

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **028927**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.01.31

(21) Номер заявки
201491195

(22) Дата подачи заявки
2013.01.25

(51) Int. Cl. *C12P 19/00* (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C12P 19/16 (2006.01)
C12P 19/20 (2006.01)

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ
ГАЛАКТООЛИГОСАХАРИДЫ**

(31) 12152502.6; 61/590,503

(32) 2012.01.25

(33) EP; US

(43) 2014.12.30

(86) PCT/EP2013/051477

(87) WO 2013/110778 2013.08.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АРЛА ФУДС АМБА (DK)

(72) Изобретатель:
**Бергельсен Ханс, Вейсе Петер
Лангборг, Буш Йон Вейс (DK)**

(74) Представитель:
Поликарпов А.В. (RU)

(56) EP-A1-2138586
WO-A2-2009113030
WO-A1-2012010597

(57) Изобретение относится к способу получения композиции, содержащей галактоолигосахариды, причем способ включает получение смеси, содержащей галактозильный донор и галактозильный акцептор, контактирование смеси с ферментом, обладающим бета-галактозидазной активностью и трансгалактозилирующей активностью, и инкубирование указанной смеси.

B1

028927

028927

B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей галактоолигосахариды, а также эффективному способу ее получения.

Предпосылки изобретения

В человеческом грудном молоке, как известно, содержится ряд различных олигосахаридов, которым приписываются некоторые из полезных для здоровья эффектов грудного вскармливания младенцев (Kunz et al. (2000)). Например, некоторые олигосахариды, такие как FOS, GOS или инулин, являются так называемыми пребиотиками, что означает, что они поддерживают полезные бактерии желудочно-кишечного тракта и неблагоприятны для вредных бактерий. В связи с их полезными для здоровья эффектами олигосахариды часто применяют в функциональных пищевых продуктах, таких как детские смеси и лечебное питание.

Существуют несколько подходов для получения олигосахаридов. Один подход основан на выделении олигосахаридов из встречающихся в природе источников. Фруктозные олигосахариды (FOS) и инулин, например, в природе встречаются в топинамбуре, лопухе, цикории, луке-порее, репчатом луке и спарже, и их можно выделять из данных сельскохозяйственных культур. Получение инулина из корней цикория, например, описано во Frank (2002). Данный подход к получению олигосахаридов ограничивается наличием пригодных сельскохозяйственных культур и может быть неосуществимым для более сложных олигосахаридов.

Другой подход основан на ферментативном синтезе, в котором ферменты катализируют синтез олигосахаридов. Yun (1996) описывает ферментативное получение фруктоолигосахаридов с использованием ферментов, обладающих фруктозилтрансферазной активностью, и с использованием сахарозы в качестве субстрата для фермента.

Еще пример ферментативного синтеза описан в заявке на патент WO 01/90317 A2, в которой раскрывают способ получения галактоолигосахаридов (GOS) формулы Gal-Gal-Glc с использованием специального фермента β -галактозидазы и лактозы в качестве субстрата. В GenBank, с входящим номером AJ224435.2, раскрыта обновленная версия (от 5 августа 2003 г.) последовательности фермента β -галактозидазы, раскрытого в WO 01/90317.

В заявке на патент EP 2 138 586 A1 раскрыт способ региоселективного производства дисахаридов или олигосахаридов с помощью трансгликозилирования или гидролиза углеводной донорной молекулы и гликозильной акцепторной молекулы в присутствии гликозидазы в присутствии по меньшей мере одного диалкиламида. Однако в EP 2138586 A1 не раскрыто удаление во время инкубации свободных отщепляемых групп, высвобожденных из гликозильного донора.

В заявке на патент WO 2009/113030 A2 описан способ получения галактоолигосахаридов на основе чистой лактозы с использованием цельных микробных клеток в реакторе с системой микрофилтрации в поперечном потоке на основе полых волокон. Однако в WO 2009/113030 A2 отсутствует какая-либо идея, относящаяся к получению гетерогалактоолигосахаридов с использованием галактозильного акцептора, который не связан с донором.

В заявке на патент WO 2012/010597 A1 раскрыт способ получения композиций, содержащих галактоолигосахариды, а также собственно композиции, содержащие галактоолигосахариды. Однако в WO 2012/010597 A1 не раскрыто удаление во время инкубации свободных отщепляемых групп, высвобожденных из галактозильного донора.

Краткое описание изобретения

Задачей настоящего изобретения является обеспечение улучшенных способов получения галактоолигосахаридов и, в частности, галактоолигосахаридов, обладающих иным восстанавливающим концом, чем у галактозильного донора, используемого в процессе получения.

Авторы настоящего изобретения, к удивлению, обнаружили, что отщепляемые группы, высвобожденные из донора во время синтеза галактоолигосахаридов, действуют как конкурирующие галактозильные акцепторы и снижают выход вышеупомянутых галактоолигосахаридов. Это особенно удивительно, поскольку первоначальные испытания, проведенные авторами настоящего изобретения, показали, что отщепляемые группы, и особенно глюкоза, являются слабыми галактозильными акцепторами. Авторы настоящего изобретения к тому же обнаружили, что выход вышеупомянутых галактоолигосахаридов (обладающих иным восстанавливающим концом, чем галактозильный донор) можно увеличить путем удаления высвобожденных отщепляемых групп из реакционной смеси во время инкубации галактозильного донора, галактозильного акцептора и фермента β -галактозидазы.

На фиг. 1-3 данное объяснено более подробно.

Фиг. 1 является схематическим изображением основных типов реакций, которые происходят во время трансгалактозилирования.

Реакция а) является требуемой реакцией и включает перенос галактозильной группы от донора (в данном примере лактозы) на акцептор (например, фукозу). Продуктами данной реакции являются свободная отщепляемая группа (в данном примере глюкоза) и небольшой олигосахарид (например, Gal-Fuc), обладающий иным восстанавливающим концом, чем галактозильный донор.

Реакция б) является нежелательной побочной реакцией, которая приводит к так называемому само-галактозилированию донора, например дополнительно галактозилированной лактозе, если донором является лактоза. Данный побочный продукт сложно и дорого удалить из олигосахаридного продукта. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что уровень самогалактозилирования можно значительно снизить путем применения первого фермента, обладающего высокой эффективностью трансгалактозилирования (низкое Т-значение), в комбинации с относительно низкой концентрацией галактозильного донора.

Реакция с) на фиг. 1 является другой нежелательной побочной реакцией, которую авторы настоящего изобретения недавно обнаружили. Авторы настоящего изобретения наблюдали удивительно высокие уровни аллолактозы в галактоолигосахаридных композициях и пришли к заключению, что свободные отщепляемые группы, и особенно глюкоза, также действуют в качестве акцептора, если их концентрация достаточно высока.

Фиг. 2 является схематическим изображением некоторых видов молекул, присутствующих в композициях с галактоолигосахаридами, когда свободные отщепляемые группы не удаляются во время инкубации. В дополнение к требуемым олигосахаридным продуктам, полученным из галактозильного акцептора, композиция к тому же содержит нежелательные олигосахариды, полученные при галактозилировании свободных отщепляемых групп, например аллолактозы и дополнительно галактозилированной аллолактозы.

Фиг. 3 является схематическим изображением некоторых видов молекул, присутствующих в композициях с галактоолигосахаридами, когда свободные отщепляемые группы удаляются во время инкубации. В отличие от композиции с галактоолигосахаридами, проиллюстрированной на фиг. 2, в настоящей композиции с галактоолигосахаридами отсутствуют (или присутствуют по меньшей мере в значительно более низкой концентрации) свободные отщепляемые группы, аллолактоза и олигосахариды, полученные из аллолактозы.

Таким образом, аспект настоящего изобретения относится к способу получения композиции, содержащей один или несколько галактоолигосахаридов, при этом способ включает этапы:

- а) получение смеси, содержащей
 - галактозильный донор, содержащий галактозильную группу, связанную с отщепляемой группой, при этом галактозильный донор обладает молярной массой не более 350 г/моль,
 - галактозильный акцептор, который отличается от галактозильного донора, причем указанный галактозильный акцептор является сахаридом или сахароспиртом, и
 - где молярное соотношение между галактозильным акцептором и галактозильным донором составляет по меньшей мере 1:10 и где смесь содержит по меньшей мере 0,05 моль/л галактозильного акцептора;
- б) обеспечение присутствия первого фермента, причем указанный первый фермент обладает β -галактозидазной активностью, при этом указанный первый фермент контактирует со смесью; и
- с) инкубирование смеси и первого фермента, тем самым позволяя первому ферменту высвободить отщепляемую группу галактозильного донора и перенести галактозильную группу галактозильного донора к галактозильному акцептору, таким образом образуя галактоолигосахарид, при этом этап с) дополнительно включает удаление из инкубационной смеси отщепляемой группы, высвобожденной из галактозильного донора, и где удаление отщепляемой группы, высвобожденной из галактозильного донора, включает физическое удаление свободных отщепляемых групп из инкубационной смеси и/или превращение свободных отщепляемых групп в одно или несколько других химических соединений, которые все еще могут присутствовать в инкубационной смеси, с получением в результате композиции, содержащей один или несколько галактоолигосахаридов с получением в результате композиции, содержащей один или несколько галактоолигосахаридов.

Выражение "удаление отщепляемой группы, высвобожденной из галактозильного донора" следует понимать как физическое удаление свободных отщепляемых групп из инкубационной смеси и/или превращение свободных отщепляемых групп в одно или несколько других химических соединений, которые все еще могут присутствовать в инкубационной смеси. Предпочтительно, чтобы такие химические соединения не действовали как галактозильные акцепторы или, по меньшей мере, чтобы они являлись менее эффективными галактозильными акцепторами, чем свободная отщепляемая группа.

Настоящее изобретение открывает дешевое и эффективное получение композиций со сложными галактоолигосахаридами с высоким выходом. Настоящее изобретение к тому же уменьшает галактозилирование свободных отщепляемых групп, высвобожденных из галактозильного донора, а также самогалактозилирование галактозильного донора, которые оба приводят в результате к нежелательным побочным продуктам, которые дорого удалять из композиции.

Предпочтительно первый фермент обладает трансгалактозилирующей активностью в дополнение к β -галактозидазной активности. Также может быть предпочтительным, чтобы первый фермент обладал Т-значением не более 0,9.

В контексте настоящего изобретения выражение "трансгалактозилирующая активность" фермента β -галактозидазы относится к способности фермента переносить галактозильную группу от донорной молекулы, например молекулы лактозы, к неводной молекуле, например другой молекуле лактозы.

T-значение является мерой трансгалактозилирующей эффективности фермента β -галактозидазы с использованием лактозы как в качестве галактозильного донора, так и акцептора. Определение T-значения фермента β -галактозидазы выполняют в соответствии с анализом и формулой, описанными в примере 3. T-значение рассчитывают с использованием формулы

$$T\text{-значение} = \frac{\text{количество полученной галактозы (в моль)}}{\text{количество использованной лактозы (в моль)}}$$

Фермент лактаза без какой-либо трансгалактозилирующей активности будет производить 1 моль галактозы на каждый использованный моль лактозы и будет иметь T-значение 1. β -галактозидаза, обладающая чрезвычайно высокой трансгалактозилирующей активностью, будет использовать почти все галактозильные группы из лактозы для трансгалактозилирования вместо образования галактозы и будет, следовательно, обладать T-значением около 0.

Еще аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей один или несколько галактоолигосахаридов, при этом композицию можно получить с помощью способа, описанного в данном документе.

Дополнительные задачи и преимущества настоящего изобретения описаны ниже.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показана схематическая иллюстрация типов реакций, участвующих в трансгалактозилировании.

На фиг. 2 показано схематическое представление продуктов реакции, полученных без использования свободных отщепляемых групп.

На фиг. 3 показано схематическое представление продуктов реакции, полученных без использования свободных отщепляемых групп.

На фиг. 4 показан график интегрированного ответа ди-, три- и тетрасахаридов галактозилированной фукозы через 4 ч инкубации - с и без удаления свободных отщепляемых групп в течение инкубации. Свободные отщепляемые группы (глюкоза) удаляют с помощью ферментативного превращения. На нем видно, что содержание галактозилированной фукозы увеличивается, если свободные отщепляемые группы удаляют во время инкубации.

На фиг. 5 показан график интегрированного ответа ди-, три- и тетрасахаридов галактозилированной фукозы через 5 ч инкубации - с и без удаления свободных отщепляемых групп в течение инкубации. И в данном случае на нем видно, что содержание галактозилированной фукозы увеличивается, если свободные отщепляемые группы удаляются во время инкубации.

На фиг. 6 показан график общего интегрированного ответа галактозилированной фукозы по сравнению с общим интегрированным ответом галактозилированного донора/отщепляемой группы - с и без удаления свободных отщепляемых групп в течение инкубации. Общий интегрированный ответ галактозилированного донора/отщепляемой группы является суммой интегрированных ответов молекул Gal-Glc, Gal-Gal-Glc и Gal-Gal-Gal-Glc. Общий интегрированный ответ галактозилированной фукозы является суммой ответов молекул Gal-Fuc, Gal-Gal-Fuc и Gal-Gal-Gal-Fuc. Как видно, общий интегрированный ответ галактозилированной фукозы значительно возрастает при удалении свободных отщепляемых групп в течение инкубации, в то время как общий интегрированный ответ галактозилированного донора/отщепляемой группы почти не изменяется.

Подробное описание настоящего изобретения

Как уже упоминалось, аспект настоящего изобретения относится к способу получения композиции, содержащей один или несколько галактоолигосахаридов, при этом способ включает этапы:

- a) получение смеси, содержащей галактозильный донор, содержащий галактозильную группу, связанную с отщепляемой группой, при этом галактозильный донор обладает молярной массой не более 350 г/моль, галактозильный акцептор, который отличается от галактозильного донора, причем указанный галактозильный акцептор является сахаридом или сахароспиртом, и где молярное соотношение между галактозильным акцептором и галактозильным донором составляет по меньшей мере 1:10 и где смесь содержит по меньшей мере 0,05 моль/л галактозильного акцептора;
- b) обеспечение присутствия первого фермента, причем указанный первый фермент обладает β -галактозидазной активностью, при этом указанный первый фермент контактирует со смесью; и
- c) инкубирование смеси и первого фермента, тем самым позволяя первому ферменту высвободить отщепляемую группу галактозильного донора и перенести галактозильную группу галактозильного донора к галактозильному акцептору, таким образом образуя галактоолигосахарид, при этом этап c) дополнительно включает удаление из инкубационной смеси отщепляемой группы, высвобожденной из галак-

тозильного донора, и где удаление отщепляемой группы, высвобожденной из галактозильного донора, включает физическое удаление свободных отщепляемых групп из инкубационной смеси и/или превращение свободных отщепляемых групп в одно или несколько других химических соединений, которые все еще могут присутствовать в инкубационной смеси, с получением в результате композиции, содержащей один или несколько галактоолигосахаридов.

В контексте настоящего изобретения выражение "гликозильная группа" относится к группе, полученной путем удаления одной или двух гидроксильных групп из моносахарида или низшего олигосахарида, такого как ди- или трисахарида, или из соответствующих сахароспиртов. Данное выражение применяют в данном документе для описания различных структурных элементов галактозильных доноров, галактозильных акцепторов и олигосахаридов.

Сокращения наиболее распространенных сахаридов и их соответствующих гликозильных групп приведены ниже.

Сахарид	Сокращение	Название гликозильной группы
Глюкоза	Glc	глюкозил
Галактоза	Gal	галактозил
фукоза	Fuc	фукозил
манноза	Man	маннозил
ксилоза	Xyl	ксилозил
N-ацетилгалактозамин	GalNAc	N-ацетилгалактозаминил
Лактоза	Lac	лактозил

В контексте настоящего изобретения выражение "олигосахарид" относится к молекуле, содержащей по меньшей мере две гликозильные группы, предпочтительно по меньшей мере три, которые могут являться различными или того же типа. По меньшей мере две гликозильные группы предпочтительно связаны посредством О-гликозильной связи. Олигосахарид может быть линейной цепью гликозильных групп или он может обладать разветвленной структурой. Олигосахариды могут, например, быть представлены стехиометрической формулой, например $(\text{Gal})_3\text{Glc}$, или общими формулами, например Gal-Gal-Gal-Glc, Gal-Gal-Glc-Gal или Gal-(Gal-)Glc-Gal. Стехиометрические формулы предоставляют информацию о том, какие гликозильные группы содержит олигосахарид или группы олигосахаридов, но не об их взаимном расположении, тогда как общие формулы также содержат общую информацию о взаимном расположении гликозильных групп.

В контексте настоящего изобретения выражение "гомоолигосахариды" относится к олигосахаридам, содержащим только один тип гликозильной группы. Примерами гомоолигосахаридов являются Gal-Gal-Gal-Gal и Glc-Glc-Glc.

В контексте настоящего изобретения выражение "гетероолигосахариды" относится к олигосахаридам, которые содержат различные гликозильные группы, например Gal-Gal-Glc или Gal-Gal-Fuc.

В контексте настоящего изобретения приставка "галакто-", применяемая вместе с выражением "олигосахарид", означает, что олигосахарид содержит галактозильные группы в качестве повторяющегося звена. Приставку "гомо-" или "гетеро-" могут применять вместе с приставкой "галакто-". Как Gal-Gal-Glc, так и Gal-Gal-Gal-Gal являются галактоолигосахаридами. Gal-Gal-Glc является гетерогалактоолигосахаридом, а Gal-Gal-Gal-Gal является гомогалактоолигосахаридом.

В контексте настоящего изобретения "X" представляет галактозильный акцептор, как определено в данном документе. "-X" представляет гликозильную группу, соответствующую галактозильному акцептору, в частности гликозильную группу, связанную с другой группой. "-" обозначает связь. Гликозильная группа предпочтительно связана через 3-, 4-, 5- или 6-положение гликозильной группы и предпочтительно посредством О-гликозильной связи. В контексте настоящего изобретения "Gal-" представляет галактозильную группу, связанную с другой группой предпочтительно через 1-положение галактозильной группы и предпочтительно посредством О-гликозильной связи.

В контексте настоящего изобретения "-Gal-" представляет галактозильную группу, связанную с двумя другими группами. Левая связь предпочтительно осуществляется через 4- или 6-положение галактозильной группы и предпочтительно посредством О-гликозильной связи. Правая связь предпочтительно осуществляется через 1-положение галактозильной группы и предпочтительно посредством О-гликозильной связи.

Связи между двумя галактозильными группами являются обычно 1-4 или 1-6 связями и, как правило, О-гликозильными связями. Связь между галактозильной группой и азотсодержащим акцептором альтернативно может быть N-гликозильной связью.

Способ по настоящему изобретению предпочтительно является способом получения композиции, содержащей один или несколько галактоолигосахаридов, с использованием галактозильного донора и галактозильного акцептора, причем один или несколько галактоолигосахаридов содержат галактозиль-

ный акцептор в качестве восстанавливающего конца.

В контексте настоящего изобретения выражение "способ" и "процесс" применяют взаимозаменяемо.

Этап а) включает приготовление смеси, в которой будут получены олигосахариды.

Смесь предпочтительно является жидкой смесью и может, например, являться водным раствором, содержащим галактозильный акцептор и галактозильный донор.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молярное соотношение между галактозильным акцептором и галактозильным донором в смеси на этапе а) составляет по меньшей мере 1:5, предпочтительно по меньшей мере 1:1 и еще более предпочтительно по меньшей мере 5:1. Например, молярное соотношение между галактозильным акцептором и галактозильным донором в смеси на этапе а) может составлять по меньшей мере 10:1, например по меньшей мере 15:1.

Молярное соотношение между галактозильным акцептором и галактозильным донором в смеси на этапе а) может, например, составлять 1:10-100:1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молярное соотношение между галактозильным акцептором и галактозильным донором в смеси на этапе а) составляет 1:10-50:1, предпочтительно 1:5-30:1 и еще более предпочтительно 1:1-20:1. Например, молярное соотношение между галактозильным акцептором и галактозильным донором в смеси на этапе а) может, например, составлять 2:1-40:1, предпочтительно 4:1-30:1 и еще более предпочтительно 10:1-25:1.

Как уже упоминалось, галактозильные доноры содержат галактозильную группу, ковалентно связанную с отщепляемой группой. Галактозильная группа является предпочтительно β -D-галактопиранозильной группой. К тому же, галактозильная группа предпочтительно связана с отщепляемой группой посредством O-гликозидной связи в 1-положении галактозильной группы.

Отщепляемая группа галактозильного донора может быть, например, гликозильной группой и/или группой сахароспирта. Особенно предпочтительно, чтобы отщепляемая группа галактозильного донора являлась глюкозильной группой, т.е. остатком глюкозы.

Если отщепляемая группа является гликозильной группой моно- или дисахарида или соответствующего сахароспирта, то галактозильная группа предпочтительно связана с отщепляемой группой посредством O-гликозидной связи в 1-положении галактозильной группы, причем связь находится в 4-положении отщепляемой группы моносахаридного типа или в 4'-положении отщепляемой группы дисахаридного типа.

В контексте настоящего изобретения фраза "Y и/или X" означает "Y" или "X" или "Y и X". Следуя той же линии логики, фраза " X_1, X_2, \dots, X_{i-1} и/или X_i " означает " X_1 ", или " X_2 ", или " X_{i-1} ", или " X_i ", или любую комбинацию компонентов: X_1, X_2, \dots, X_{i-1} и X_i .

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный донор обладает молярной массой не более 1000 г/моль. Например, галактозильный донор может обладать молярной массой не более 500 г/моль. Может даже являться предпочтительным, чтобы галактозильный донор обладал молярной массой не более 350 г/моль.

Дисахариды являются предпочтительным типом галактозильного донора на данный момент. Альтернативно или дополнительно трисахариды также могут применяться в качестве галактозильных доноров. Таким образом, предполагают, что смесь может содержать комбинацию различных галактозильных доноров.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный донор является лактозой. Другим примером пригодного галактозильного донора является лактулоза. Еще примером пригодного галактозильного донора является лактитол.

В контексте настоящего изобретения выражение "лактоза" относится к дисахариду β -D-галактопиранозил-(1 \rightarrow 4)-D-глюкоза, который также упоминается как молочный сахар и который является наиболее преобладающим сахаридом коровьего молока.

Галактозильный донор можно получать из любого пригодного источника галактозильных доноров, как из промышленно очищенных источников, таких как очищенная лактоза, так и/или природных источников, таких как сывороточный пермеат, т.е. депротеинизированная сыворотка, полученная путем ультрафильтрации сыворотки.

Галактозильным акцептором может быть любая молекула, которая способна принимать галактозильную группу от первого фермента и обычно содержит гидроксильные группы и предпочтительно спиртовые гидроксильные группы. Выражение "принимать" означает, что галактозильная группа донора должна ковалентно связываться с акцептором, например, посредством O-гликозильной связи.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный акцептор содержит одну или несколько спиртовых гидроксильных групп. Например, галактозильный акцептор может быть полиолом.

В контексте настоящего изобретения выражение "полиол" относится к молекуле, содержащей по меньшей мере две спиртовые гидроксильные группы.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный акцептор не является лактозой. Кроме того, может быть предпочтительным, чтобы галактозильный акцептор не являлся глюкозой.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный акцептор отличается от галактозильного донора. Особенно предпочтительно применять относительно дешевый галактозильный донор, такой как лактоза, в качестве источника галактозильной группы и биологически интересующий акцептор, например фукозу, в качестве галактозильного акцептора.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный акцептор не является лактозой, галактозой или глюкозой.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный акцептор не является глюкозой или олигосахаридами общей формулы Gal-(Gal)_i-Glc, где i является неотрицательным целым числом, т.е., например, 0, 1, 2, 3 или 4.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный акцептор не является галактозой или олигосахаридами общей формулы Gal-(Gal)_i-Gal, где i является неотрицательным целым числом.

Можно применять галактозильные акцепторы, обладающие различными молярными массами, но галактозильные акцепторы, обладающие молярной массой по меньшей мере 100 г/моль, являются предпочтительными на данный момент.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный акцептор обладает молярной массой не более 1000 г/моль. Например, галактозильный акцептор может обладать молярной массой не более 500 г/моль. Может даже являться предпочтительным, чтобы галактозильный акцептор обладал молярной массой не более 350 г/моль. Галактозильный акцептор может, например, обладать молярной массой не более 200 г/моль.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный акцептор является сахаридом. Галактозильный акцептор может, например, являться моносахаридом. Альтернативно, галактозильный акцептор может быть дисахаридом.

Например, галактозильный акцептор может быть пентозой. Галактозильный акцептор может, например, являться арабинозой. Другим примером пригодной пентозы является ксилоза. Еще примером пригодной пентозы является рибоза. Галактозильный акцептор может, например, являться пентозой, выбранной из группы, состоящей из арабинозы, ксилозы и рибозы.

Гексозы являются другой группой пригодных галактозильных акцепторов. Галактозильный акцептор может, например, являться маннозой. Другим примером пригодной гексозы является галактоза. Еще примером пригодной гексозы является тагатоza. Дополнительным примером пригодной гексозы является фруктоза. Галактозильный акцептор может, например, являться гексозой, выбранной из группы, состоящей из маннозы, галактозы, тагатозы и фруктозы.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный акцептор является дезоксигексозой. Галактозильный акцептор может, например, являться фукозой, такой как, например, D-фукоза, L-фукоза или их смесь.

Альтернативно, галактозильный акцептор может быть олигосахаридом, таким как, например, дисахарид или трисахарид. Примером пригодного дисахарида является мальтоза. Другим примером пригодного дисахарида является лактулоза. Еще полезной группой галактозильных акцепторов являются сахараиды.

Еще пригодной группой галактозильных акцепторов являются производные сахаридов.

В контексте настоящего изобретения выражение "производное сахараид" относится к сахараиду, содержащему одну или несколько негидроксильных функциональных групп. Примерами таких функциональных групп являются карбоксильная группа, аминогруппа, N-ацетиламиногруппа и/или тиольная группа. Сахарида, которые содержат альдегидную группу в 1-положении или кетогруппу во 2-положении, не рассматриваются как производные сахаридов как таковые, за исключением случаев, когда сахараиды содержат некоторые из негидроксильных функциональных групп, упомянутых выше.

Примером пригодного производного сахараид является N-ацетилгалактозамин. Другим примером пригодного производного сахараид является сиаловая кислота. Еще примером пригодного производного сахараид является сиалиллактоза. Таким образом, галактозильный акцептор может быть производным сахараид, выбранным из группы, состоящей из N-ацетилгалактозамина, сиаловой кислоты и сиалиллактозы.

Другой группой пригодных галактозильных акцепторов являются сахароспирты. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный акцептор является сахароспиртом. Примерами пригодных сахароспиртов являются сорбитол, ксилитол, лактитол и/или мальтитол.

В противоположность вышеуказанным галактозильным акцепторам, авторы настоящего изобретения обнаружили, что N-ацетилглюкозамин и глюкоза являются менее эффективными галактозильными акцепторами. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения галактозильный акцептор не является глюкозой или N-ацетилглюкозамином.

Смесь может содержать один или несколько дополнительных галактозильных акцепторов, отличных от первого типа галактозильного акцептора. Различные типы галактозильных акцепторов смеси можно, например, выбирать среди типов галактозильных акцепторов, упомянутых в данном документе.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения полученные галактозилированные акцепторы действуют как новый тип галактозильного акцептора и также могут быть галактозилированы. Таким образом, можно получать галактоолигосахариды со стехиометрической формулой Gal_{i+1}X , где i является неотрицательным целым числом. Как правило, наиболее преобладающими видами являются GalX , Gal_2X и Gal_3X .

В других предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения полученные галактозилированные акцепторы действуют как новый тип галактозильного акцептора и также могут быть галактозилированы. Таким образом, можно получать галактоолигосахариды с общей формулой $\text{Gal}(\text{Gal})_i\text{X}$, где i является неотрицательным целым числом. Как правило, наиболее преобладающими видами являются Gal-X , Gal-Gal-X и Gal-Gal-Gal-X .

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения смесь этапа а) содержит галактозильный донор в концентрации не более 0,7 моль/л, предпочтительно не более 0,4 моль/л и даже более предпочтительно не более 0,2 моль/л. Смесь может, например, содержать галактозильный донор в концентрации 0,001-0,7 моль/л, предпочтительно 0,01-0,5 моль/л и даже более предпочтительно 0,02-0,2 моль/л.

Альтернативно, смесь этапа а) может содержать галактозильный донор в концентрации не более 0,3 моль/л, предпочтительно не более 0,1 моль/л и даже более предпочтительно не более 0,05 моль/л. Смесь может, например, содержать галактозильный донор в концентрации 0,001-0,2 моль/л, предпочтительно 0,005-0,1 моль/л и даже более предпочтительно 0,01-0,05 моль/л.

Следует отметить, что галактозилированный галактозильный акцептор и галактозилированный галактозильный донор могут в определенных пределах действовать как галактозильный донор, но галактозилированный галактозильный акцептор и галактозилированный галактозильный донор не считаются галактозильным донором в контексте настоящего изобретения и не вносят вклад в концентрации или соотношения галактозильного донора, упомянутого в данном документе.

Галактозильный акцептор можно применять в диапазоне разностных концентраций. Однако предпочтительно избегать насыщения смеси галактозильным акцептором, так как избыток галактозильного акцептора, как правило, следует удалять из композиции по настоящему изобретению, содержащей галактоолигосахарид.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения смесь этапа а) содержит галактозильный акцептор в количестве по меньшей мере 0,05 моль/л, предпочтительно по меньшей мере 0,10 моль/л и даже более предпочтительно по меньшей мере 0,30 моль/л. Даже более высокие концентрации галактозильного акцептора могут являться предпочтительными, таким образом, смесь этапа а) может, например, содержать галактозильный акцептор в количестве по меньшей мере 0,5 моль/л, предпочтительно по меньшей мере 0,7 моль/л и даже более предпочтительно по меньшей мере 1 моль/л.

Смесь может, например, содержать галактозильный акцептор в концентрации 0,05-5 моль/л, предпочтительно 0,1-2 моль/л и даже более предпочтительно 0,3-1 моль/л.

Однако в некоторых вариантах осуществления предпочтительной является относительно низкая концентрация галактозильного акцептора, и в этом случае смесь может, например, содержать галактозильный акцептор в концентрации не более 2 моль/л, предпочтительно не более 0,5 моль/л и даже более предпочтительно не более 0,2 моль/л. Например, смесь может содержать галактозильный акцептор в концентрации 0,05-2 моль/л, предпочтительно 0,06-1 моль/л и даже более предпочтительно 0,08-0,8 моль/л.

В дополнение к галактозильному акцептору и галактозильному донору, смесь может также содержать различные добавки для оптимизации условий ферментативной реакции.

Смесь может содержать, например, один или несколько рН буферов для доведения рН смеси до оптимального уровня рН первого фермента. Альтернативно или в дополнение, смесь может содержать водорастворимые соли, содержащие один или более ионов металлов. В зависимости от конкретного первого фермента, например, можно применять, ионы металлов, такие как Ca^{2+} , Zn^{2+} или Mg^{2+} . Однако следует отметить, что некоторые первые ферменты являются нечувствительными к присутствию ионов металлов в смеси.

Обычные способы синтеза олигосахаридов часто используют средства, снижающие активность воды, такие как, например, глицерин, этиленгликоль, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль (PEG). Настоящее изобретение успешно дает возможность выполнять эффективный синтез галактоолигосахаридов без применения таких средств, снижающих активность воды. Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения смесь содержит средство, снижающее активность воды, в количестве не более 5 вес.% относительно веса смеси, предпочтительно не более 1 вес.% и даже более предпочтительно не более 0,1 вес.%. Например, смесь может содержать средство, снижающее активность воды, в количестве не более 0,05 вес.% относительно веса смеси.

Смесь этапа а) или ингредиенты, образующие смесь, можно подвергать термообработке перед реакцией с первым ферментом для предотвращения микробного роста в течение реакции. Можно применять обычные способы термообработки, такие как пастеризация (например, 72°C в течение 15 с), высокая пастеризация (например, 90°C в течение 15 с) или УНТ-обработка (например, 140°C в течение 4 с). Следует проявлять осторожность при термообработке термолабильных ферментов.

Этап б) включает обеспечение присутствия первого фермента, который предпочтительно обладает β -галактозидазной активностью. Предпочтительно первый фермент обладает трансгалактозилирующей активностью в дополнение к β -галактозидазной активности. Также может быть предпочтительным, чтобы первый фермент обладал T-значением не более 0,9. Следует отметить, что способ может к тому же включать применение дополнительных ферментов, например, ферментов, обладающих иной ферментативной активностью, отличной от β -галактозидазной активности или трансгалактозилирующей активности.

В контексте настоящего изобретения выражение " β -галактозидазная активность" относится к ферментативному катализу гидролиза концевых невосстанавливающих остатков β -D-галактозы в β -D-галактозидах, таких как лактоза. Первый фермент, применяемый в настоящем изобретении, предпочтительно относится к классу ЕС 3.2.1.23.

Предпочтительно, чтобы первый фермент обладал T-значением не более 0,9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения T-значение первого фермента составляет не более 0,8, предпочтительно не более 0,7 и еще более предпочтительно не более 0,6. Например, T-значение первого фермента может составлять не более 0,5. Предпочтительно T-значение первого фермента может составлять не более 0,4. Может являться даже более предпочтительным, чтобы T-значение первого фермента составляло не более 0,3.

Еще более низкие T-значения могут являться предпочтительными, например не более 0,2.

Пригодный первый фермент можно, например, получать из пептида (β -галактозидазы), полученного, как описано в примерах 1 и 2.

Другие примеры пригодных первых ферментов, обладающих трансгалактозилирующей активностью, можно найти в WO 2011/120993 A1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первый фермент может содержать одну или несколько гликозилированных аминокислот. Альтернативно или в дополнение, первый фермент может содержать одну или несколько фосфорилированных аминокислот. Альтернативно, ни одна из аминокислот первого фермента не является гликозилированной или фосфорилированной.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения первый фермент содержит по меньшей мере две субъединицы, причем каждая субъединица состоит из первого фермента, определенного выше.

Первый фермент предпочтительно контактирует со смесью, и в связи с этим его приводят в контакт как с галактозильным акцептором, так и с галактозильным донором.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения смесь содержит первый фермент и/или второй фермент. Первый фермент и/или второй фермент могут, например, присутствовать в смеси в растворенной форме, например в виде отдельных молекул фермента или в виде растворимого агрегата молекул фермента.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения первый фермент и/или второй фермент находятся отдельно от смеси, но их приводят в контакт с галактозильным акцептором и галактозильным донором путем контактирования первого фермента и/или второго фермента со смесью. Например, можно применять первый фермент и/или второй фермент, иммобилизованные на неподвижной твердой фазе. Примерами применимых неподвижных твердых фаз являются, например, фильтр, плотный слой частиц, содержащих первый фермент или подобные структуры.

Альтернативно, твердая фаза может, например, являться сыпучей, состоящей из частиц твердой фазой, например органическими или неорганическими гранулами, образующими часть смеси.

Детали, относящиеся к промышленному применению ферментов, включая способы иммобилизации и пригодные типы твердых фаз, можно найти в Buchholz (2005).

Первый фермент предпочтительно применяют в достаточной активности с получением приемлемого выхода галактоолигосахаридов. Оптимальная активность зависит от конкретного осуществления способа и может легко определяться специалистом в данной области.

Если требуется высокий оборот галактозильного донора и высокий выход галактоолигосахаридов, может быть предпочтительным применение первого фермента в относительно высокой активности. Например, активность первого фермента может быть таковой, что оборот галактозильного донора составляет по меньшей мере 0,02 моль/(л·ч), предпочтительно по меньшей мере 0,2 моль/(л·ч) и даже более предпочтительно по меньшей мере 2 моль/(л·ч).

Ферментативная реакция происходит в течение инкубации на этапе с). Как только смесь подвергается воздействию соответствующих условий, что может происходить практически немедленно при осуществлении контакта галактозильного акцептора и галактозильного донора с первым ферментом, обычно

начинается трансгалактозилирование, а в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения этапы b) и c) происходят одновременно.

Первый фермент способен высвобождать отщепляемую группу галактозильного донора и переносить галактозильную группу галактозильного донора к галактозильному акцептору. Например, если галактозильным донором является лактоза, высвобождается глюкоза и галактозильная группа переносится к акцептору. Первый фермент действует в качестве катализатора в течение ферментативной реакции.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения первый фермент к тому же переносит галактозильную группу к уже галактозилированным галактозильным акцепторам, тем самым образуя галактозильные акцепторы, содержащие две, три или даже более галактозильные группы.

Значение pH инкубационной смеси предпочтительно близко к оптимальному pH первого фермента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения pH инкубационной смеси в течение этапа c) составляет 3-9. Например, pH инкубационной смеси в течение этапа c) может составлять 4-8, например 5-7,5.

Подобно pH, температуру инкубационной смеси предпочтительно доводят до оптимальной температуры используемого первого фермента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения температура инкубации смеси этапа c) составляет 10-80°C. Температура инкубационной смеси может, например, составлять 20-70°C, предпочтительно 25-60°C и даже более предпочтительно 30-50°C.

В контексте настоящего изобретения выражение "оптимальный pH первого фермента" относится к pH, при котором первый фермент обладает наивысшей трансгалактозилирующей активностью. Аналогичным образом, выражение "оптимальная температура первого фермента" относится к температуре, при которой первый фермент обладает наивысшей трансгалактозилирующей активностью.

Этап c) может дополнительно включать перемешивание инкубационной смеси.

Удаление свободных отщепляемых групп происходит в течение инкубации на этапе c). Удаление может, например, начинаться немедленно в момент начала этапа c) или его можно отложить до начала накопления значительного количества свободных отщепляемых групп в инкубационной смеси.

Свободные отщепляемые группы можно, например, удалять из инкубационной смеси с помощью микроорганизмов, присутствующих в инкубационной смеси.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает получение микроорганизма, который способен превращать свободные отщепляемые группы, высвобожденные из галактозильного донора, и предоставление возможности указанному микроорганизму удалить в течение инкубации отщепляемую группу, высвобожденную из галактозильного донора.

Пригодные микроорганизмы предпочтительно способны избирательно удалять свободные отщепляемые группы из инкубационной смеси и, например, метаболизировать или превращать их в продукты превращения, которые в меньшей степени препятствуют синтезу галактоолигосахаридов, чем отщепляемая группа.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения скорость удаления микроорганизмом свободной отщепляемой группы по меньшей мере в 10 раз выше, чем скорость удаления им галактозильного акцептора.

Например, скорость удаления микроорганизмом свободной отщепляемой группы, может быть по меньшей мере в 10^2 раз выше, чем скорость удаления им галактозильного акцептора, предпочтительно по меньшей мере в 10^3 раз выше и даже более предпочтительно по меньшей мере в 10^4 раз выше, чем скорость удаления им галактозильного акцептора. Скорость удаления микроорганизмом свободной отщепляемой группы может, например, быть по меньшей мере в 10^5 раз выше, чем скорость удаления им галактозильного акцептора. Может даже быть предпочтительным, чтобы скорость удаления микроорганизмом свободной отщепляемой группы была по меньшей мере в 10^6 раз выше и даже более предпочтительно по меньшей мере в 10^7 раз выше, чем скорость удаления им галактозильного акцептора.

В контексте настоящего изобретения выражение "скорость удаления" относится к числу молей свободной отщепляемой группы, донора, акцептора или моногалактозилированного акцептора, которое микроорганизм способен удалить из инкубационной смеси за 1 мин.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения скорость удаления микроорганизмом свободной отщепляемой группы по меньшей мере в 10 раз выше, чем скорость удаления им галактозильного донора.

Например, скорость удаления микроорганизмом свободной отщепляемой группы может быть по меньшей мере в 10^2 раз выше, чем скорость удаления им галактозильного донора, предпочтительно по меньшей мере в 10^3 раз выше и даже более предпочтительно по меньшей мере в 10^4 раз выше, чем скорость удаления им галактозильного донора. Скорость удаления микроорганизмом свободной отщепляемой группы может, например, быть по меньшей мере в 10^5 раз выше, чем скорость удаления им галактозильного донора. Может даже быть предпочтительным, чтобы скорость удаления микроорганизмом свободной отщепляемой группы была по меньшей мере в 10^6 раз выше и даже более предпочтительно по меньшей мере в 10^7 раз выше, чем скорость удаления им галактозильного донора.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения скорость удаления микроорганизмом свободной отщепляемой группы по меньшей мере в 10 раз выше, чем скорость удаления им моногалактозилированного галактозильного акцептора.

Например, скорость удаления микроорганизмом свободной отщепляемой группы может быть по меньшей мере в 10^2 раз выше, чем скорость удаления им моногалактозилированного галактозильного акцептора, предпочтительно по меньшей мере в 10^3 раз выше и даже более предпочтительно по меньшей мере в 10^4 раз выше, чем скорость удаления им моногалактозилированного галактозильного акцептора. Скорость удаления микроорганизмом свободной отщепляемой группы может, например, быть по меньшей мере в 10^5 раз выше, чем скорость удаления им моногалактозилированного галактозильного акцептора. Может даже быть предпочтительным, чтобы скорость удаления микроорганизмом свободной отщепляемой группы была по меньшей мере в 10^6 раз выше и даже более предпочтительно по меньшей мере в 10^7 раз выше, чем скорость удаления им моногалактозилированного галактозильного акцептора.

Микроорганизм предпочтительно является дрожжами или бактерией.

Saccharomyces cerevisiae является примером пригодных дрожжей, а пригодными бактериями могут являться, например, *Lac Z*-отрицательные штаммы *E.coli* или другие бактерии, которые могут метаболизировать глюкозу, но не лактозу.

Альтернативно или дополнительно, свободные отщепляемые группы можно удалять из инкубационной смеси с помощью специфических ферментов, которые превращают отщепляемые группы в другие химические соединения.

Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает обеспечение присутствия второго фермента, который способен превращать свободные отщепляемые группы, высвобожденные из галактозильного донора, и предоставление возможности указанному второму ферменту в течение инкубации превращать отщепляемую группу, высвобожденную из галактозильного донора.

Выражение "превращение свободных отщепляемых групп" относится к способу превращения свободных отщепляемых групп в химические соединения, которые предпочтительно являются более слабыми галактозильными акцепторами, чем сами свободные отщепляемые группы. Превращение может включать деградацию свободной отщепляемой группы на несколько более мелких химических соединений или может просто включать трансформацию свободной отщепляемой группы в различные химические соединения.

Настоящее изобретение может, например, относиться к способу получения композиции, содержащей один или несколько галактоолигосахаридов, причем способ включает этапы:

- a) получение смеси, содержащей
 - галактозильный донор, содержащий галактозильную группу, связанную с отщепляемой группой, причем галактозильный донор обладает молярной массой не более 350 г/моль,
 - галактозильный акцептор, который отличается от галактозильного донора, причем указанный галактозильный акцептор является сахаридом или сахароспиртом, и
 - где молярное соотношение между галактозильным акцептором и галактозильным донором составляет по меньшей мере 1:10 и где смесь содержит по меньшей мере 0,05 моль/л галактозильного акцептора;
- b) обеспечение присутствия первого фермента и второго фермента, причем указанный первый фермент обладает β -галактозидазной активностью и T-значением не более 0,9, при этом указанный второй фермент способен превращать свободные отщепляемые группы, высвобожденные из галактозильного донора, и указанные первый и второй ферменты контактируют со смесью; и
- c) предоставление возможности первому ферменту высвободить отщепляемую группу галактозильного донора и перенести галактозильную группу галактозильного донора к галактозильному акцептору, таким образом образуя галактоолигосахарид, и предоставление возможности второму ферменту превращать отщепляемую группу, высвобожденную из галактозильного донора, с получением в результате композиции, содержащей галактоолигосахарид.

Второй фермент может, например, обладать гексозооксидазной активностью, т.е. принадлежать к классу ферментов EC 1.1.3.5, и обладать способностью катализировать окисление бета-D-глюкозы с помощью O_2 с образованием D-глюконо-1,5-лактона и перекиси водорода.

Даже более предпочтительно, чтобы второй фермент обладал глюкозооксидазной активностью, т.е. принадлежал к классу ферментов EC 1.1.3.4, и обладал способностью катализировать окисление бета-D-глюкозы с помощью O_2 с образованием D-глюконо-1,5-лактона и перекиси водорода без существенного окисления содержащих глюкозу дисахаридов, таких как лактоза.

В водной кислой среде D-глюконо-1,5-лактон, как правило, гидролизует с образованием глюконовой кислоты.

Альтернативно, второй фермент может обладать гексокиназной активностью (EC 2.7.1.1) или глюкокиназной активностью (EC 2.7.1.2).

Другие пригодные вторые ферменты можно найти, например, в справочниках, которые доступны специалисту в данной области.

Предпочтительно, чтобы второй фермент являлся избирательным в превращении свободных отщепляемых групп и только в определенных пределах, а предпочтительно, чтобы вообще не превращал галактозильный донор, галактозильный акцептор и/или галактоолигосахариды.

Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе по меньшей мере в 10^2 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору.

Например, константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе может быть по меньшей мере в 10^2 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору, предпочтительно по меньшей мере в 10^3 раз выше и даже более предпочтительно по меньшей мере в 10^4 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору. Константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе может быть, например, по меньшей мере в 10^5 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору. Может даже быть предпочтительным, чтобы константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе была по меньшей мере в 10^6 раз выше и даже более предпочтительно по меньшей мере в 10^7 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору.

Выражение "константа специфичности" определяется как k_{cat}/K_m и включает константы скорости для всех этапов в реакции. Поскольку константа специфичности отражает как аффинность, так и каталитическую способность, она применима для сравнения различных ферментов друг с другом или одного и того же фермента с различными субстратами. Теоретический максимум для константы специфичности называется пределом диффузии и составляет приблизительно от 10^8 до 10^9 ($M^{-1} \cdot s^{-1}$). В данный момент каждое столкновение фермента с его субстратом приведет к катализу, а скорость образования продукта ограничивается не скоростью реакции, а скоростью диффузии.

k_{cat} и K_m второго фермента определяются при $37^\circ C$ с использованием 50 мМ буфера Na_3PO_4 , доведенного до pH 6,5. Буфер дополнительно содержит соли и кофакторы, которые требуются для достижения оптимальных свойств фермента. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе по меньшей мере в 10 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору.

Например, константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе может быть по меньшей мере в 10^2 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору, предпочтительно по меньшей мере 10^3 раз выше и даже более предпочтительно по меньшей мере в 10^4 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору. Константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе может быть, например, по меньшей мере в 10^5 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору. Может даже быть предпочтительным, чтобы константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе была по меньшей мере в 10^6 раз выше и даже более предпочтительно по меньшей мере в 10^7 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе по меньшей мере в 10 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору (Gal-X).

Например, константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе может быть по меньшей мере в 10^2 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору, предпочтительно по меньшей мере в 10^3 раз выше и даже более предпочтительно по меньшей мере в 10^4 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору. Константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе может быть, например, по меньшей мере в 10^5 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору. Может даже быть предпочтительным, чтобы константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе была по меньшей мере в 10^6 раз выше и даже более предпочтительно по меньшей мере в 10^7 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе является

по меньшей мере в 10 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору;

по меньшей мере в 10 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору; и

по меньшей мере в 10 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору.

Например, константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе может быть

по меньшей мере в 10^2 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору;

по меньшей мере в 10^2 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору; и

по меньшей мере в 10^2 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору.

Предпочтительно константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе

по меньшей мере в 10^3 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору;

по меньшей мере в 10^3 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору; и

по меньшей мере, в 10^3 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору.

Альтернативно, константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе может быть

по меньшей мере в 10^4 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору;

по меньшей мере в 10^4 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору; и

по меньшей мере в 10^4 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору.

Константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе может быть

по меньшей мере в 10^5 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору;

по меньшей мере в 10^5 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору; и

по меньшей мере в 10^5 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору.

Даже более предпочтительно, чтобы константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе была

по меньшей мере в 10^6 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору;

по меньшей мере в 10^6 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору; и

по меньшей мере в 10^6 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору.

Константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе может быть, например,

по меньшей мере в 10^7 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору;

по меньшей мере в 10^7 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору; и

по меньшей мере в 10^7 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору.

Особенно предпочтительно, чтобы второй фермент обладал глюкозооксидазной активностью, а отщепляемая группа галактозильного донора являлась глюкозильной группой, в таком случае свободной отщепляемой группой является глюкоза. Если второй фермент обладает глюкозооксидазной активностью, лактоза является предпочтительным галактозильным донором.

Глюкозооксидаза требует O_2 в качестве окислителя, и может потребоваться добавить дополнительный O_2 (г) к инкубационной смеси, если нормальное количество растворенного O_2 в воде является недостаточным. Также возможно добавлять кофакторы, такие как FAD (флавинадениндинуклеотид) или NAD (никотинамидадениндинуклеотид), к инкубационной смеси, при необходимости.

Как упоминалось выше, H_2O_2 образуется, когда глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы в D-глюконо-1,5-лактон, и высокие уровни H_2O_2 могут являться проблематичными для способа, например, в связи с нежелательным окислением используемых ферментов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает этап, на котором обеспечивают присутствие пероксидазы или каталазы, которая контактирует с инкубационной смесью и которая катализирует распад H_2O_2 , например, на H_2O и O_2 . Как глюкозооксидазы, так и каталазы хорошо известны в данной

области и коммерчески доступны. Примером пригодной глюкозооксидазы является Glyzyme BG (Novozymes, Дания). Примером пригодного фермента каталазы является Catazyme 25L (Novozymes, Дания). Другим примером является фермент каталаза из *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, Дания).

Способ может дополнительно включать приведение в контакт инкубационной смеси с лактоназой и предпочтительно с глюконолактоназой (ЕС 3.1.1.17), т.е. ферментом, способным гидролизовать D-глюконо-1,5-лактон в глюконовую кислоту или ее соответствующий основной глюконат.

Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения инкубационную смесь приводят в контакт с ферментом, обладающим глюкозооксидазной активностью, ферментом, обладающим глюкозооксидазной активностью, каталазной активностью, и ферментом, обладающим глюконолактоназой активностью.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает обеспечение присутствия средства для удаления, способного удалять, по меньшей мере, некоторые из продуктов превращения, полученных путем превращения отщепляемой группы с помощью второго фермента, и предоставление возможности средству для удаления во время инкубации удалять, по меньшей мере, некоторые из продуктов превращения.

В контексте настоящего изобретения выражение "средство для удаления" относится к состоящему из частиц или молекулярному средству, способному захватывать продукт превращения и удалять его из инкубационной смеси, например, путем осаждения.

Средство для удаления может, например, содержать соль иона двухвалентного или трехвалентного металла или даже состоять из них. Примерами пригодных ионов металлов являются Ca^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} или Zn^{2+} .

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения средство для удаления содержит CaCO_3 или даже состоит из него.

Отрицательно заряженные продукты превращения, такие как, например, глюконат, депротонированная форма глюконовой кислоты, можно удалить с помощью анионообменной хроматографии.

Таким образом, средство для удаления может содержать анионообменный материал или даже состоять из него.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анионообменный материал содержит твердую фазу и одну или несколько катионных групп.

Предпочтительно, по меньшей мере, некоторые из катионных групп присоединены к наружной поверхности твердой фазы и/или к поверхности пор, которые доступны через поверхность твердой фазы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения твердая фаза анионообменного материала содержит один или несколько компонентов, выбранных из группы, состоящей из множества частиц, фильтра и мембраны.

Твердая фаза может, например, содержать полисахариды или даже состоять из них. Поперечно сшитые полисахариды являются особенно предпочтительными. Примерами пригодных полисахаридов являются целлюлоза, агароза и/или декстран. Альтернативно, твердая фаза может содержать неуглеводный полимер или даже состоять из него. Примерами пригодных неуглеводных полимеров являются метакрилат, полистирол и/или стирол-дивинилбензол.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения катионные группы содержат аминогруппы или даже состоят из них. Третичные аминогруппы являются особенно предпочтительными и приводят к образованию четвертичных аммониевых групп при соответствующих условиях pH. Четвертичные аммониевые группы обеспечивают сильные анионообменные характеристики анионообменному материалу.

Альтернативно или дополнительно, катионные группы могут содержать одну или несколько первичных или вторичных аминогрупп. Значительное количество первичных или вторичных аминогрупп обычно обеспечивает анионообменный материал слабыми анионообменными характеристиками.

Более подробную информацию относительно анионообменной хроматографии и ее промышленной реализации можно найти в Scores.

Если для захвата продукта превращения применяют анионообменный материал, общая связывающая способность анионообменного материала может составлять, например, по меньшей мере 30% (моль/моль) относительно общего количества продукта превращения, полученного в течение инкубации. Например, общая связывающая способность анионообменного материала может составлять по меньшей мере 50% (моль/моль) относительно общего количества продукта превращения, полученного в течение инкубации. Альтернативно, общая связывающая способность анионообменного материала может составлять по меньшей мере 80% (моль/моль) относительно общего количества продукта превращения, полученного в течение инкубации.

При использовании средство для удаления предпочтительно присутствует в количестве, достаточном для осаждения или захвата теоретического количества превращенной отщепляемой группы, образованной в процессе синтеза.

Таким образом, общая связывающая способность анионообменного материала может составлять, например, по меньшей мере 100% (моль/моль) относительно общего количества продукта превращения,

полученного в течение инкубации. Например, общая связывающая способность анионообменного материала может составлять, по меньшей мере 150% (моль/моль) относительно общего количества продукта превращения, полученного в течение инкубации. Альтернативно, общая связывающая способность анионообменного материала может составлять, по меньшей мере 200% (моль/моль) относительно общего количества продукта превращения, полученного в течение инкубации.

Общее количество продукта превращения, полученного в течение инкубации, можно оценить, например, исходя из планируемых условий процесса и кинетических данных, относящихся к применяемому ферменту(ам).

Альтернативно, ожидаемое количество высвобожденных отщепляемых групп можно использовать в качестве руководства для дозирования анионообменного материала. Таким образом, общая связывающая способность анионообменного материала может составлять, например, по меньшей мере 30% (моль/моль) относительно общего количества отщепляемых групп, высвобожденных в течение инкубации. Например, общая связывающая способность анионообменного материала может составлять по меньшей мере 50% (моль/моль) относительно общего количества отщепляемых групп, высвобожденных в течение инкубации. Альтернативно, общая связывающая способность анионообменного материала может составлять по меньшей мере 80% (моль/моль) относительно общего количества отщепляемых групп, высвобожденных в течение инкубации.

Общая связывающая способность анионообменного материала может составлять, например, по меньшей мере 100% (моль/моль) относительно общего количества отщепляемых групп, высвобожденных в течение инкубации. Например, общая связывающая способность анионообменного материала может составлять по меньшей мере 150% (моль/моль) относительно общего количества отщепляемых групп, высвобожденных в течение инкубации. Альтернативно, общая связывающая способность анионообменного материала может составлять по меньшей мере 200% (моль/моль) относительно общего количества отщепляемых групп, высвобожденных в течение инкубации.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что способ по настоящему изобретению, к удивлению, предусматривает высокий выход галактоолигосахаридов даже в том случае, если применяется относительно низкая концентрация галактозильного донора. Относительно низкая концентрация галактозильного донора дополнительно снижает степень самогалактозилирования донора, т.е. когда галактозильная группа первого галактозильного донора переносится ко второму галактозильному донору вместо галактозильного акцептора.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения этап с) включает добавление дополнительного галактозильного донора к смеси. Данное является особенно предпочтительным при применении относительно низкой концентрации галактозильного донора. Добавление еще одного галактозильного донора позволяет избежать истощения галактозильного донора в смеси, и концентрацию галактозильного донора можно контролировать в течение ферментативной реакции.

Добавление дополнительного галактозильного донора может включать дискретное добавление(я) галактозильного донора, например, по меньшей мере один раз в течение ферментативной реакции. Альтернативно или дополнительно, добавление дополнительного галактозильного донора может быть непрерывным добавлением в течение ферментативной реакции. Дополнительный галактозильный донор относится, предпочтительно, к тому же типу, что и применяемый на этапе а).

Этап с) может, например, включать измерение концентрации галактозильного донора в течение инкубации и добавление дополнительного галактозильного донора, если концентрация является слишком низкой.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения концентрацию галактозильного донора смеси в течение этапа с) поддерживают при концентрации в диапазоне 0,01-1 моль/л, предпочтительно в диапазоне 0,01-0,5 моль/л и предпочтительно в диапазоне 0,03-0,3 моль/л.

Например, концентрация галактозильного донора смеси в течение этапа с) может поддерживаться при концентрации в диапазоне 0,02-0,1 моль/л.

Этап с) может к тому же включать добавление дополнительного галактозильного акцептора. Данное дает возможность контролировать концентрацию галактозильного акцептора смеси в течение этапа с) и, например, удерживать концентрацию галактозильного акцептора, по существу, постоянной, при необходимости.

Для получения значительных количеств галактоолигосахаридов, которые содержат две или три перенесенные галактозильные группы, в способе следует использовать больше галактозильного донора, чем галактозильного акцептора. При этом больше галактозильных акцепторов станут галактозилированными два или три раза. Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения молярное соотношение между использованным галактозильным донором и использованным галактозильным акцептором составляет по меньшей мере 1:1 и предпочтительно по меньшей мере 5:1 и даже более предпочтительно по меньшей мере 10:1.

Этап с), как правило, завершают путем инактивации ферментов, например, путем денатурации первого фермента с помощью термообработки или путем прерывания контакта между первым ферментом и

углеводами инкубированной смеси. Если первый фермент является ферментом, иммобилизованным на твердой фазе, контакт можно прервать, например, путем разделения твердой фазы и инкубированной смеси. Если первый фермент растворен в смеси, первый фермент можно отделить от инкубированной смеси путем ультрафильтрации с использованием фильтра, который задерживает первый фермент, но обеспечивает прохождение олигосахаридов.

Зачастую требуется обогатить и/или очистить галактоолигосахариды композиции и уменьшить концентрацию галактозильного акцептора, галактозильного донора и высвобожденной отщепляемой группы.

Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает этап d) обогащения галактоолигосахаридов композиции этапа с).

В контексте настоящего изобретения выражение "обогащение галактоолигосахаридов" относится к повышению относительного количества галактоолигосахаридов композиции на основе веса в сухом состоянии. Как правило, данное осуществляется путем удаления некоторых других твердых веществ композиции, например, низших сахаридов и, необязательно, также первого фермента, при необходимости.

Обогащение на этапе d) может, например, включать хроматографическое разделение и/или нанофильтрацию. Подробная информация относительно данных способов описана в Walstra et al. (2006).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения обогащение предусматривает, что по меньшей мере 50% (в весовом отношении на основе веса в сухом состоянии) молекул, обладающих молярной массой не более 200 г/моль, удаляют из композиции этапа с). Например, обогащение может предусматривать, что по меньшей мере 80% (в весовом отношении на основе веса в сухом состоянии) молекул, обладающих молярной массой не более 200 г/моль, удаляют из композиции этапа с).

В других вариантах осуществления настоящего изобретения обогащение предусматривает, что по меньшей мере 50% (в весовом отношении на основе веса в сухом состоянии) молекул, обладающих молярной массой не более 350 г/моль, удаляют из композиции этапа с). Например, обогащение может предусматривать, что по меньшей мере 80% (в весовом отношении на основе веса в сухом состоянии) молекул, обладающих молярной массой не более 350 г/моль, удаляют из композиции этапа с).

В качестве альтернативы или в дополнение к обогащению может быть предпочтительным, чтобы этап d) включал один или несколько способов, которые увеличивают концентрацию галактоолигосахаридов в композиции. Примерами пригодных этапов концентрирования являются, например, обратный осмос, выпаривание и/или сушка распылением.

Этап d) может дополнительно включать удаление средства для удаления и/или превращенных отщепляемых групп, связанных со средством для удаления, из композиции этапа с). Такое удаление можно осуществлять, например, путем фильтрации, седиментации или центрифугирования.

Композиция, содержащая галактоолигосахариды, полученная данным способом, может находиться, например, в форме сухого порошка или в форме сиропа.

Получение сухого порошка, как правило, требует одного или нескольких этапов процесса, таких как концентрирование, выпаривание и/или распылительная сушка. Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения этап d) дополнительно включает концентрирование, выпаривание и/или распылительную сушку композиции в жидкой форме с получением композиции в виде порошка. Особенно предпочтительной является распылительная сушка жидкой композиции из этапа d) с получением порошкообразной композиции. Этап d) может включать, например, этап обогащения с последующим этапом концентрирования, например нанофильтрации, обратного осмоса или выпаривания, с последующим этапом распылительной сушки. Альтернативно, этап d) может включать этап концентрирования с последующим этапом обогащения, с последующим этапом распылительной сушки. Концентрирование галактоолигосахаридов композиции до обогащения может сделать последующий процесс обогащения экономически эффективным.

Эффективная распылительная сушка может требовать добавления одного или нескольких вспомогательных средств, например мальтодекстрина, молочного белка, казеината, концентрата сывороточного белка и/или сухого обезжиренного молока.

Настоящий способ можно, например, осуществлять в виде периодического процесса. Настоящий способ можно, альтернативно, осуществлять в виде периодического процесса с подпиткой. Настоящий способ можно, альтернативно, осуществлять в виде непрерывного процесса.

Настоящий способ может дополнительно включать рециркуляцию первого фермента и/или неиспользованного галактозильного акцептора обратно в смесь. Рециркуляция может, например, быть частью этапа d). Например, этап d) может включать выделение галактозильного акцептора и/или первого фермента из композиции, содержащей галактоолигосахариды, и возвращение галактозильного акцептора и/или первого фермента на этап а) или с). В случае периодического процесса или периодического процесса с подпиткой галактозильный акцептор и/или первый фермент можно возвращать в смесь следующей партии.

В случае непрерывного процесса галактозильный акцептор можно возвращать обратно в часть технологической линии, соответствующей этапу а) или этапу с). Первый фермент можно возвращать обратно в часть технологической линии, соответствующей этапу b) или этапу с).

Следует отметить, что подробности и особенности, связанные с этапами а) и б), необязательно относятся к фактическому началу производственного процесса, но они должны, по меньшей мере, встречаться иногда в течение данного процесса. Однако в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация галактозильного донора поддерживается в диапазоне, описанном на этапе а), в течение всего периода этапа с).

Если способ осуществляется в виде периодического процесса или периодического процесса с подпиткой, этап а) предпочтительно относится к композиции смеси при начале синтеза. Если способ является непрерывным процессом, этап а) предпочтительно относится к композиции смеси в течение синтеза при стационарном режиме.

Может рассматриваться как необходимое, чтобы уровень галактозилированного галактозильного донора поддерживался настолько низким, насколько возможно, так как галактозилированный галактозильный донор может рассматриваться как нежелательная примесь, которую сложно отделить от галактозилированного галактозильного акцептора. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения инкубационная смесь этапа с) содержит не более 0,5 моль/л галактозилированного галактозильного донора. Инкубационная смесь этапа с) может содержать, например, не более 0,1 моль/л галактозилированного галактозильного донора. Даже более предпочтительно инкубационная смесь этапа с) содержит не более 0,01 моль/л галактозилированного галактозильного донора и предпочтительно, по существу, не содержит галактозилированного галактозильного донора.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, если донором является лактоза, общая концентрация аллолактозы и галактозилированной аллолактозы поддерживалась настолько низкой, насколько возможно, так как данные соединения также рассматриваются как нежелательные примеси, которые трудно отделить от галактозилированного галактозильного акцептора.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения инкубационная смесь этапа с) содержит общее количество аллолактозы и галактозилированной аллолактозы не более 0,5 моль/л. Инкубационная смесь этапа с) может содержать, например, общее количество аллолактозы и галактозилированной аллолактозы не более 0,1 моль/л. Даже более предпочтительно инкубационная смесь этапа с) содержит общее количество аллолактозы и галактозилированной аллолактозы не более 0,01 моль/л и предпочтительно, по существу, вообще не содержит аллолактозы и галактозилированной аллолактозы.

Еще аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей галактоолигосахариды, причем композицию можно получить способом, определенным в данном документе.

Дополнительным аспектом настоящего изобретения является композиция, содержащая галактоолигосахариды, например, вышеупомянутая композиция, причем указанная композиция, содержащая галактоолигосахариды, содержит

первый галактоолигосахарид, обладающий общей формулой Gal-X;

второй галактоолигосахарид, обладающий стехиометрической формулой (Gal)₂X, такой как, например, общей формулой Gal-Gal-X,

третий галактоолигосахарид, обладающий стехиометрической формулой (Gal)₃X, такой как, например, общей формулой Gal-Gal-Gal-X,

где X является гликозильной группой, которая не является лактозильной или глюкозильной.

Композиция, содержащая галактоолигосахарид, описанная в данном документе, может быть, например, пищевым ингредиентом.

Как описано выше, "X" или "-X" является предпочтительно гликозильной группой одного из галактозильных акцепторов, упоминающихся в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения "X" или "-X" является гликозильной группой моносахарида, который не является глюкозой. В других вариантах осуществления настоящего изобретения "-X" является гликозильной группой дисахарида, который не является лактозой.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения "X" или "-X" является фукозильной группой. В других предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения "X" или "-X" является галактозильной группой.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая галактоолигосахариды, обладает молярным соотношением между общим количеством галактоолигосахаридов Gal-X, (Gal)₂X и (Gal)₃X и общим количеством галактоолигосахаридов Gal-Glc, Gal₂Glc, Gal₃Glc по меньшей мере 5:95. Например, вышеупомянутое молярное соотношение может составлять по меньшей мере 1:4, предпочтительно по меньшей мере 1:1 и даже более предпочтительно по меньшей мере 2:1. Может даже являться предпочтительным, чтобы вышеупомянутое молярное соотношение составляло по меньшей мере 5:1, предпочтительно по меньшей мере 10:1 и даже более предпочтительно по меньшей мере 20:1.

В других предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая галактоолигосахариды, обладает молярным соотношением между общим количеством галактоолигосахаридов Gal-X, Gal-Gal-X, и Gal-Gal-Gal-X и общим количеством галактоолигосахаридов Gal-Glc, Gal-Gal-Glc, Gal-Gal-Gal-Glc по меньшей мере 5:95. Например, вышеупомянутое молярное соот-

ношение может составлять по меньшей мере 1:4, предпочтительно по меньшей мере 1:1 и даже более предпочтительно по меньшей мере 2:1. Может даже являться предпочтительным, чтобы вышеупомянутое молярное соотношение составляло по меньшей мере 5:1, предпочтительно по меньшей мере 10:1 и даже более предпочтительно по меньшей мере 20:1.

Возможно даже, что композиция, содержащая галактоолигосахариды, вообще не содержит никаких галактоолигосахаридов формулы Gal-Glc, Gal-Gal-Glc и Gal-Gal-Gal-Glc.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая галактоолигосахариды, обладает молярным соотношением между первым галактоолигосахаридом, вторым галактоолигосахаридом и третьим галактоолигосахаридом в диапазоне 50-99:1-45:0,5-25.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая галактоолигосахариды, обладает молярным соотношением между первым галактоолигосахаридом, вторым галактоолигосахаридом и третьим галактоолигосахаридом в диапазоне 20-45:20-45:20-45.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая галактоолигосахариды, обладает молярным соотношением между первым галактоолигосахаридом, вторым галактоолигосахаридом и третьим галактоолигосахаридом в диапазоне 0,5-25:1-45:50-98.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая галактоолигосахариды, содержит общее количество первого галактоолигосахариды, второго галактоолигосахариды и третьего галактоолигосахариды по меньшей мере 10 вес.% относительно общего веса композиции, содержащей галактоолигосахариды. Например, композиция, содержащая галактоолигосахариды, может содержать общее количество первого галактоолигосахариды, второго галактоолигосахариды и третьего галактоолигосахариды по меньшей мере 20 вес.% относительно общего веса композиции, содержащей галактоолигосахариды, предпочтительно по меньшей мере 30 вес.%, даже более предпочтительно по меньшей мере 40% относительно общего веса композиции, содержащей галактоолигосахариды.

Даже более высокие уровни первого, второго и третьего галактоолигосахаридов могут являться предпочтительными. Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая галактоолигосахариды, содержит общее количество первого галактоолигосахариды, второго галактоолигосахариды и третьего галактоолигосахариды по меньшей мере 50 вес.% относительно общего веса композиции, содержащей галактоолигосахариды. Например, композиция, содержащая

галактоолигосахариды, может содержать общее количество первого галактоолигосахариды, второго галактоолигосахариды и третьего галактоолигосахариды по меньшей мере 60 вес.% относительно общего веса композиции, содержащей галактоолигосахариды, предпочтительно по меньшей мере 70 вес.%, даже более предпочтительно по меньшей мере 80% относительно общего веса композиции, содержащей галактоолигосахариды.

Еще аспект настоящего изобретения относится к пищевому продукту, который содержит композицию, содержащую галактоолигосахариды, описанную в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пищевой продукт является функциональным пищевым продуктом, таким как детская смесь или продукт для лечебного питания.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения пищевой продукт является выпеченным продуктом, например содержащим выпеченное тесто, таким как хлеб или подобные продукты.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения пищевой продукт является молочным продуктом, например свежим молочным продуктом, таким как молоко, или кисломолочным продуктом, таким как йогурт.

Еще в дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения пищевой продукт является кормом для домашних животных.

Следует отметить, что варианты осуществления и признаки, описанные в контексте одного из аспектов настоящего изобретения, также применимы и к другим аспектам настоящего изобретения.

Настоящее изобретение далее будет описано более подробно в следующих неограничивающих примерах.

Примеры

Пример 1. Получение β -галактозидазы, обладающей трансгалактозилирующей активностью.

В рабочий объем 750 мл ферментационной среды вносили 2 мл заквасочной культуры в лизогенном бульоне (среде LB) со 100 мг/л ампициллина с OD_{600} 3,0, выращиваемой в течение 12 ч. Ферментацию проводили в среде EC, содержащей 2% (вес./об.) дрожжевого экстракта, 2% (вес./об.) соевого пептона, 1% (вес./об.) глюкозы и 100 мг/л ампициллина. Штамм *E.coli*, экспрессирующий OLGA347 β -галактозидазу (обладающую последовательностью Val (33) - Ile (1174)) получали, как описано ранее (Jørgensen et al., WO 01/90317 и патент США № 6555348 B2, примеры 1 и 2). Использовали ферментер от Applikon со стеклянными сосудами с выпуклым дном, с общим объемом 2 л и оборудованный двумя мешалками Rushton. В течение ферментации pH поддерживали при pH 6,5 путем соответствующего добавления 2 М NaOH и 2 М H_3PO_4 и температуру поддерживали при 37°C. Кислород подавали барботированием воздухом со скоростью 1-2 л/мин и pO_2 поддерживали при 30% путем увеличения скорости перемешивания. Рост сопровождался автономными считываниями показаний при OD_{600} . Культуру собирали центрифугированием приблизительно через 10 ч роста при значении OD_{600} 29,7. 650 мл культурального супернатанта хранили при -20°C. Периплазматические белки выделяли из клеточного осадка с помощью осмотического шока путем ресуспендирования клеточного осадка в 200 мл сахарозного буфера (30 мМ трис-HCl, 40% сахарозы, 2 мМ EDTA, pH 7,5) и инкубирования в течение 10 мин при комнатной температуре. После центрифугирования супернатант выливали и осадок ресуспендировали в 200 мл холодной воды. Добавляли 83 мкл насыщенного раствора $MgCl_2$ и супернатант, содержащий периплазматические белки, собирали с помощью этапа центрифугирования. Периплазматическую фракцию стерилизовали посредством фильтрации через фильтр 0,2 мкм Millipak 40 и хранили при -20°C.

β -галактозидазную активность 200 мл периплазматической фракции и 650 мл культурального супернатанта определяли с использованием о-нитрофенил- β -D-галактопиранозида (ONPG) в качестве субстрата в соответствии с протоколом (J. Sambrook and D.W. Russell, *Molecular Cloning - A laboratory manual*, 3rd edition (2001), p. 17.48-17.51). Преобладание активности обнаруживали в периплазматической фракции (525 единиц, соответствующих 98%).

Пример 2. Получение второй β -галактозидазы, обладающей трансгалактозилирующей активностью.

Вторую β -галактозидазу (OLGA917) получали в соответствии со схемой, описанной в примере 1, но на основе экспрессии аминокислотной последовательности Val (33) - Glu (917).

Пример 3. Определение T-значения фермента β -галактозидазы.

T-значение фермента β -галактозидазы определяли в соответствии с анализом и формулой, приведенными ниже.

Анализ.

Получали 3,3 мл ферментного раствора, содержащего фермент β -галактозидазу, подлежащую тестированию, 10 мМ цитрата натрия, 1 мМ цитрата магния, 1 мМ цитрата кальция, воду Milli-Q (Millipore, США), и обладающего pH 6,5. Ферментный раствор должен содержать фермент β -галактозидазу в количестве, достаточном для использования 33% (вес./вес.) добавленной лактозы в течение 1 ч при условиях настоящего анализа. Температура ферментного раствора должна составлять 37°C.

В момент времени T_0 добавляли 82,5 мг моногидрата лактозы (для биохимии, Merck, Германия), смешивали с ферментным раствором и затем смесь инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Точно через 1 ч после T_0 собирали 100 мкл образца, разбавляли 1:5 с использованием воды Milli-Q и инактивировали путем нагревания до 85°C в течение 10 мин. Инактивированную смесь хранили при -20°C до определения характеристик.

Определение характеристик.

Определение количества (в моль) полученной галактозы и количества использованной лактозы (в моль) можно выполнять с использованием любого пригодного способа анализа. Например, разбавленную смесь можно анализировать с помощью HPLC в соответствии со способом, описанным Richmond et al. (1982) и Simms et al. (1994). Другие пригодные способы анализа описаны в El Razzi (2002).

Другим примером пригодного способа анализа является ISO 5765-2:2002 (IDF 79-2: 2002) "Сухое молоко, сухие смеси для мороженого и плавленый сыр - определение содержания лактозы - часть 2: ферментативный способ с использованием галактозного фрагмента лактозы" ("Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese - Determination of lactose content - Part 2: Enzymatic method utilizing the galactose moiety of the lactose").

Расчет T-значения.

T-значение рассчитывали в соответствии со следующей формулой, используя данные, полученные при определении характеристик разбавленной смеси из анализа:

$$T\text{-значение} = \frac{\text{количество полученной галактозы (моль)}}{\text{количество использованной лактозы (моль)}}$$

Пример - T-значение фермента OLGA347.

Вышеупомянутый анализ проводили с использованием фермента OLGA347 из примера 1.

Разбавленную смесь, полученную из анализа, анализировали в отношении превращенной (т.е. использованной) лактозы и образованной галактозы с помощью аналитической HPLC. Использовали прибор HPLC от Waters, оснащенный дифференциальным рефрактометром (RI-детектор) и колонкой BioRad Aminex HPX-87C (300×7,8 мм, 125-0055). Элюирование сахаридов проводили изократически с 0,05 г/л ацетата Ca (CaAcetate), скоростью потока 0,3 мл/мин и объемом вводимой пробы 20 мкл.

Полученные данные соответствующим образом откалибровали по начальным параметрам с помощью автоматизированного программного обеспечения, пики индивидуально идентифицировали и интегрировали. Количественную оценку проводили с применением внешних стандартов моногидрата лактозы (для биохимии, Merck, Германия), моногидрата D-(+)-глюкозы (для биохимии, Merck Eurolab, Франция) и D-(+)-галактозы (≥99%, Sigma-Aldrich, Италия).

Превращение лактозы и образование галактозы в каждый момент времени T рассчитывали из количественных данных. В момент времени T=1 ч в собранных 100 мкл образца превращено 29% лактозы, что соответствует 2,3 мкмоль лактозы. В момент времени T=1 в собранных 100 мкл образца образовано 0,5 мкмоль галактозы. Таким образом, T-значение можно рассчитать как $0,5 \text{ мкмоль} / 2,3 \text{ мкмоль} = 0,2$.

Разбавленную смесь, полученную из анализа, также анализировали в отношении превращенной (т.е. использованной) лактозы и образованной галактозы с помощью ферментативного способа ISO 5765-2. Использовали набор для анализа Boehringer Mannheim лактоза/D-галактоза от R-Biopharm (номер по каталогу 10 176 303 035) и тест выполняли в соответствии с протоколом. Ферментативный способ подтвердил T-значение фермента OLGA347, равное 0,2.

Пример - T-значение фермента OLGA917.

Вышеупомянутый анализ T-значения проводили с использованием фермента OLGA917, полученного в примере 2, и T-значение определяли в соответствии с процедурой, описанной выше.

T-значение фермента OLGA917 определили как 0,3.

Пример - T-значение стандартного фермента лактазы.

Вышеупомянутый анализ проводили с использованием коммерчески доступного стандартного фермента лактазы Lactozym Pure 2600L (Novozymes, Дания). Разбавленную смесь, полученную из анализа, анализировали, как описано для фермента OLGA347. Три- и тетрасахариды не присутствовали в обнаружимых количествах, и наблюдались равные количества глюкозы и галактозы. Соответствующее T-значение составляет 1.

Также определяли T-значения коммерчески доступной β-галактозидазы из *Escherichia coli* (номер продукта: G6008, Sigma-Aldrich, Германия) и *Aspergillus oryzae* (номер продукта: G5160, Sigma-Aldrich, Германия), и оба фермента обладали T-значением приблизительно 1,0.

Пример 4. Синтез L-фукозилсодержащих гетерогалактоолигосахаридов путем последовательного добавления молекул донора и превращения глюкозных отщепляемых групп.

L-(-)-фукозу и моногидрат лактозы в количествах, которые приведены в табл. 1, растворяли в 100 мл воды MilliQ. Каждый образец поддерживали при температуре 37°C и pH поддерживали на уровне 6,5 путем непрерывного добавления NaOH. Воздух постоянно прокачивали через смесь со скоростью 100 л/мин. Фермент глюкозооксидазу, GOX, DuPont, Дания, добавляли к образцу 2. Фермент глюкозооксидазу, Gluzyme, Novozymes, Дания, добавляли к образцу 3. Фермент каталазу из *Micrococcus lysodeikticus*, Sigma-Aldrich, Дания, добавляли к образцам 2 и 3. Фермент OLGA917 из примера 2 добавляли к каждому образцу. Воду MilliQ добавляли до общего объема процесса 250 мл. Данный момент времени определяли как T=0. Моногидрат лактозы добавляли к образцам в течение 5-часового периода с интервалами 30 мин.

Таблица 1

Образец	1 (Контроль)	2	3
Начальная концентрация L-фукозы	10 %	10 %	10 %
Начальная концентрация моногидрата лактозы	5 %	5%	5%
Добавление лактозы / 30 минут	2,63 г	2,63 г	2,63 г
Количество глюкозооксидазы	-	100,45 мг	110,50 мг
Удельная активность глюкозооксидазы	-	11000 Ед/г	10000 Ед/г
Количество каталазы	-	20 мкл	20 мкл
Удельная активность каталазы	-	170000 Ед/мл	170000 Ед/мл
Количество фермента OLGA	5 мл	5 мл	5 мл

Тестовые образцы от T=4 ч и T=5 ч анализировали с помощью HPLC в соответствии с примером 7 и установили, что они содержат значительные количества галактозилированной фукозы.

Пример 5. Синтез L-фукозилсодержащих гетерогалактоолигосахаридов и превращение и удаление глюкозных отщепляемых групп, но без последовательного добавления молекул донора.

L-(-)-фукозу и моногидрат лактозы в количествах, которые приведены в табл. 2, растворяли в 100 мл воды MilliQ. Каждый образец поддерживали при температуре 37°C и pH поддерживали на уровне 6,5 путем непрерывного добавления NaOH. Воздух постоянно прокачивали через смесь со скоростью 100 л/мин. Подготавливали анионообменную смолу Dowex 66, Sigma-Aldrich, США и добавляли к образцу 3. Фермент глюкозооксидазу, GOX, DuPont, Дания, добавляли к образцам 2 и 3. Фермент каталазу из *Micrococcus lysodeikticus*, Sigma-Aldrich, Дания, добавляли к образцам 2 и 3. Фермент OLGA917 из примера 2 добавляли к каждому образцу. Воду MilliQ добавляли до общего объема процесса, который приведен в табл. 2. Данный момент времени определяли как T=0.

Таблица 2

Образец	1 (Контроль)	2	3
Начальная концентрация L-фукозы	10 %	10 %	10 %
Начальная концентрация моногидрата лактозы	15 %	15%	15%
Количество глюкозооксидазы	-	100,45 мг	100,45 мг
Удельная активность глюкозооксидазы	-	11000 Ед/г	11000 Ед/г
Количество каталазы	-	20 мкл	20 мкл
Удельная активность каталазы	-	170000 Ед/мл	170000 Ед/мл
Объем ионообменной смолы	-	-	40 мл
Слабоосновная емкость	-	-	1,35 мг-экв/мл
Количество фермента OLGA	5 мл	5 мл	5 мл
Общий объем процесса	250 мл	250 мл	250 мл

Тестовые образцы от T=4 ч и T=5 ч анализировали с помощью HPLC в соответствии с примером 7 и установили, что они также содержат значительные количества галактозилированной фукозы.

Пример 6. Синтез L-фукозилсодержащих гетерогалактоолигосахаридов путем последовательного добавления молекул донора, превращения глюкозных отщепляемых групп и удаления превращенных отщепляемых групп.

L-(-)-фукозу и моногидрат лактозы в количествах, которые приведены в табл. 3, растворяли в 100 мл воды MilliQ. Каждый образец поддерживали при температуре 37°C и pH поддерживали на уровне 6,5 путем непрерывного добавления NaOH. Воздух постоянно прокачивали через смесь со скоростью 100 л/мин. Подготавливали анионообменную смолу Dowex 66, Sigma-Aldrich, США и добавляли к каждому образцу. Фермент глюкозооксидазу, GOX, Danisco/DuPont, Дания, добавляли к образцу 2. Фермент глюкозооксидазу, Gluzyme, Novozymes, Дания, добавляли к образцу 3. Фермент каталазу из *Micrococcus lysodeikticus*, Sigma-Aldrich, Дания, добавляли к образцам 2 и 3. Фермент OLGA917 из примера 2 добавляли к каждому образцу. Воду MilliQ добавляли до общего объема процесса 250 мл. Данный момент времени определили как T=0. Моногидрат лактозы добавляли к образцам в течение 5-часового периода с интервалами 30 мин.

Таблица 3

Образец	1 (Контроль)	2	3
Начальная концентрация L-фукозы	10 %	10 %	10 %
Начальная концентрация моногидрата лактозы	5 %	5%	5%
Добавление лактозы / 30 минут	1,06 г	1,06 г	1,06 г
Количество глюкозооксидазы	-	40 мг	45 мг
Удельная активность глюкозооксидазы	-	11000 Ед/г	10000 Ед/г
Количество каталазы	-	10 мкл	10 мкл
Удельная активность каталазы	-	170000 Ед/мл	170000 Ед/мл
Объем ионообменной смолы	40 мл	40 мл	40 мл
Слабоосновная емкость	1,35 мг-экв/мл	1,35 мг-экв/мл	1,35 мг-экв/мл
Количество фермента OLGA	2 мл	2 мл	2 мл

В моменты времени $T=4$ и 5 ч брали 1500 мкл тестовых образцов и анализировали с помощью HPLC и масс-спектрологии в соответствии с примером 7. Обнаружили, что образцы содержали значительные количества галактозилированной фукозы. Результаты анализа масс-спектрологии показаны на фиг. 4-6.

На фиг. 4 показан график интегрированного ответа ди-, три- и тетрасахаридов галактозилированной фукозы через 4 ч инкубации - с и без удаления свободных отщепляемых групп в течение инкубации. Свободные отщепляемые группы (глюкоза) удаляют с помощью ферментативного превращения. Видно, что содержание галактозилированной фукозы увеличивается, если свободные отщепляемые группы удаляются во время инкубации.

На фиг. 5 показан график интегрированного ответа ди-, три- и тетрасахаридов галактозилированной фукозы через 5 ч инкубации - с и без удаления свободных отщепляемых групп в течение инкубации. И в данном случае видно, что содержание галактозилированной фукозы увеличивается, если свободные отщепляемые группы удаляются во время инкубации.

На фиг. 6 показан график общего интегрированного ответа галактозилированной фукозы (общее количество HOS) по сравнению с общим интегрированным ответом галактозилированного донора/отщепляемой группы (общее количество GOS) - с и без удаления свободных отщепляемых групп в течение инкубации. Общий интегрированный ответ галактозилированного донора/отщепляемой группы является суммой интегрированных ответов молекул Gal-Glc, Gal-Gal-Glc и Gal-Gal-Gal-Glc. Общий интегрированный ответ галактозилированной фукозы является суммой ответов молекул Gal-Fuc, Gal-Gal-Fuc и Gal-Gal-Gal-Fuc. Видно, что общий интегрированный ответ галактозилированной фукозы значительно возрастает при удалении свободных отщепляемых групп в течение инкубации, в то время как общий интегрированный ответ галактозилированного донора/отщепляемой группы почти не изменяется.

Закключение.

Данный пример демонстрирует, что соотношение между галактозилированным акцептором (целевым продуктом) и галактозилированным донором/отщепляемыми группами (побочным продуктом) значительно увеличивается, когда свободные отщепляемые группы удаляются в течение инкубации.

Пример 7. Определение характеристик образцов, которые содержат L-фукозилсодержащие гетеро-галактоолигосахариды.

Собранные образцы разводили 1:10 водой MilliQ и инактивировали путем нагревания до 85°C в течение 15 мин. Инактивированную смесь хранили при -20°C до определения характеристик.

Характеристики образцов определяли путем применения аналитической HPLC. Образцы фильтровали с использованием фильтра 0,22 мкм. Использовали прибор HPLC от Waters, оснащенный дифференциальным рефрактометром (RI-детектор) и колонкой BioRad Aminex HPX-87C (300×7,8 мм, 125-0055). Элюирование сахаридов проводили изократически с 0,05 г/л ацетата Ca (CaAcetate), скоростью потока 0,3 мл/мин и объемом вводимой пробы 20 мкл.

Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием Agilent 1200 API-ES LC/MSD Quadrupole 6410, сканирующего массы от 100 до 1000 а.е.м. (температура газа: 350°C , поток сушильного газа: 13,0 л/мин, давление распылителя: 40 фунтов/кв.дюйм). Колонкой, применявшейся для LC разделения, являлась HyperCarb 2,1×150 мм от Thermo Scientific, Дания, работающая при 25°C . Элюирование проводили с 5 мМ водного раствора AcNH_4 и ацетонитрилом.

Ионные хроматограммы выделяли на основе общих профилей ионизации из межфазной границы электрораспыления. Пики на выделенных хроматограммах оценивали на основе масс-спектров, а затем

интегрировали, получая, тем самым, интегрированные ответы для различных видов углеводов тестового образца.

Список использованной литературы

- 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
- Scopes Protein Purification: Principles and Practice; Robert K. Scopes; 3rd edition, Springer Verlag New York, Inc., ISBN 0-387-94072-3
- WO 01/90317 A2
- EP 2 138 586 A1
- WO 2009/113030 A2
- WO 2012/010597 A1

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Арла Фудс амба
- <120> СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ГАЛАКТООЛИГОСАХАРИДЫ
- <130> P1120PC00
- <160> 2
- <170> PatentIn версия 3.1
- <210> 1
- <211> 5509
- <212> ДНК
- <213> Bifidobacterium bifidum
- <220>
- <221> CDS
- <222> (212)..(5470)
- <223>
- <400> 1
- atgcggttgcg ttgcgatttt tccggccctg tatgggggat acaggattgg cgatggcgac 60
- acgccgtttt tgttaatggc atttacatga aatacaggta atgagatatac attctcatga 120

028927

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 gcg gcg aac atc acc ctc aag cag acc gtg ttc 1000
 Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe
 250 255 260

ccc aag gga ggc aag acc gac gcc gcc atc ggc 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	

028927

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	Thr	Gly	Lys	Ala	Ala	Lys	Leu	Lys	Ala	Asp	Ala	
			795					800					805			
gac	cgc	aag	acg	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

028927

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	ggc	aat	acc	ggc	ggc	ggc	gcg	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	tcg	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						

028927

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	ggc	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	ggc	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					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					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					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					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					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					1605					1610					
cag	cca	ctt	ggt	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					1620					1625					
gga	acg	cga	tgc	gat	cgc	ggt	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					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					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					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	

028927

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 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 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
 945 950 955 960 965

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 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

028927

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	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				

028927

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения композиции, включающей один или несколько галактоолигосахаридов, причем способ включает этапы:

а) получение смеси, содержащей галактозильный донор, содержащий галактозильную группу, связанную с отщепляемой группой, причем галактозильный донор обладает молярной массой не более 350 г/моль, галактозильный акцептор, который отличается от галактозильного донора, причем указанный галактозильный акцептор является сахаридом или сахароспиртом, где молярное соотношение между галактозильным акцептором и галактозильным донором составляет по меньшей мере 1:10 и где смесь содержит по меньшей мере 0,05 моль/л галактозильного акцептора;

б) обеспечение присутствия первого фермента, причем указанный первый фермент обладает β -галактозидазной активностью и трансгалактозилирующей активностью, при этом указанный первый фермент контактирует со смесью; и

с) инкубирование смеси и первого фермента, тем самым предоставляя возможность первому ферменту высвободить отщепляемую группу галактозильного донора и перенести галактозильную группу галактозильного донора к галактозильному акцептору, таким образом образуя галактоолигосахарид, при этом этап с) дополнительно включает удаление из инкубационной смеси отщепляемой группы, высвобожденной из галактозильного донора, где удаление отщепляемой группы, высвобожденной из галактозильного донора, включает физическое удаление свободных отщепляемых групп из инкубационной смеси и/или превращение свободных отщепляемых групп в одно или несколько других химических соединений, которые все еще могут присутствовать в инкубационной смеси, с получением в результате композиции, содержащей один или несколько галактоолигосахаридов.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что отщепляемая группа галактозильного донора является гликозильной группой.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что галактозильный донор является лактозой или лактитолом.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий обеспечение присутствия второго фермента, который способен превращать свободные отщепляемые группы, высвобожденные из галактозильного донора, и предоставление возможности указанному второму ферменту в течение инкубации превращать отщепляемую группу, высвобожденную из галактозильного донора.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что второй фермент обладает глюкозооксидазной активностью.

6. Способ по любому из пп.4, 5, отличающийся тем, что:

а) константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе по меньшей мере в 10 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному акцептору;

б) константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе по меньшей мере в 10 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к галактозильному донору; или

с) константа специфичности второго фермента по отношению к свободной отщепляемой группе по меньшей мере в 10 раз выше, чем его константа специфичности по отношению к моногалактозилированному галактозильному акцептору.

7. Способ по любому из пп.5, 6, отличающийся тем, что способ дополнительно включает обеспечение присутствия фермента, обладающего каталазной активностью, причем фермент контактирует с инкубационной смесью.

8. Способ по любому из пп.4-7, отличающийся тем, что способ дополнительно включает обеспечение присутствия средства для удаления, способного удалять, по меньшей мере, некоторые из продуктов превращения, полученные путем превращения отщепляемой группы с помощью второго фермента, и предоставление возможности средству для удаления в течение инкубации удалять, по меньшей мере, некоторые из продуктов превращения.

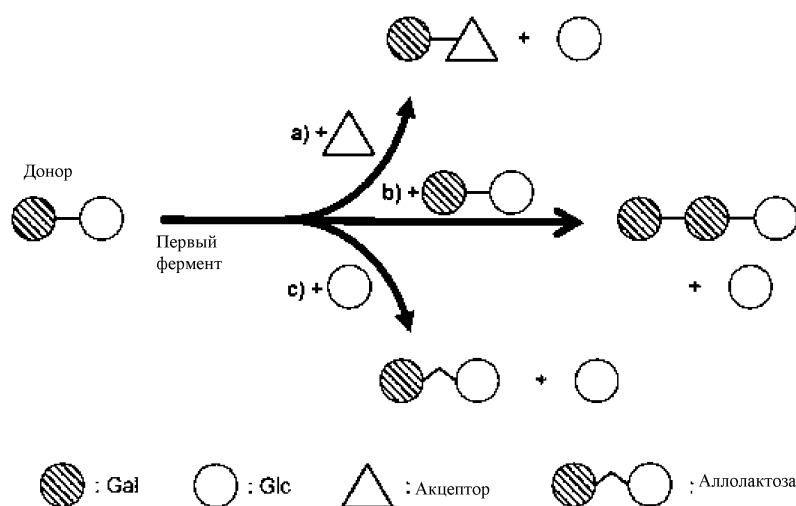
9. Способ по п.8, отличающийся тем, что средство для удаления содержит соль иона двухвалентного или трехвалентного металла.

10. Способ по п.8, отличающийся тем, что средство для удаления содержит анионообменный материал или даже состоит из него.

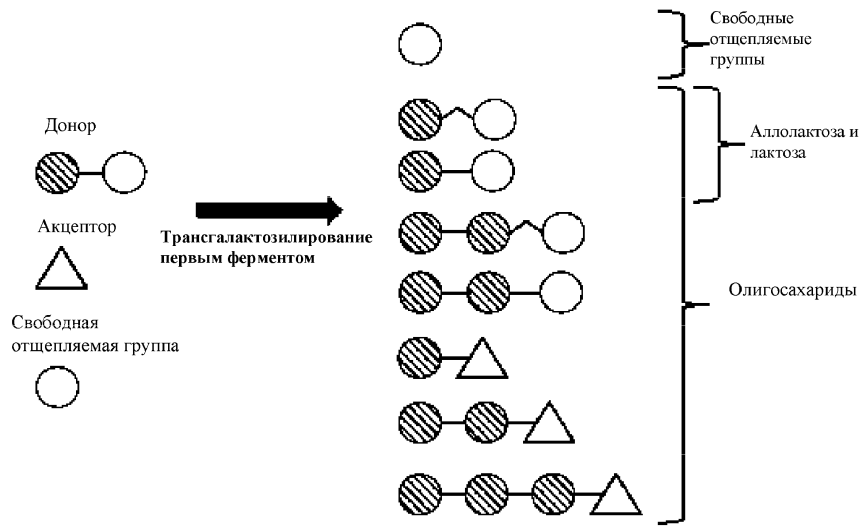
11. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что этап с) включает добавление дополнительного галактозильного донора.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что концентрацию галактозильного донора смеси в течение этапа с) поддерживают при концентрации 0,01-1 моль/л.

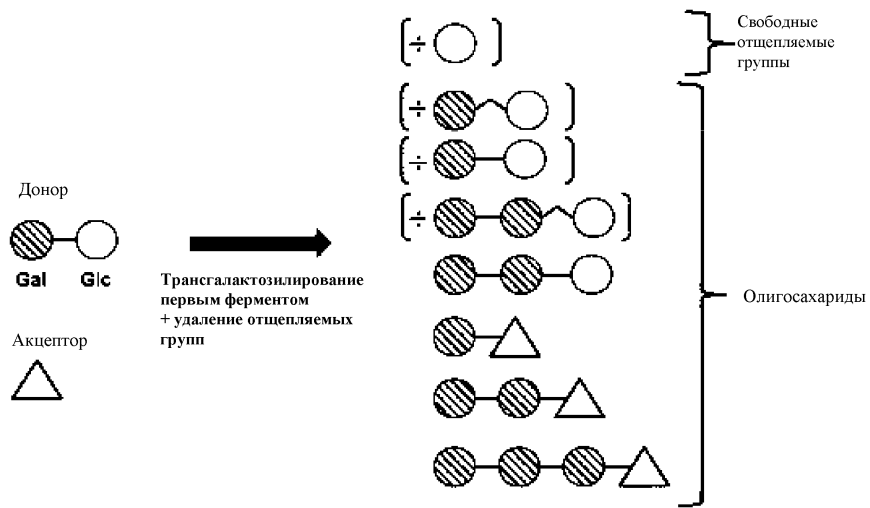
13. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий этап d) обогащения галактоолигосахарида композиции этапа с).



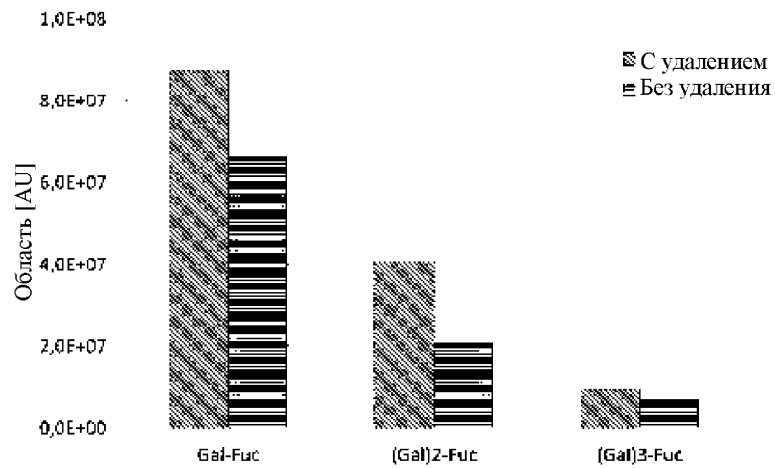
Фиг. 1



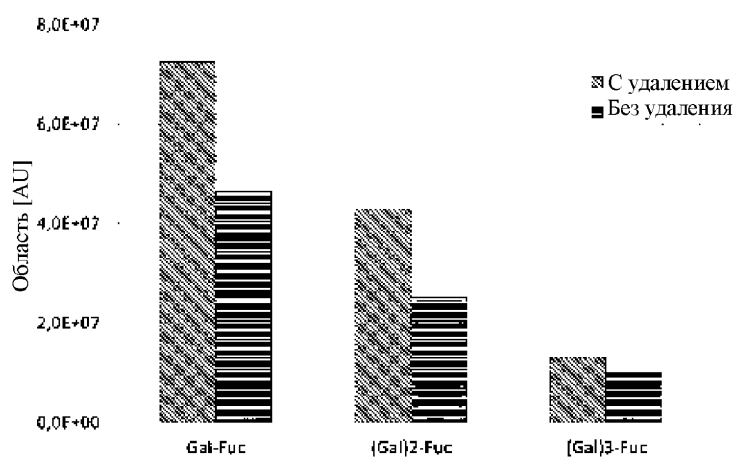
Фиг. 2



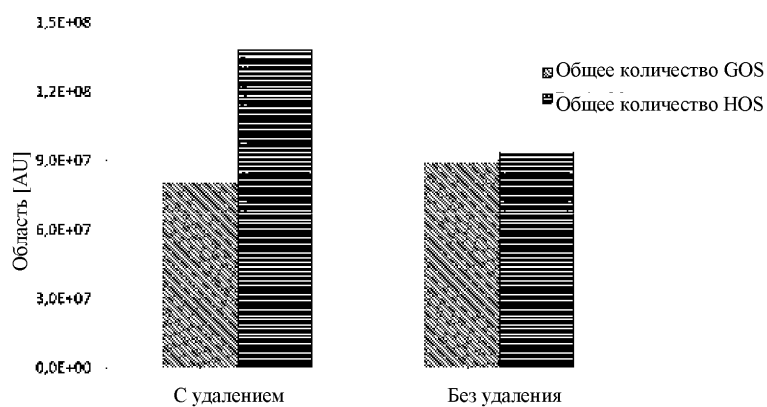
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

