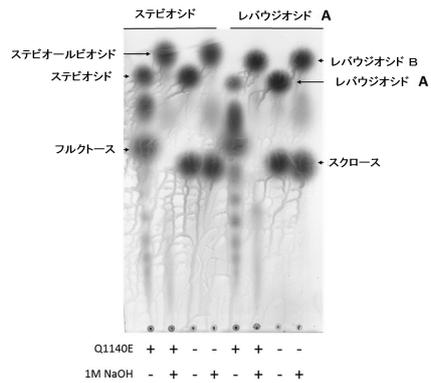
【 図 5 ( B ) 】



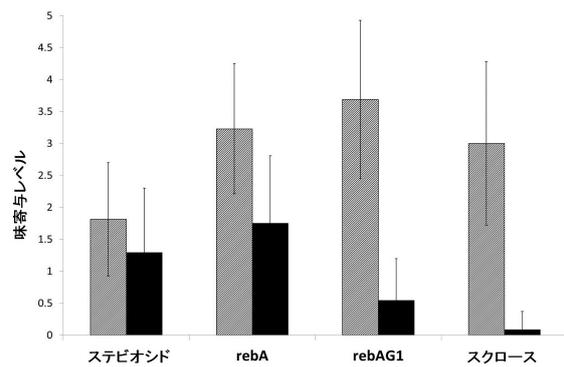
【 図 5 ( D ) 】



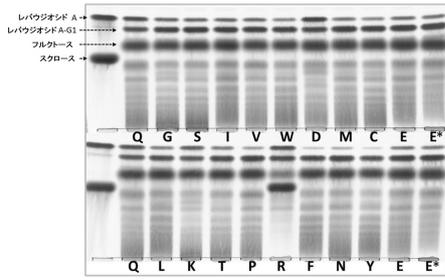
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 ( A ) 】

(A) > グルコンスクラーゼGTF180全長タンパク質[ラクトバチルス・ロイテリ菌(Lactobacillus reuteri)180]

```

1 meikkhfkly ksgkqvrtaa vatvavstak lyggvadahq qvqsstteq tstvnadtck
61 tvnldntdq pagtdknqv andttnqsk tdstatvkn ptfiavtks ssdnkgagn
121 ynkpdngny nvdasayfnn qhlsghwat nosqtdereq viivrtdttk elgrtnvnn
181 vlpdkvkvh nvyndasgfe dvnidafek mkdyrdsiee vorysgngks vdwesqptf
241 dknnyayldt fevkngelha tpmatnkai nymhfvilf detngketr qevrdgqerp
301 dvakypvqr ganngafdrf fngldtdyht qyqalsyxn adnqegdyvt ywfapqsiap
361 anqnggyld sfdisaknqv tvtgwntdl selqtnhyvi lfdqtaqqv asakvdiar
421 pdvakayptv ktaetagrkv tkfvanlqps hysavvrfs adengngdk rhtdywypw
481 tintasnid timentanglh itwmaadna ineaqyail innqrevtrq kltiliarpdv
541 aavypalyns avsgfdttik ltnaqnqaln gqqlvllrfs kavdgnpnt ntvtddqfakn
601 yattqgnfdy kvkngqief sqwhatnqn dknasqviih vngkevkrql vndtdqaaq
661 fnrndvykn paenaimsg fggiltlptv vkdenqvllh rfsndaktge gnyvdfwaev
721 msvdsfqkg ngplnqfqlg tingqylyd pttqaprknf llngndwiy fdkdtgagtn
781 alkqfkdqt isadeqyrrg neasyddks ienvngylda dtwyrpkqil kdgtwtddk
841 etdrmpilw wqptvvtqay ylnymkaygn llpaslpsfs tdadsaelnh yselvqgnie
901 krisetgetd wrltmhefv tknsmwnkds envdyggllg qggflkyvns dtkyansdw
961 rlmrtatni dgknyggaef llandinsn pvvqaeeilw lyyilmfgti tgnmpeanf
1021 girvdavdnv dwdllsiard yfnaaymeq adasankhin lledqgwdp ayenkignp
1081 ltmddrlrna imdtlsgapd knqalnkit qslvnrndm tenavipsyn fvrhdnsaq
1141 dqirqaigaa tdkpygefnl ddekkmeay indqstnkk wlymmpsay tllitnkdsv
1201 prvyvdylyq dggymehkt ryfdtitnl lktrvkvagg qtmsovknqi ltnvrfkgq
1261 mnatdtgtd trteigivvi sntnlklnl gesvvlhnga ahknqkyrav lltedgykn
1321 ytnddapva ytdangdlhf tntnldgqy tavrgyandp vtgylavvwp sgaaddqdar
1381 tpsdeahht ktayrnaal dnwiyegfs nfiyqptees ertnrviaq adlfkswqit
1441 tfeapqyns skdgtfldsi idngyafdr ydigmstpnk ygsdedlrna lqalhkaglg
1501 aiadvvpdq ynlpgkeavt vtrsdhgtt wevapknv yitntigge yqkkyggef
1561 dtlqkqyplq fsqyvpvtgt tidpsvkike wsakynfntn llhrgaayvl rsndgkyynl
1621 gtstqgflps qlsvqdneg yfvkegnnyh yydenkqmv dafiqdavn wyyfdknqnm
1681 vanqapreis sngasgtylf lnnqsfesg lvktdagtyy ydgdgemvnr qtvsdgamy
1741 vidngklvs esfdasatea hpikpgding qk

```

【 図 9 ( B ) 】

(B) > N末端切断型グルコンスクラーゼGTF180-ΔN [ラクトバチルス・ロイテリ菌(Lactobacillus reuteri)180]

```

1 mgngqgyyi dpttqprkn flngndwi yfdkdtgagt nalkqfdkg tisadeqyrr
61 geasydydk sienvnylt adtwyrpkqi lkdgtdttds ketdrpilm wvqntvtqa
121 ylynmkayq nllpaslpsf atdadsaeln hyselvgqni ekrisetqst dwtlthef
181 vtknsmwnk dsenvdyggllg lqggflkyvn sdltkyaned wlmrtatni idgknygga
241 fllandinsn qrvvqaeeiln wlyilmfgti itgnmpeanf dqirvdsdn vdrvlisair
301 dyfnaayme qdasankhi niledqgwdp payrnkignp qitnddlrn aindtlsgap
361 dknqalnki tqslvnrnd ntenavipsy nfvrahdnsa qdqirqaig atgkpyyefn
421 ldekkymea yindqstnk kwlymmpsa ytilitnkds vprvyvdyly qdggymehk
481 tryfdtitnl lktrvkvagg qtmsovknqi ltnvrfkgq amatdgttd ertteigivv
541 isntnlkln dgesvvlhm aahknqkyra vilttedgkv nymhfvilf aytdangdlh
601 fntnldgqq ytavrgyandp vtgylavvwp pagaaddqda rtpasdeah tktayrnaa
661 ldsnvieyef snfiyqptt seetnrviaq nadlfkswgi tfeapqyns skdgtflds
721 iidingyafdt rydigmstpn kygsdedlrn alqalhkagl qaidavpdpq iynlpgkeav
781 vtrsdhgtt twevapknv yitntigge eyqkkyggef ldtlqkqyplq fsqyvpvtq
841 tidpsvkik ewakynfntn llhrgaayvl lrsndgkyyn lgtstqgflp qlsvqdneg
901 yfvkegnny hydenkqmv dafiqdavn wyyildknqmv mvangspvei sngasgtyl
961 flnnqsfes glvktdagty ydgdgemvnr nqtvdsdgant yvidngklv sesfdasate
1021 shlpkpgdin gkq

```

【 図 9 ( C ) 】

(C) > N末端切断型およびメイン切断型グルコンスクラーゼGTF180-ΔNΔV[ラクトバチルス・ロイテリ菌(Lactobacillus reuteri)180]

```

1 mdeqyrrgne aysyddkie nvnnyltadt wyrpkqilkd gttvdsdkt dmrcpilmwv
61 pntvtqayyl nymkaygnll paslpsfetd adasaelnhs elvqgniekr isetgtdwl
121 rtmhefvtk nsmwnkdsen vdyggllqgq gflkyvnsdl tkyansdwl mrtatnidg
181 knyggaeell andinsnvp vqaeeilnly yinnfgtitg nnpaefdqj rvdavdnv
241 dlisiardfy naaymeqds asankhinil edwqwdpdp vnkignpql mddrlrnaim
301 dtlsgapdn qalnkitqs lvnrndante navipsynfv rahdasaqdg lrqaigaatg
361 kpygefnldd ekkmeayin dqnstnknw lymmpsaity lltndavpr vvygdylygd
421 gqymehktry fdtitnlkt rvkyvaggqt msvdkngilt nvrfgkann atdgttdetr
481 tegivvian ntnlkndge svvlhngaah knqkyravil ttedgknynt ndtdapvayt
541 dangdlhftn tndgqypta vrgyandpvt gylavvwpag aaddqarta psdeahtkk
601 ayrsnaalds nviyegfsen iyqpteeser tvnriaqad lfksawittf elapqynsk
661 dgtfldsiid ngyaftdryd lqmstpnkyg sdedirnalg alkaglsai adwvdpqiyv
721 lpgkeavtvt rsdhgttwe vapknvviy tntiggeyq kkygefldt lqkqyplqs
781 qyvpvtqti dpsvklkews akynfntnl hrgayvllrs ndgkyynlgt atqfllpsql
841 svqd

```

【 配列表 】

000697617300001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 テ プーレ、エフェリーン マリア  
オランダ王国 NL - 9 7 4 7 A G フローニンゲン ナイエボルグ7 デパートメントオブマイ  
クロバイアルフィジオロジー ファカルティオブマセマティクスアンドナチュラルサイエンスズ
- (72)発明者 デイクハウゼン、ルベルト  
オランダ王国 NL - 9 7 4 7 A G フローニンゲン ナイエボルグ7 デパートメントオブマイ  
クロバイアルフィジオロジー ファカルティオブマセマティクスアンドナチュラルサイエンスズ
- (72)発明者 ヘルヴィッヒ、ヘリット ヨハンネス  
オランダ王国 NL - 9 7 4 7 A G フローニンゲン ナイエボルグ7 デパートメントオブマイ  
クロバイアルフィジオロジー ファカルティオブマセマティクスアンドナチュラルサイエンスズ
- (72)発明者 カーメルリング、ヨハンニス パウルス  
オランダ王国 NL - 9 7 4 7 A G フローニンゲン ナイエボルグ7 デパートメントオブマイ  
クロバイアルフィジオロジー ファカルティオブマセマティクスアンドナチュラルサイエンスズ

審査官 松田 芳子

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0214751 (US, A1)  
国際公開第2013/019050 (WO, A2)  
特表2014-530631 (JP, A)  
Biomacromolecules, 2009年, vol.10, no.3, p.580-588  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 2015年01月15日, vol.99, p.5885-5894  
Food Science and Technology, 2013年, vol.51, p.524-530  
Food Science and Technology, 2014年, vol.57, p.400-405  
Molecules, 2014年, vol.19, p.17345-17355  
Food Chemistry, 2014年, vol.146, p.23-29

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 7/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)