

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-514825
(P2025-514825A)

(43)公表日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 2 3 L	5/00 (2016.01)	A 2 3 L	5/00	J	4 B 0 1 4
A 2 3 G	3/34 (2006.01)	A 2 3 G	3/34	1 0 6	4 B 0 3 2
A 2 3 L	7/109(2016.01)	A 2 3 L	7/109	C	4 B 0 3 5
A 2 3 L	5/10 (2016.01)	A 2 3 L	5/10	A	4 B 0 4 6
A 2 1 D	2/26 (2006.01)	A 2 1 D	2/26		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全45頁)					
(21)出願番号	特願2024-562279(P2024-562279)	(71)出願人	500586299	ノボザイムス アクティーゼルスカブ デンマーク国, デーコー 2 8 8 0 バ グスバエルト, クロシェイバイ 3 6	
(86)(22)出願日	令和4年11月30日(2022.11.30)				
(85)翻訳文提出日	令和6年10月22日(2024.10.22)				
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/083874				
(87)国際公開番号	WO2023/208403	(74)代理人	100099759	弁理士 青木 篤	
(87)国際公開日	令和5年11月2日(2023.11.2)				
(31)優先権主張番号	PCT/CN2022/088680	(74)代理人	100123582		
(32)優先日	令和4年4月24日(2022.4.24)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	100117019	弁理士 渡辺 陽一	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(74)代理人	100141977		
		(74)代理人	100138210		
				弁理士 池田 達則	
		(72)発明者	シュイ チン		
	最終頁に続く			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 熱安定性グルコアミラーゼを使用することによって粉ベースの蒸し製品を調製するための方法

(57)【要約】

本発明は、粉ベースの蒸し製品を生産するための方法であって、粉及び配列番号 1、配列番号 6、配列番号 7 又は配列番号 8 に対して少なくとも 7 0 %同一の熱安定性グルコアミラーゼを含む生地又はペーストを提供すること及び粉ベースの蒸し製品を生産するために生地又はペーストを蒸すことを含む方法並びに前記熱安定性グルコアミラーゼを含む組成物に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

粉ベースの蒸し製品を生産するための方法であって、

- a) 粉及び配列番号 1、配列番号 6、配列番号 7 又は配列番号 8 に対して少なくとも 70 % 同一のグルコアミラーゼを含む生地又はペーストを提供すること並びに
- b) 粉ベースの蒸し製品を生産するために生地を蒸すことを含む方法。

【請求項 2】

前記グルコアミラーゼは、親グルコアミラーゼのグルコアミラーゼバリエーション又は成熟安定性バリエーションである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記粉ベースの蒸し製品は、蒸しパン、詰め物を入れた蒸しパン（包子）、蒸したねじりロールパン（花巻）、蒸したロールパン（チェンズ）、蒸した団子、蒸し煮にした麺（メェンミェン）、蒸しスポンジケーキ（ファガオ）、蒸しスポンジライスカーク（ミファガオ）、春節の菓子（ニェンガオ）から選択される、請求項 1～2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

前記生地又はペーストは、粉を含有する材料から作製され、好ましくは、前記粉は、小麦粉、トウモロコシ粉、ライ麦粉、大麦粉、オート麦粉、米粉又はモロコシ粉、ジャガイモ粉及びその組み合わせからなる群から選択される、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記親グルコアミラーゼは、ペニシリウム属（*Penicillium*）の種、好ましくはペニシリウム・オキシカルム（*Penicillium oxycalum*）、ペニシリウム・ミクジンスキイ（*Penicillium miczynskii*）、ペニシリウム・ルッセリイ（*Penicillium russelli*）又はペニシリウム・グラブラム（*Penicillium glabrum*）から得られる、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記成熟バリエーションは、配列番号 1 中の 1、2、4、6、7、11、31、34、65、79、103、132、327、445、447、481、566、568、594 及び 595 位に相当する位置のうちの 1 つ以上（いくつか）又は全てにおいて、少なくとも 1 つのアミノ酸修飾を含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つのアミノ酸修飾は、配列番号 1 中の 1、2、4、11、65、79 及び 327 位に相当する位置のうちの 1 つ以上又は全てにおいて置換を含み、好ましくは前記少なくとも 1 つのアミノ酸修飾は、配列番号 1 中の R1A、P2N、P4S、P11F、T65A、K79V 及び Q327F に相当する位置のうちの 1 つ以上又は全てにおいて置換を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つのアミノ酸修飾は、配列番号 1 中の 1、6、7、31、34、79、103、132、445、447、481、566、568、594 及び 595 位に相当する位置のうちの 1 つ以上又は全てにおいて置換を含み、好ましくは前記少なくとも 1 つのアミノ酸修飾は、配列番号 1 中の R1A、G6S、G7T、R31F、K34Y、K79V、S103N、A132P、D445N、V447S、S481P、D566T、T568V、Q594R 及び F595S に相当する位置のうちの 1 つ以上又は全てにおいて置換を含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つのアミノ酸修飾は、配列番号 1 中の 1、6、7、31、34、50、79、103、132、445、447、481、484、501、539、566、568、594 及び 595 位に相当する位置のうちの 1 つ以上又は全てにおいて置換を含

10

20

30

40

50

み、好ましくは前記少なくとも1つのアミノ酸修飾は、配列番号1中のR1A、G6S、G7T、R31F、K34Y、E50R、K79V、S103N、A132P、D445N、V447S、S481P、T484P、E501A、N539P、D566T、T568V、Q594R及びF595Sに相当する位置のうちの1つ以上又は全てにおいて置換を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記成熟熱安定性バリエーションは、少なくとも3℃、好ましくは少なくとも4℃、5℃、6℃、7℃又は8℃のその親を超える熱安定性改善(Td)を有する、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記成熟熱安定性バリエーションは、その親と比較して少なくとも150、好ましくは少なくとも200、より好ましくは少なくとも250、最も好ましくは少なくとも300の91℃での相対活性を有する、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記グルコアミラーゼ、好ましくは親グルコアミラーゼの前記成熟熱安定性バリエーションは、配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8に対して少なくとも71%同一であり、配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8に対して例えば少なくとも72%、例えば少なくとも73%、例えば少なくとも74%、例えば少なくとも75%、例えば少なくとも76%、例えば少なくとも77%、例えば少なくとも78%、例えば少なくとも79%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも81%、例えば少なくとも82%、例えば少なくとも83%、例えば少なくとも84%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも86%、例えば少なくとも87%、例えば少なくとも88%、例えば少なくとも89%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも91%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも93%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%、例えば少なくとも100%同一である、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記生地／ペーストに酵素を添加しないこと以外の他の条件は同じである条件と比較して、室温又は4℃の低温で0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6又は7日間保存した後、前記粉ベースの蒸し製品は、低下した硬さ及び／又は改善された弾力を有する、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記生地／ペーストに酵素を添加しないこと以外の他の条件は同じである条件と比較して、室温又は4℃の低温で0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6又は7日間保存した後、前記粉ベースの蒸し製品は、改善された官能評価値を有する、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記生地／ペーストに酵素を添加しないこと以外の他の条件は同じである条件と比較して、室温又は4℃の低温で0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6又は7日間保存した後、前記粉ベースの蒸し製品を蒸し直すと、前記蒸し直した粉ベースの蒸し製品は、改善された官能評価を有する、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記官能評価は、好ましくは総合評価、前記粉ベースの蒸し製品又は前記蒸し直した蒸し製品の柔らかさ、弾力、外観の白さ、クラム構造、水分、凝集性、咀嚼性及び／又は甘味度の平均値である、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

粉及び熱安定性グルコアミラーゼ、好ましくは請求項1～12のいずれかに記載の親グルコアミラーゼの成熟熱安定性バリエーションを含む粉組成物、生地プレミックス又はペーストプレミックス。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

粉及び熱安定性グルコアミラーゼ、好ましくは請求項 1～12 のいずれかに記載の親グルコアミラーゼの成熟熱安定性バリエーションを含む生地。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表の参照

本出願は、コンピュータ読み取り可能な形態の配列表を含有し、これは、本明細書において参照により援用される。

【0002】

本発明は、粉ベースの蒸し製品を調製するための酵素学的方法、特に、熱安定性グルコアミラーゼにより蒸しパンなどの粉ベースの蒸し製品を調製するための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

蒸しパンなどの粉ベースの蒸し製品は、中国人、とりわけ華北の中国人にとって伝統的な主食の 1 つである。近年、食品産業の産業化の進展と共に、粉ベースの蒸し製品の生産の産業化が次第に増加した。

【0004】

国際公開第 2011/039324 号パンフレットは、蒸しパンを調製する方法であって、1 つ以上のマルトース生成アルファアミラーゼ、1 つ以上の生デンプン分解酵素及び少なくとも 1 つの脂肪分解酵素により蒸しパンを調製するために使用される生地を作製するステップを含み、酵素学的方法は、蒸しパン製品の劣化を遅らせる、方法を開示した。

【0005】

日常生活では、一度に多くの蒸しパンを買って／作製して、数回にわけて食べることが多い。調製済みの蒸しパンは、しばらくの間、室温で、低温で保存され又は冷凍され、食べる前に、柔らかさ及び口あたりを元に戻すためにもう一度蒸しパンを蒸し直す必要があることが多い。しかしながら、蒸し直しは、粉ベースの蒸し製品のクラム構造、外観の色、咀嚼性及び／又は弾力に悪影響を与えてしまう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかし、そういうわけで、蒸しパンの賞味期限の延長は、酵素処理を使用していくらか前進した。しかしながら、たとえそのような粉ベースの蒸し製品を蒸し直す必要があるとしても、粉ベースの蒸し製品の鮮度を保つ又は劣化を防ぐ性能が改善された新規な酵素学的解決法を提供する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、本発明の熱安定性グルコアミラーゼが、生地を蒸すステップによって調製された蒸しパンなどの粉ベースの蒸し製品の鮮度を保つ又は劣化を防ぐことにおいて非常に改善された性能を示すことを発見した。

【0008】

本発明の熱安定性グルコアミラーゼの別の改善された性能は、本発明の熱安定性グルコアミラーゼが、驚くべきことに且つ明らかに、蒸し直した製品の改善された外観の白さ、柔らかさ、弾力、クラム構造及び／又は凝集性などのように、蒸し直した後の粉ベースの蒸し製品の品質を改善したことであった。

【0009】

本発明の熱安定性グルコアミラーゼの別の改善された性能は、本発明の熱安定性グルコアミラーゼが製品の甘味度又は甘味を増加させ、その自然な甘さが好ましい味であり、これによりさらに、伝統的なレシピにおいて添加される糖の量の低下を可能にしたことであ

10

20

30

40

50

った。

【0010】

したがって、第1の態様では、粉ベースの蒸し製品を生産するための方法であって、

a) 粉及び配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8に対して少なくとも70%同一のグルコアミラーゼを含む生地又はペーストを提供すること並びに

b) 粉ベースの蒸し製品を作製するために生地又はペーストを蒸すことを含む方法。

【0011】

本発明の好ましい実施形態では、前記グルコアミラーゼは、親グルコアミラーゼの成熟熱安定性バリエーションである。

【0012】

本発明の第2の態様は、生地又はペースト及び本発明において定義される親グルコアミラーゼの成熟熱安定性バリエーションを含む生地プレミックス又はペーストプレミックスに関する。

【0013】

本発明の好ましい実施形態では、生地／ペーストに酵素を添加しないこと以外の他の条件は同じである条件と比較して、本発明の粉ベースの蒸し製品は、低下した硬さ及び／又は改善された弾力を有し、そういうわけで、改善された保存安定性を有する。

【0014】

本発明の好ましい実施形態では、生地／ペーストに酵素を添加しないこと以外の他の条件は同じである条件と比較して、本発明の粉ベースの蒸し製品は、室温又は低温で、好ましくはしばらくの間保存された後、改善された官能評価を有する。

【0015】

本発明の好ましい実施形態では、生地／ペーストに酵素を添加しないこと以外の他の条件は同じである条件と比較して、蒸し直した粉ベースの蒸し製品は、改善された官能評価を有する。

【0016】

本発明の好ましい実施形態では、官能評価は、好ましくは総合評価、粉ベースの蒸し製品の柔らかさ、弾力、表面の白さ、クラム構造、水分、凝集性、咀嚼性及び／又は甘味度の平均値である。

【0017】

好ましくは、本発明のグルコアミラーゼは、配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8に対して少なくとも71%同一であり、配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8に対して例えば少なくとも72%、例えば少なくとも73%、例えば少なくとも74%、例えば少なくとも75%、例えば少なくとも76%、例えば少なくとも77%、例えば少なくとも78%、例えば少なくとも79%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも81%、例えば少なくとも82%、例えば少なくとも83%、例えば少なくとも84%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも86%、例えば少なくとも87%、例えば少なくとも88%、例えば少なくとも89%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも91%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも93%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%同一であり、より好ましくは、グルコアミラーゼは、親グルコアミラーゼの成熟熱安定性バリエーションである。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】 図1は、以下の成熟タンパク質のアミノ酸配列のマルチプルアライメントを示す：－配列番号1のペニシリウム・オキサリカム（*Penicillium oxalicum*）由来の野生型AMG（PoAMG）－配列番号2の「AMG NL」と表記されるPoAMGバリエーション－配列番号3の「AMG anPAV498」と表記されるPoAMGバリエーション－配列番号4の「AMG JPO001」と表記されるPoAMGバリエーション－配列番号5の「AMG JPO124」と表記されるPoAMGバリエーション

番号6の「AMG JPO172」と表記されるPoAMGバリエントー配列番号7のペニシリウム・ミクジンスキイ（*Penicillium miczynskii*）由来の野生型AMG（PoAMG）ー配列番号8のペニシリウム・ルッセリイ（*Penicillium russelli*）由来の野生型AMG（PoAMG）ー配列番号9のペニシリウム・グラブラム（*Penicillium glabrum*）由来の野生型AMG（PoAMG）。

【発明を実施するための形態】

【0019】

定義

この発明を実施するための形態に従って、下記の定義が適用される。単数形「a」、「an」及び「the」は、別途文脈が明確に示さない限り、複数の指示物を含むことに留意されたい。

【0020】

本明細書の全体を通して、範囲の形式で表現される値は、範囲の限界として明示的に列挙された数値のみを含むものではなく、あたかも各数値及び部分範囲が明示的に列挙されているかの如く、その範囲内に包含される全ての個々の数値又は部分範囲も含むものと柔軟に解釈すべきである。例えば、「約0.1パーセント～約5パーセント」又は「約0.1パーセント～5パーセント」の範囲は、約0.1パーセント～約5パーセントのみを含むものではなく、示された範囲内の個々の値（例えば、1パーセント、2パーセント、3パーセント及び4パーセント）並びに部分範囲（例えば、0.1パーセント～0.5パーセント、1.1パーセント～2.2パーセント、3.3パーセント～4.4パーセント）も含むものと解釈すべきである。別途指示がない限り、「約X～Y」の記述は、「約X～約Y」と同じ意味を有する。同様に、別途指示がない限り、「約X、Y又は約Z」の記述は、「約X、約Y又は約Z」と同じ意味を有する。

【0021】

別途定義しない限り又は文脈によって明確に指示されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0022】

グルコアミラーゼ：グルコアミラーゼ（1, 4-アルファ-D-グルカングルコヒドラーゼ、EC3.2.1.3）という用語は、デンプン又は関連するオリゴ糖及び多糖分子の非還元末端からのD-グルコースの放出を触媒する酵素として定義される。グルコアミラーゼはまた、アミログルコシダーゼ及びグルカン1, 4-アルファ-グルコシダーゼ（EC3.2.1.3）とも呼ばれ、より一般的には、それらはAMGと称される。グルコアミラーゼユニット（AGU）は、標準的な条件37℃、pH4.3、基質：マルトース23.2mM、緩衝液：酢酸0.1M、反応時間5分の下で1分当たり1マイクロモルのマルトースを加水分解する酵素の量として定義される。

【0023】

親又は親グルコアミラーゼ：用語「親」グルコアミラーゼは、本明細書で使用する場合、本発明のバリエントグルコアミラーゼを生産するために修飾がなされるグルコアミラーゼを意味する。この用語はまた、本発明のバリエントが比較されるポリペプチドも指す。親は、天然に存在する（野生型）ポリペプチドであってもよい又はさらに、任意の好適な手段により調製されたそのバリエントであってもよい。例として、親タンパク質は、アミノ酸配列が修飾されている又は改変されている天然に存在するポリペプチドのバリエントであってもよい。そういうわけで、親グルコアミラーゼは、1つ以上（又は1つ若しくはいくつかの）アミノ酸の置換、欠失及び／又は挿入を有していてもよい。そういうわけで、親グルコアミラーゼは、親グルコアミラーゼのバリエントであってもよい。親はまた、同じ染色体遺伝子座を占める遺伝子の2つ以上の代替形態のいずれかによりコードされるポリペプチドである対立遺伝子バリエントであってもよい。

【0024】

10

20

30

40

50

成熟ポリペプチド：用語「成熟ポリペプチド」は、N末端プロセッシング、C末端短縮化、グリコシル化、リン酸化等の翻訳後及び任意の翻訳後修飾後のその最終形態をしている生物活性を有するポリペプチドとして本明細書で定義される。成熟ポリペプチド配列は、シグナル配列を欠き、それは、当技術分野において知られている技術を使用して決定されてもよい（例えば、Zhang and Henzel, 2004, Protein Science 13: 2819-2824を参照されたい）。用語「成熟ポリペプチドコード配列」は、成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。

【0025】

配列同一性：2つのアミノ酸配列間又は2つのヌクレオチド配列間の関連性は、「配列同一性」というパラメータによって説明される。

【0026】

本発明の目的のために、2つのアミノ酸配列間の配列同一性は、好ましくはバージョン5.0.0以降のEMBOSSパッケージ（EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277）のNeedleプログラムで実装されているようなNeedleman-Wunschアルゴリズム（Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453）を使用して決定される。使用するパラメータは、10のギャップオープンペナルティ、0.5のギャップエクステンションペナルティ及びEBL0SUM62（BL0SUM62のEMBOSSバージョン）置換マトリックスとする。「最長の同一性」と標識されるNeedleの出力（-nobriefオプションを使用して得られる）は、同一性パーセントとして使用され、以下のように計算される。

$$(\text{同一残基} \times 100) / (\text{アライメントの長さ} - \text{アライメント中のギャップの総数})$$

【0027】

バリエーション：用語「バリエーション」は、1つ以上（例えばいくつかの）の位置に改変、すなわち置換、挿入及び／又は欠失を含むグルコアミラーゼ活性を有するポリペプチドを意味する。置換は、ある位置を占めるアミノ酸の、異なるアミノ酸での置換を意味し、欠失は、ある位置を占めるアミノ酸の除去を意味し、挿入は、ある位置を占めるアミノ酸に隣接するように且つその直後にアミノ酸を追加することを意味する。本発明のバリエーションは、配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8のポリペプチドの少なくとも20%、例えば少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも100%のグルコアミラーゼ活性を有する。

【0028】

官能評価：官能評価を実行するために、パネル（例えば、少なくとも3人のよく訓練された人）を、蒸し製品の品質を判断するために使用する。

【0029】

蒸し製品の改善された柔らかさ：「蒸し製品の改善された柔らかさ」という用語は、「堅さ／硬さ」の反対語であり、対照と比較してより容易に圧縮される蒸し製品の特性として本明細書で定義され、よく訓練された人の手若しくは口により経験的に評価される又は当技術分野において知られている例えばテクスチャーアナライザー（例えば、Stable Micro Systems Ltd, Surrey, UK製のTAXT2若しくはTA-XT Plus）によって測定される。

【0030】

蒸し製品の改善された弾力：「蒸し製品の改善された弾力」という用語は、対照と比較して押された後により容易に元の状態に回復する蒸し製品の特性として本明細書で定義され、よく訓練された人の手若しくは口により経験的に評価される又は当技術分野において知られている例えばテクスチャーアナライザー（例えば、Stable Micro Systems Ltd, Surrey, UK製のTAXT2若しくはTA-XT Plus）によって測定される。

10

20

30

40

50

【0031】

蒸し製品の改善された外観の白さ：「蒸し製品の改善された外観の白さ」という用語は、対照と比較して表面により白い外観を有する蒸し製品の特性として本明細書で定義され、通常よく訓練された人によって視覚的に評価される。

【0032】

蒸し製品の改善されたクラム構造：「蒸し製品の改善されたクラム構造」という用語は、対照と比較してクラム内により細かい気泡及び／若しくはより薄い気泡壁並びに／又はクラム内により均一な／均質な分布の気泡を有する蒸し製品の特性として本明細書で定義され、通常よく訓練された人によって視覚的に評価される。

【0033】

蒸し製品の改善された水分：「蒸し製品の改善された水分」という用語は、対照と比較して触感が冷たい又は口あたりが冷たい蒸し製品の特性として本明細書で定義され、通常よく訓練された人によって経験的に評価される。

【0034】

蒸し製品の改善された凝集性：「蒸し製品の改善された凝集性」という用語は、対照と比較してクラムの崩れがより少ない蒸し製品の特性として本明細書で定義され、通常よく訓練された人によって経験的に評価される。

【0035】

蒸し製品の改善された咀嚼性：「蒸し製品の改善された咀嚼性」という用語は、対照と比較して嚥下前に、より多くの噛む労力を伴う蒸し製品の特性として本明細書で定義され、通常熟練したパン職人によって経験的に評価される。

【0036】

蒸し製品の改善された甘味度：「蒸し製品の改善された甘味度」という用語は、対照と比較してより甘味を有する蒸し製品の特性として本明細書で定義され、通常よく訓練された人によって評価される。

【0037】

熱安定性改善：℃での熱安定性改善（Td）は、本明細書に例示されるように決定される、バリエーションが同じ条件下でそれらの親グルコアミラーゼを超えて熱安定性をどれほど改善したかの尺度である。

【0038】

命名法

本発明の目的のために、命名法[Y/F]は、この位置のアミノ酸がチロシン（Try、Y）又はフェニルアラニン（Phe、F）であってもよいことを意味する。同様に、命名法[V/G/A/I]は、この位置でのアミノ酸が、バリン（Val、V）、グリシン（Gly、G）、アラニン（Ala、A）又はイソロイシン（Ile、I）であってもよいことを意味しており、以降、本明細書で記載される他の組み合わせに関しても同様である。アミノ酸Xは、別途明記しない限り、20種の天然アミノ酸のいずれかであってもよいように定義される。

【0039】

バリエーションの命名のための規則

本発明の目的のために、配列番号1で開示されるポリペプチドを使用して、別のグルコアミラーゼ中の対応するアミノ酸残基を決定する。そういうわけで、全ての言及される位置及び特定の置換は、配列番号1に使用される付番を参照する。しかしながら、本明細書で開示される任意の他の配列の配列もまた、別のグルコアミラーゼポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基を決定するために使用されてもよいことを当業者は認識するであろう。別のグルコアミラーゼのアミノ酸配列を、配列番号1に開示されるポリペプチドとアライメントさせ、このアライメントに基づいて、配列番号1に開示されるポリペプチド内のいずれかのアミノ酸残基に対応するアミノ酸位置番号が、好ましくはバージョン5.0.0以降のEMBOSSパッケージ（EMBOSS; The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice

10

20

30

40

50

et al., 2000, Trends Genet. 16; 276-277) の Needle プログラムに実装される Needleman-Wunsch アルゴリズム (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48; 443-453) を使用して決定される。使用するパラメータは、10 のギャップオープンペナルティ、0.5 のギャップエクステンションペナルティ及び EBL0SUM62 (BL0SUM62 の EMB0SS バージョン) 置換マトリックスとする。

【0040】

既知の構造のタンパク質については、構造アライメントを検索し、生成するためのいくつかのツール及び資源が利用可能である。例えば、SCOP スーパーファミリーのタンパク質の構造がアライメントされており、それらのアライメントはアクセス可能であり、ダウンロード可能である。2つ以上のタンパク質構造を、距離アライメントマトリックス (Holm and Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) 又は組み合わせ拡張 (Shindyalov and Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747) などの様々なアルゴリズムを使用してアライメントすることができ、これらのアルゴリズムの実装をさらに利用して、可能性のある構造相同体を発見するために目的の構造で構造データベースを問い合わせることができる (例えば、Holm and Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567)。

【0041】

本発明のバリエーションの記載では、参照を容易にするために、以下に記載される命名法が採用される。承認されている IUPAC 一文字又は三文字アミノ酸略語が用いられる。

【0042】

置換。アミノ酸置換の場合、以下の命名法が用いられる：元のアミノ酸、位置、置換アミノ酸。したがって、226 位でのスレオニンのアラニンへの置換は、「Thr226Ala」又は「T226A」と示される。複数の変異は、追加の印 (「+」) によって隔てられ、例えば、「Gly205Arg+Ser411Phe」又は「G205R+S411F」は、それぞれ、アルギニン (R) によるグリシン (G) 及びフェニルアラニン (F) によるセリン (S) の 205 位及び 411 位での置換を表す。

【0043】

欠失。アミノ酸欠失の場合、以下の命名法が用いられる：元のアミノ酸、位置、*。したがって、195 位のグリシンの欠失は、「Gly195*」又は「G195*」と示される。複数の欠失は、追加の印 (「+」) によって隔てられ、例えば、「Gly195*+Ser411*」又は「G195*+S411*」となる。

【0044】

挿入。アミノ酸挿入の場合、以下の命名法が用いられる：元のアミノ酸、位置、元のアミノ酸、挿入アミノ酸。したがって、195 位でのグリシンの後のリジンの挿入は、「Gly195GlyLys」又は「G195GK」と示される。複数のアミノ酸の挿入は、[元のアミノ酸、位置、元のアミノ酸、挿入アミノ酸 # 1、挿入アミノ酸 # 2 等] と示される。例えば、195 位のグリシンの後のリジン及びアラニンの挿入は、「Gly195GlyLysAla」又は「G195GKA」と示される。

【0045】

そのような場合、挿入されたアミノ酸残基は、挿入されたアミノ酸残基の前のアミノ酸残基の位置番号への小文字の追加により付番される。上記の例では、配列はそういうわけで下記のようになる。

【0046】

10

20

30

40

【表 1】

親:	バリエント:
195	195 195a 195b
G	G - K - A

【0047】

複数の改変。複数の改変を含む変異体は、追加の印「+」によって隔てられ、例えば、「Arg170Tyr+Gly195Glu」又は「R170Y+G195E」は、170位及び195位のアルギニン及びグリシンを、それぞれチロシン及びグルタミン酸で置換することを表す。

【0048】

異なる改変。異なる改変がある位置で導入され得る場合、異なる改変は、カンマによって隔てられ、例えば、「Arg170Tyr, Glu」は、170位のアルギニンのチロシン又はグルタミン酸による置換を表す。そういうわけで、「Tyr167Gly, Ala+Arg170Gly, Ala」は、以下のバリエントを示す：

「Tyr167Gly+Arg170Gly」、「Tyr167Gly+Arg170Ala」、「Tyr167Ala+Arg170Gly」及び「Tyr167Ala+Arg170Ala」。

【0049】

発明の詳細な説明

第1の態様は、粉ベースの蒸し製品を生産するための方法であって、

- a) 粉及び配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8に対して少なくとも70%同一のグルコアミラーゼを含む生地又はペーストを提供すること並びに
- b) 粉ベースの蒸し製品を作製するために生地又はペーストを蒸すことを含む方法に関する。

【0050】

本発明の好ましい実施形態では、前記グルコアミラーゼは、親グルコアミラーゼの成熟熱安定性バリエントである。

【0051】

本発明の第2の態様は、生地又はペースト及び本発明において定義される親グルコアミラーゼの成熟熱安定性バリエントを含む生地プレミックス又はペーストプレミックスに関する。

【0052】

本発明の好ましい実施形態では、生地／ペーストに酵素を添加しないこと以外の他の条件は同じである条件と比較して、室温若しくは4℃の低温で0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6又は7日間保存した後又は最大1、2、3、4、5、6ヵ月、-20℃で保存した後、本発明の粉ベースの蒸し製品は、低下した硬さ及び／又は改善された弾力を有し、そういうわけで、改善された保存安定性を有する。

【0053】

本発明の好ましい実施形態では、生地／ペーストに酵素を添加しないこと以外の他の条件は同じである条件と比較して、室温若しくは4℃の低温で0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6又は7日間保存した後又は最大1、2、3、4、5、6ヵ月、-20℃で保存した後、本発明の粉ベースの蒸し製品は、改善された官能評価を有する。

【0054】

本発明の好ましい実施形態では、生地／ペーストに酵素を添加しないこと以外の他の条件は同じである条件と比較して、室温若しくは4℃の低温で0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6又は7日間保存した後又は最大1、2、3、4、5、6ヵ月、-20℃で保存した後、本発明の粉ベースの蒸し製品を蒸し直すと、蒸し直した製品は、改

10

20

30

40

50

善された官能評価を有する。

【0055】

本発明の好ましい実施形態では、官能評価は、好ましくは総合評価、粉ベースの蒸し製品の柔らかさ、弾力、外観の白さ、クラム構造、水分、凝集性、咀嚼性及び／又は甘味度の平均値である。

【0056】

本発明の別の好ましい実施形態では、粉ベースの蒸し製品は、アミノ酸配列が配列番号10において示される成熟グルコアミラーゼの2倍の量で作製された対照製品と少なくとも同じ甘味度又は甘味を有する。

【0057】

他の態様は、粉ベースのゆで製品を生産するための方法であって、

a) 粉及び配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8に対して少なくとも70%同一のグルコアミラーゼを含む生地を提供すること並びに

b) 粉ベースのゆで製品を作製するために生地をゆでることを含む方法に関する。

【0058】

本発明の好ましい実施形態では、前記グルコアミラーゼは、親グルコアミラーゼの成熟熱安定性バリエーションである。

【0059】

粉ベースの蒸し製品：

本明細書で使用されるように、「粉ベースの蒸し製品」は、生地又はペーストに蒸すことによって調製された任意の粉ベースの製品を意味する。粉ベースの蒸し製品の例は、蒸しパン、例えば華北の蒸しパン及び華南の蒸しパンなど、蒸した詰め物を入れた蒸しパン（包子）、蒸したねじりロールパン（花巻）、蒸したロールパン（チェンズ（*juanzhi*））、蒸した団子、蒸し煮にした麺（メンミエン（*menmian*））、春節の菓子（ニェンガオ）、蒸しスポンジケーキ（ファガオ）又は蒸しスポンジライスクーキ（ミファガオ（*mifagao*））を含む。粉ベースの蒸し製品は、肉（例えば豚肉、牛肉、鶏肉又は魚）、野菜（例えばマッシュルーム、ブロッコリ及び他の緑色野菜）、果物（例えばデーツ及びナツメ）、キャンディ、チーズ並びにミルク（又は他の乳製品）並びにその組み合わせなどの1つ以上の追加の成分を含有してもよい。

【0060】

本発明は、本発明の熱安定性グルコアミラーゼを含む生地又はペーストに関する。本明細書で使用されるように、「生地」は、蒸しパンなどの粉ベースの蒸し製品を調製するために使用される任意の生地を意味する。粉ベースの蒸し製品を調製するために使用される生地は、任意の好適な粉原材料、例えば、穀物を原材料とする粉、例えば小麦粉、トウモロコシ粉、ライ麦粉、大麦粉、オート麦粉、米粉又はモロコシ粉、ジャガイモ粉及びその組み合わせ（例えば、他の粉原材料の1つと組み合わせられた小麦粉；他の粉原材料の1つと組み合わせられた米粉）などから作製されてもよい。

【0061】

本発明の生地は、通常、発酵させた生地又は発酵させる生地である。生地は、化学的膨張剤（例えば重炭酸ナトリウム）などの生地成分を追加することによって又は膨張剤（発酵させた生地）を追加することによってなどのように、様々な方法で発酵させることができるが、好適な酵母培養物、例えば出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）の培養物を追加することによって生地を発酵させることが好ましい。

【0062】

本発明は、本発明の熱安定性グルコアミラーゼを含む粉プレミックスに関し、そのような粉プレミックスは、任意の好適な粉原材料、例えば、穀物を原材料とする粉、例えば小麦粉、トウモロコシ粉、ライ麦粉、大麦粉、オート麦粉、米粉又はモロコシ粉、ジャガイモ粉及びその組み合わせ（例えば、他の粉原材料の1つと組み合わせられた小麦粉；他の粉原材料の1つと組み合わせられた米粉）などを含んでいてもよい。

【0063】

蒸しパンを調製する方法は、当技術分野において周知であり、例えば「ストレート生地プロセス」及び「スポンジ及び生地プロセス」を含み、非限定的な例は、以下の「材料及び方法」の部で提供される。蒸しパンを調製するプロセスは、一般に、生地を作製する（任意選択の発酵ステップあり）、シート状にする、成形する、発酵させる及び次いで生地を蒸すといった連続的なステップを含み、これらのステップは、当技術分野において周知である。任意の発酵ステップが使用される場合、好ましくはさらに多くの粉が追加され、第2の発酵ステップの間に、生産された又は生産される酸を中和するために、アルカリが追加されてもよい。

【0064】

蒸しスポンジケーキを調製する方法は、当技術分野において周知であり、例えば、粉を含有する材料からペーストを調製すること、発酵させること及び蒸しスポンジケーキを作製するために蒸すことを含む、蒸しスポンジケーキを調製する方法を含む。好ましくは、ペーストは、米ペーストである。好ましくは、粉は、穀物由来、例えば小麦粉、トウモロコシ粉、ライ麦粉、大麦粉、オート麦粉、米粉又はモロコシ粉、ジャガイモ粉及びその組み合わせとすることができる。

【0065】

好ましくは、完成したケーキは、発酵によって生産されるきめ細かい網目構造、柔らかな味、心地よいワインの香り及び乳酸の風味を有する。好ましくは、ペーストは、本発明の熱安定性グルコアミラーゼを含有する。好ましくは、蒸しスポンジケーキは、米から作製され、例えば、その方法は、米を水に浸し、浸した米を粉碎し、ふるいにかけて米ペーストを得て又は蒸しスポンジケーキプレミックスパウダーに水を添加することによって米ペーストを作製し、米ペーストを30～40℃で約1～25時間発酵させ、次いでスクロース及びベーキングパウダーを添加してもよく、混合物を均一に混合し、約15分間蒸して蒸しスポンジケーキを作製することを含む。ペーストは、一般に、当技術分野において周知であるように、好適な酵母培養物、例えば出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）（パン酵母）の培養物又は化学的膨張剤の添加によって発酵させる。

【0066】

生の蒸しパン生地又は蒸しパン製品を調製することに加えて、本発明は、冷凍蒸しパン生地を調製するための方法に関する。冷凍蒸しパン生地は、保存及び／又は販売に有利であってもよい。冷凍蒸しパン生地を調製するための方法の例は、生地を作製するステップ（任意選択の発酵ステップあり）、シート状にするステップ、成形するステップ、発酵させるステップ及び生地を冷凍するステップを含む。本発明はまた、本発明の熱安定性グルコアミラーゼを含む冷凍蒸しパン生地にも関する。

【0067】

本発明は、特に、産業プロセス、すなわち、蒸しパン及び／又は蒸しパン製品を調製するために使用される生地が自動化又は半自動化装置を使用して機械的に調製されるプロセスにおいて蒸しパン生地及び蒸しパン製品を調製するのに有用である。本発明は、自動化又は半自動化プロセスを使用して蒸しパンをすぐに調製することができるという点で著しい利点を提供し、蒸しパンは、販売及び消費者による消費のために保存され、調製後24時間を超えても、同じ日に調製されたばかりの蒸しパンの品質を実質的に維持する。

【0068】

蒸しパンを調製するプロセスは、一般に、生地を作製するステップ（及び任意選択の発酵ステップ）、シート状にするステップ、成形するステップ、発酵させるステップ、蒸すステップ並びに包装するステップといった連続的なステップを含む。任意の発酵ステップが使用される場合、好ましくはさらに多くの粉が追加され、第2の発酵ステップの間に、生産された又は生産される酸を中和するために、アルカリが追加されてもよい。本発明による産業的蒸しパン生産プロセスにおいて、シート状にするステップ、成形するステップ、発酵させるステップ、蒸すステップ及び／又は包装するステップなどのこれらのステッ

ブの1つ以上は、自動化又は半自動化装置を使用して実行される。

【0069】

一実施形態では、本発明によるグルコアミラーゼは、粉1kg当たり0.01～1,000mgの酵素タンパク質(mgEP)の量で、好ましくは、粉1kg当たり0.01～500mgの酵素タンパク質(mgEP)の量で、さらにより好ましくは、粉1kg当たり0.1～100mgの酵素タンパク質(mgEP)の量で粉又は生地又はペーストに添加されてもよい。

【0070】

粉ベースのゆで製品：

本明細書で使用されるように、「粉ベースのゆで製品」は、生地をゆでることによって調製される任意の粉ベースの製品を意味する。粉ベースのゆで製品の例は、麺、団子及びワンタン、米の団子及び米の麺並びに乾麺及び半乾麺、熱乾麺、米の乾麺及び米の半乾麺などの乾製品並びに米の生麺などの伝統的な中国の主食を含む。粉は、任意の好適な粉原材料、例えば、穀物を原材料とする粉、例えば米粉、小麦粉、そば粉、黒米粉(purple rice flour)、トウモロコシ粉、ライ麦粉、大麦粉、オート麦粉又はモロコシ粉、ジャガイモ粉及びその組み合わせ(例えば、他の粉原材料の1つと組み合わせられた小麦粉；他の粉原材料の1つと組み合わせられた米粉)から作製されてもよい。それは、詰め物あり又はなしの製品とすることができる。詰め物は、肉、野菜、豆又はそれらの組み合わせとすることができる。この種の製品の生地は、通常、酵母によって発酵させない。得られた生地は、詰め物の有又は無にかかわらず、様々なプロセスを通して様々な形状の製品に加工処理することができる。

10

20

【0071】

粉ベースのゆで製品は、通常、製品の厚さ又は詰め物があるかどうか及び食べる前に冷凍状態であるか又は乾燥状態であるかに従って適切な時間ゆでられる。様々な製品は、十分に糊化される目的を達成するために3～20分間熱湯でゆでられる。

【0072】

一実施形態では、本発明によるグルコアミラーゼは、粉1kg当たり0.01～1,000mgの酵素タンパク質(mgEP)の量で、好ましくは、粉1kg当たり0.01～500mgの酵素タンパク質(mgEP)の量で、さらにより好ましくは、粉1kg当たり0.1～100mgの酵素タンパク質(mgEP)の量で粉又は生地に添加されてもよい。

30

【0073】

グルコアミラーゼ

本発明によれば、様々なタイプのグルコアミラーゼが熱安定性グルコアミラーゼバリエーションの生成のための親として使用されてもよく、例えば、グルコアミラーゼは、アスペルギルス属(*Aspergillus*)、リゾプス属(*Rhizopus*)、タラロミセス属(*Talaromyces*)又はペニシリウム属(*Penicillium*)の真菌株で見出されるDNA配列、好ましくはペニシリウム属(*Penicillium*)の真菌株で見出されるDNA配列、さらにより好ましくは、ペニシリウム・オキシスポラム(*Penicillium oxysporum*)、ペニシリウム・オキサリカム(*Penicillium oxalicum*)、ペニシリウム・ミクジンスキイ(*Penicillium miczynskii*)、ペニシリウム・ルッセルリイ(*Penicillium russellii*)又はペニシリウム・グラブラム(*Penicillium glabrum*)の真菌株で見出されるDNA配列によってコードされるポリペプチドであってもよい。他の好適な真菌の例としては、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・アワモリ(*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)、リゾプス・デルマ(*Rhizopus delemar*)、リゾプス・ニベウス(*Rhizopus niveus*)、リゾプス・オリゼ(*Rhizopus oryzae*)及びタラロミセス・エメルソニイ(*Talaromyces emersonii*)が含まれる。

40

50

【0074】

親グルコアミラーゼは、任意の属の微生物から得られてもよい。本発明の目的のために、「から得られる」という用語は、所与の供給源と関連して本明細書で使用されるとき、ポリヌクレオチドによってコードされる親が、供給源又は供給源由来のポリヌクレオチドが挿入されている株によって生産されることを意味するものとする。一態様では、親は、細胞外に分泌される。

【0075】

本発明の一態様では、グルコアミラーゼ又は親グルコアミラーゼは、例えばペニシリウム・オキサリカム (*Penicillium oxalicum*)、ペニシリウム・グラブラム (*Penicillium glabrum*)、ペニシリウム・ブラシリアヌム (*Penicillium brasilianum*)、ペニシリウム・ルッセリイ (*Penicillium russelli*)、ペニシリウム・ミクジンスキイ (*Penicillium miczynskii*) などのペニシリウム属 (*Penicillium*) から得られてもよい。

10

【0076】

一態様では、親真菌グルコアミラーゼは、ペニシリウム・オキサリカム (*Penicillium oxalicum*) グルコアミラーゼ、ペニシリウム・グラブラム (*Penicillium glabrum*) グルコアミラーゼ、ペニシリウム・ブラシリアヌム (*Penicillium brasilianum*) グルコアミラーゼ、ペニシリウム・ルッセリイ (*Penicillium russelli*) グルコアミラーゼ、ペニシリウム・ミクジンスキイ (*Penicillium miczynskii*) グルコアミラーゼなどのペニシリウム属 (*Penicillium*) グルコアミラーゼであってもよい。

20

【0077】

別の態様では、親グルコアミラーゼは、ペニシリウム・オキサリカム (*Penicillium oxalicum*) から得られ、例えば、配列番号1のグルコアミラーゼとして示される。別の態様では、親グルコアミラーゼは、ペニシリウム・オキサリカム (*Penicillium oxalicum*) から得られ、例えば、配列番号6のグルコアミラーゼとして示される。別の態様では、親グルコアミラーゼは、ペニシリウム・オキサリカム (*Penicillium oxalicum*) から得られ、例えば、配列番号7のグルコアミラーゼとして示される。別の態様では、親グルコアミラーゼは、ペニシリウム・オキサリカム (*Penicillium oxalicum*) から得られ、例えば、配列番号8のグルコアミラーゼとして示される。

30

【0078】

一実施形態では、本発明の熱安定性グルコアミラーゼは、配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8に対して少なくとも70%同一であり、配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8に対して例えば少なくとも71%、例えば少なくとも72%、例えば少なくとも73%、例えば少なくとも74%、例えば少なくとも75%、例えば少なくとも76%、例えば少なくとも77%、例えば少なくとも78%、例えば少なくとも79%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも81%、例えば少なくとも82%、例えば少なくとも83%、例えば少なくとも84%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも86%、例えば少なくとも87%、例えば少なくとも88%、例えば少なくとも89%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも91%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも93%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%同一である。一実施形態では、グルコアミラーゼは、親グルコアミラーゼのグルコアミラーゼバリエーション又は成熟熱安定性バリエーションである。

40

【0079】

一実施形態では、成熟バリエーションは、配列番号1中の1、2、4、6、7、11、31、34、65、79、103、132、327、445、447、481、566、56

50

8、594及び595位に相当する位置のうちの1つ以上（いくつか）又は全てにおいて、少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。

【0080】

一実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸修飾が、配列番号1中の1、2、4、11、65、79及び327位に相当する位置のうちの1つ以上又は全てにおいて置換を含み、好ましくは、少なくとも1つのアミノ酸修飾が、配列番号1中のR1A、P2N、P4S、P11F、T65A、K79V及びQ327Fに相当する位置のうちの1つ以上又は全てにおいて置換を含む。

【0081】

一実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸修飾が、配列番号1中の1、6、7、31、34、79、103、132、445、447、481、566、568、594及び595位に相当する位置のうちの1つ以上又は全てにおいて置換を含み、好ましくは、少なくとも1つのアミノ酸修飾が、配列番号1中のR1A、G6S、G7T、R31F、K34Y、K79V、S103N、A132P、D445N、V447S、S481P、D566T、T568V、Q594R及びF595Sに相当する位置のうちの1つ以上又は全てにおいて置換を含む。

10

【0082】

一実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸修飾が、配列番号1中の1、6、7、31、34、50、79、103、132、445、447、481、484、501、539、566、568、594及び595位に相当する位置のうちの1つ以上又は全てにおいて置換を含み、好ましくは、少なくとも1つのアミノ酸修飾が、配列番号1中のR1A、G6S、G7T、R31F、K34Y、E50R、K79V、S103N、A132P、D445N、V447S、S481P、T484P、E501A、N539P、D566T、T568V、Q594R及びF595Sに相当する位置のうちの1つ以上又は全てにおいて置換を含む。

20

【0083】

一実施形態では、成熟熱安定性バリエーションが、少なくとも3℃、好ましくは少なくとも4℃、5℃、6℃、7℃又は8℃のその親を超える熱安定性改善（Td）を有する。

【0084】

一実施形態では、成熟熱安定性バリエーションが、その親と比較して、少なくとも150、好ましくは少なくとも200、より好ましくは少なくとも250、最も好ましくは少なくとも300の91℃での相対活性を有する。

30

【0085】

一実施形態では、熱安定性グルコアミラーゼは、グルコアミラーゼバリエーションである。一実施形態では、本発明のグルコアミラーゼバリエーションは、配列番号1又は配列番号6、配列番号7又は配列番号8のポリペプチドと少なくとも60%、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%又は100%の配列同一性を有し、グルコアミラーゼ活性を有する。

40

【0086】

一実施形態では、本発明のグルコアミラーゼバリエーション又はグルコアミラーゼバリエーションのアミノ酸配列は、10以下のアミノ酸が、例えば9つのアミノ酸、8つのアミノ酸、7つのアミノ酸、6つのアミノ酸、5つのアミノ酸、4つのアミノ酸、3つのアミノ酸、2つのアミノ酸及び1つのアミノ酸が配列番号1、配列番号6、配列番号7若しくは配列番号8と又は配列番号1、配列番号6、配列番号7若しくは配列番号8の成熟ポリペプチドと異なる。一実施形態では、配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8の成熟ポリペプチドは、配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8として示される

50

。

【0087】

一実施形態では、本発明のグルコアミラーゼ、グルコアミラーゼバリエーション又はグルコアミラーゼバリエーションのアミノ酸配列は、配列番号1、配列番号6、配列番号7又は配列番号8のアミノ酸配列を含む又はそれからなる。

【0088】

バリエーションのアミノ酸変化は、軽度のもの、すなわちタンパク質のフォールディング及び／若しくは活性に有意に影響しない保存的アミノ酸置換若しくは挿入；典型的には1～30アミノ酸の小さい欠失；アミノ末端メチオニン残基などの小アミノ若しくはカルボキシル末端伸長；20～25以下の残基の小さいリンカーペプチド；又は正味電荷若しくは

10

【0089】

保存的置換の例が、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン及びヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸及びアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミン及びアスパラギン）、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン及びバリン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）並びに低分子アミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、トレオニン及びメチオニン）の群内にある。一般に比活性を改変しないアミノ酸置換が、当技術分野において知られており、例えばH. Neurath and R. L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New Yorkによって記載されている。一般的な置換として、Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu及びAsp/Glyがある。

20

【0090】

一方、アミノ酸変化は、ポリペプチドの物理化学的性質が改変されるような性質のものである。例えば、アミノ酸変化は、ポリペプチドの熱安定性を改善してもよい、基質特異性を改変してもよい、最適なpHを変化させてもよい等である。

【0091】

ポリペプチド内の必須アミノ酸を、部位特異的変異誘発又はアラニン走査変異誘発（Cunningham and Wells, 1989, Science 244:1081-1085）などの当技術分野において知られている手法に従って特定することができる。後者の技術では、分子の活性に極めて重要なアミノ酸残基を特定するために、分子内のあらゆる残基に単一のアラニン変異を導入して、結果として生じる変異体分子をグルコアミラーゼ活性について試験する。Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:4699-4708もまた参照されたい。酵素の活性部位又は他の生物学的相互作用もまた、推定される接触部位アミノ酸の変異と組み合わせて、核磁気共鳴、結晶構造解析、電子回折又は光親和性標識などの技術によって決定されるように、構造の物理的分析によって決定することができる。例えば、de Vos et al., 1992, Science 255:306-312; Smith et al., 1992, J. Mol. Biol. 224:899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Lett. 309:59-64を参照されたい。必須アミノ酸の同一性はまた、関連ポリペプチドとのアライメントから推測することもできる。

30

40

【0092】

以下は図1においてアライメントされ、配列表にも提供されるAMGアミノ酸配列間の同一性%を示す：

【0093】

50

【表 2】

P_オキサリカム(P_oxalium)	100.00	99.83	98.99	98.82	96.64	95.97	77.07	77.12
74.32								
AMG_NL	99.83	100.00	99.16	98.99	96.81	96.13	77.07	77.12
74.32								
AMG_anPAV498	98.99	99.16	100.00	99.83	97.65	96.97	76.73	76.95
73.82								
AMG_JPO001	98.82	98.99	99.83	100.00	97.82	97.14	76.73	76.95
73.82								
AMG_JPO124	96.64	96.81	97.65	97.82	100.00	99.33	77.07	77.12
74.32								
AMG_JPO172	95.97	96.13	96.97	97.14	99.33	100.00	76.73	76.78
73.99								
P_ミクジンスキイ(P_mikzyinski)	77.07	77.07	76.73	76.73	77.07	76.73	100.00	94.75
80.51								
P_ルツセリイ(P_russellii)	77.12	77.12	76.95	76.95	77.12	76.78	94.75	100.00
79.66								
P_グラブラム(P_glabrum)	74.32	74.32	73.82	73.82	74.32	73.99	80.51	79.66
100.00								

10

20

【0094】

P o A M G の熱安定性バリエントが生成されている（以下の表 2 を参照されたい）。好ましい実施形態では、本発明の成熟熱安定性グルコアミラーゼバリエントは、以下の表 2 にリストされるアミノ酸置換の組み合わせのうちの 1 つ以上又は全てを含む。

【0095】

表 2 のバリエントの熱安定性改善（T d）が表 3 にリストされており、ここでは「a n P A V 4 9 8」（親）と表記される P o A M G バリエントの T d をゼロに設定した。好ましい実施形態では、本発明の成熟熱安定性バリエントは、好ましくは本明細書に例示されるように決定された、少なくとも 3 °C の、好ましくは少なくとも 4 °C、5 °C、6 °C、7 °C 又は 8 °C のその親を超える熱安定性改善（T d）を有する。

30

【0096】

別の好ましい実施形態では、本発明の成熟熱安定性バリエントは、その親と比較して、少なくとも 150、好ましくは少なくとも 200、より好ましくは少なくとも 250、最も好ましくは少なくとも 300 の 91 °C での相対活性を有する。

【0097】

追加の酵素

任意選択で、アルファアミラーゼ、マルトース生成アミラーゼ、ベータアミラーゼ、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルロース分解酵素、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、グルカン 1，4-アルファマルトテトラヒドロラーゼ、グルカナナーゼ、ガラクタナーゼ、アルファガラクトシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルファグルコシダーゼ、ベータグルコシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、ヘミセルロース分解酵素、インベルターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンナーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペプチドグルタミナーゼ、ペルオキシダーゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ及びキシラナーゼなどの 1 つ以上の追加の酵素が、本発明のグルコアミラーゼと一緒に使用されてもよい。

40

【0098】

追加の酵素は、哺乳動物、植物及び微生物（細菌、酵母又は真菌）の起源を含む、任意の起源のものであってもよい。

50

【0099】

酵素組成物

本発明の成熟熱安定性グルコアミラーゼバリエーション及び任意の追加の酵素は、例えば液体の形態、特に安定化された液体でなどの任意の好適な形態で粉若しくは生地に添加されてもよい又はそれは実質的に乾燥粉末若しくは粒状物として粉若しくは生地に添加されてもよい。

【0100】

粒状物は、例えば、米国特許第4,106,991号明細書及び米国特許第4,661,452号明細書に開示されるように生産されてもよい。液体酵素調製物は、例えば、確立された手法に従って、糖若しくは糖アルコール又は乳酸を添加することによって安定化されてもよい。他の酵素安定剤は、当技術分野において周知である。

10

【0101】

酵素は、生地成分に任意の好適な方法で添加されてもよく、例えば、個々の構成成分として（酵素の別個の添加若しくは連続的な添加）又は酵素と一緒にワンステップで若しくは1つの組成物で添加するなどである。

【0102】

本明細書に記載され、主張される本発明は、本明細書に開示される特定の実施形態による範囲内に限定されるべきではない。というのは、これらの実施形態は、本発明のいくつかの態様の例証として意図されるからである。いかなる同等の実施形態も、本発明の範囲内にあること並びに実施形態の1つ以上の組み合わせであることが意図される。

20

【0103】

様々な参考文献が本明細書に引用されており、これらの開示はその全体が参照により援用される。本発明を以下の実施例によってさらに説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0104】

実施例1：PoAMGライブラリーの構築

PoAMGライブラリーを以下のように構築した：

互いに15bpのオーバーラップを有し、標的部位にNNK又は所望の突然変異を有するフォワードプライマー又はリバースプライマーを設計した。逆方向のプライマーによるプラスミドDNA配列全体の増幅を生じさせるインバースPCRを、適切な鋳型プラスミドDNA（例えば、JPO-0001遺伝子を含むプラスミドDNA）を用いて、以下の条件によって実行した。結果として生じるPCR断片をQIAquick Gel Extractionキット[QIAGEN]によって精製し、次いで、大腸菌（*Escherichia coli*）ECOS Competent *E. coli* DH5α[NIPPON GENE CO., LTD.]に導入した。プラスミドDNAを、Mag Extractorプラスミド抽出キット[TOYOBO]によって大腸菌（*E. coli*）形質転換体から抽出し、次いで、*A. niger*（*A. niger*）コンピテント細胞中に導入した。

30

PCR反応ミックス：

PrimeSTAR Max DNAポリメラーゼ[Takara]

合計25μL

1.0μL鋳型DNA(1ng/μL)

9.5μL H₂O

12.5μL 2x PrimeSTAR Max プレミックス

1.0μL フォワードプライマー(5μM)

1.0μL リバースプライマー(5μM)

PCRプログラム：

98℃/2分

25×(98℃/10秒、60℃/15秒、72℃/2分)

40

50

10℃／保持

【0105】

実施例2：より良好な熱安定性についてのスクリーニング

実施例1のように構築されたB. subtilisライブラリーを、COVE液体培地（2.0g／Lのスクロース、2.0g／Lのイソマルトース、2.0g／Lのマルトース、4.9mg／L、0.2ml／Lの5N NaOH、10ml／LのCOVE塩、10ml／Lの1Mアセトアミド）を含有する96ウェル又は24ウェルMTPのいずれかで、32℃にて3日間発酵させた。次いで、培養上清中のAMG活性を、以下のように記載されるpNPGアッセイによっていくつかの温度で測定した。

【0106】

pNPG熱安定性アッセイ：

所望の酵素を含有する培養上清を、同じ容量のpH5.0 200mMのNaOAc緩衝液と混合した。この混合物20マイクロリットルを、96ウェルプレート又は8ストリップPCRチューブのいずれかに分注し、次いで、様々な温度でサーマルサイクラーによって30分間加熱した。それらのサンプルを、pH5.0 200mMのNaOAc緩衝液中0.1%（w／v）pNPG[wako]を含有する基質溶液10μlと混合し、酵素反応のために70℃で20分間インキュベートした。反応後、60μlの0.1M Borax緩衝液を添加して、反応を停止させた。反応上清の80マイクロリットルを採取し、そのOD405値を光度計によって読み取り、酵素活性を評価した。

【0107】

【表3】

表1a. 親 anPAV498 又は JPO-0001(リーダーペプチド/プロペプチドを有する anPAV498)と比較した場合の PoAMG バリアントの相対活性のリスト

名称	80℃ / 75℃ の相対活性(%)
anPAV498	17%
JPO-004	32%
JPO-005	15%
JPO-006	16%
JPO-007	3%

【0108】

【表4】

名称	80℃ / 75℃ の相対活性(%)
AnPav498	13%
JPO-009	16%
JPO-011	15%
JPO-012	15%
JPO-013	17%
JPO-020	20%

【0109】

【表 5】

名称	80°C / 70°C の相対活性(%)
JPO-001	10%
JPO-004	29%
JPO-009	13%
JPO-014	21%
JPO-020	16%
JPO-021	30%
JPO-052	33%

10

【 0 1 1 0 】

【表 6】

名称	79°C / 70°C の相対活性(%)
JPO-001	23%
JPO-021	46%
JPO-022	39%
JPO-023	44%
JPO-025	51%
JPO-027	49%
JPO-029	37%

20

【 0 1 1 1 】

【表 7】

名称	77°C / 70°C の相対活性(%)
JPO-001	72%
JPO-029	82%
JPO-047	80%
JPO-048	90%
JPO-049	84%
JPO-050	86%
JPO-064	87%

30

40

【 0 1 1 2 】

50

【表 8】

名称	79°C / 77°C の相対活性(%)
JPO-001	36%
JPO-029	51%
JPO-047	45%
JPO-048	81%
JPO-049	53%
JPO-050	58%
JPO-064	65%

10

【 0 1 1 3 】

【表 9】

名称	79°C / 77°C の相対活性(%)
JPO-001	41%
JPO-021	60%
JPO-022	48%
JPO-023	57%
JPO-025	56%
JPO-027	64%
JPO-029	66%
JPO-047	50%
JPO-048	72%
JPO-051	82%
JPO-058	73%
JPO-062	72%
JPO-063	85%
JPO-064	83%

20

30

【 0 1 1 4 】

40

50

【表 1 0】

表 1b. 親 JPO-022 と比較した場合の PoAMG バリエントの相対活性のリスト

名称	77°C / 70°C の相対活性(%)
JPO-022	60%
JPO-027	67%
JPO-042	8%
JPO-044	86%
JPO-045	67%
JPO-046	48%

10

【0 1 1 5】

【表 1 1】

名称	77°C / 70°C の相対活性(%)
JPO-022	76%
JPO-023	75%
JPO-025	80%
JPO-027	84%
JPO-058	92%
JPO-059	88%
JPO-060	86%
JPO-061	83%
JPO-062	87%

20

30

【0 1 1 6】

【表 1 2】

名称	79°C / 77°C の相対活性(%)
JPO-022	49%
JPO-023	51%
JPO-025	52%
JPO-027	58%
JPO-058	69%
JPO-059	36%
JPO-060	41%
JPO-061	44%
JPO-062	57%

40

【0 1 1 7】

50

【表 1 3】

表 1c. 親 JPO-063 と比較した場合の PoAMG バリエントの相対活性のリスト

名称	79°C / 77°C の相対活性(%)
JPO-063	91%
JPO-066	96%
JPO-071	89%
JPO-072	84%
JPO-074	103%
JPO-075	86%
JPO-076	92%
JPO-077	95%
JPO-078	88%
JPO-079	100%

10

【 0 1 1 8】

【表 1 4】

名称	84°C / 80°C の相対活性(%)
JPO-063	16%
JPO-065	26%
JPO-067	21%
JPO-070	12%
JPO-071	13%
JPO-074	32%
JPO-081	17%
JPO-082	24%
JPO-083	46%
JPO-084	26%
JPO-044	37%

20

30

【 0 1 1 9】

40

50

【表 1 5】

名称	82℃ / 70℃ の相対活性(%)
JPO-063	21%
JPO-093	43%
JPO-081	25%
JPO-088	39%
JPO-094	38%
JPO-096	38%
JPO-106	53%

10

【 0 1 2 0 】

【表 1 6】

名称	83℃ / 80℃ の相対活性(%)
JPO-063	46%
JPO-051	44%
JPO-096	64%
JPO-106	88%
JPO-110	81%
JPO-111	100%
JPO-112	86%
JPO-113	83%
JPO-114	47%
JPO-115	90%

20

30

【 0 1 2 1 】

40

50

【表 1 7】

表 1d.親 JPO-096 と比較した場合の PoAMG バリエントの相対活性のリスト

名称	83°C / 70°C の相対活性(%)
JPO-082	53%
JPO-088	70%
JPO-091	69%
JPO-092	65%
JPO-093	62%
JPO-094	74%
JPO-095	69%
JPO-096	67%
JPO-097	65%
JPO-098	65%

10

【 0 1 2 2 】

【表 1 8】

名称	83°C / 80°C の相対活性(%)
JPO-051	20%
JPO-096	43%
JPO-109	51%
JPO-126	33%
JPO-129	48%
JPO-130	18%
JPO-131	51%
JPO-132	34%

20

30

【 0 1 2 3 】

【表 1 9】

表 1e.親 JPO-129 と比較した場合の PoAMG バリエントの相対活性のリスト

名称	84°C / 80°C の相対活性(%)
JPO-129	62%
JPO-156	51%
JPO-160	34%
JPO-161	41%
JPO-162	49%
JPO-163	21%
JPO-164	57%
JPO-165	77%

40

50

【 0 1 2 4 】

【 表 2 0 】

表 1f.親 JPO-166 と比較した場合の PoAMG バリエントの相対活性のリスト

名称	84℃ / 75℃ の相対活性(%)
JPO-166	19%
JPO-167	66%
JPO-168	58%
JPO-169	53%
JPO-171	47%
JPO-172	98%

10

【 0 1 2 5 】

20

30

40

50

【表 2 1】

表 2. PoAMG 成熟配列のバリエーションにおけるアミノ酸置換

名称	アミノ酸置換
PoAMG	ペニシリウム属(<i>Penicillium</i>)由来の野生型成熟 AMG (配列番号 1)
AMG NL	K79V
anPAV498	P2N P4S P11F T65A K79V Q327F
JPO-001	R1A P2N P4S P11F T65A K79V Q327F
JPO-018	D75N R77D A78Q
JPO-019	D75S R77G A78W V79D F80Y
JPO-023	R1A K34Y S103N
JPO-024	R1A K34Y D445N V447S
JPO-025	R1A K34Y Y504T
JPO-026	R1A S103N D445N V447S
JPO-027	R1A S103N Y504T
JPO-028	R1A D445N V447S Y504T
JPO-029	R1A K34Y S103N D445N V447S
JPO-044	R1A K34Y S103N D445N V447S E501V Y504T
JPO-047	R1A K34Y S103N Y504T
JPO-048	R1A K34Y S103N D445N V447S D566T
JPO-049	R1A K34Y S103N Q594R F595S
JPO-050	R1A K34Y S103N Y504T Q594R F595S
JPO-051	R1A K34Y S103N D445N V447S Y504T Q594R F595S
JPO-052	R1A S105L
JPO-053	R1A S105E
JPO-055	R1A A132R
JPO-058	R1A K34Y S105L Y504T Q594R F595S
JPO-059	R1A K34Y S103N S105L Y504T Q594R F595S
JPO-060	R1A K34Y S103N S105L Y504T Q594R F595S
JPO-061	R1A K34Y S103N S105L Y504T D566T Q594R F595S
JPO-062	R1A K34Y S103N S105L D445N V447S Y504T D566T Q594R F595S
JPO-063	R1A K34Y S103N S105L A132R D445N V447S Y504T D566T Q594R F595S
JPO-064	R1A K34Y S103N S105L D445N V447S D566T Q594R F595S

10

20

30

40

【0 1 2 6】

50

【表 2 2】

JPO-065	R1A K34Y S103N S105L A132R D445N V447S E501V Y504T D566T Q594R R1A F595S
JPO-066	R1A K34Y S103N A132R D445N V447S Y504T D566T Q594R F595S
JPO-069	R1A K34Y S103N S105L A132R D445N V447S Y504T D566T V592T
JPO-071	R1A G6S G7T K34Y S103N S105L A132R D445N V447S Y504T D566T Q594R R1A F595S
JPO-074	R1A K34Y S103N P107L A132R D445N V447S Y504T D566T Q594R F595S
JPO-083	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132R D445N V447S Y504T D566T Q594R R1A F595S
JPO-084	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132R D445N V447S Y504T D566T V592T R1A Q594R F595S
JPO-091	R1A G6S R7T K34Y S103N P107L A132P D445N V447S Y504T D566T Q594R F595S
JPO-092	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132R D445N V447S Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-093	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132P D445N V447S Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-094	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132R D445N V447S S481P Y504T D566T Q594R F595S
JPO-095	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132R D445N V447S S481P Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-096	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132P D445N V447S D566T T568V Q594R F595S
JPO-097	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L T110W A132P D445N V447S Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-098	R1A G6S G7T K34Y E50R S103N P107L A132P D445N V447S Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-105	R1A G6S G7T K34Y S103N P107L A132P D445N V447S E501V Y504T
JPO-106	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N P107L A132P D445N V447S Y504T D566T T568V Q594R F595S

10

20

30

40

【0 1 2 7】

50

【表 2 3】

JPO-108	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N P107L A132P D445N V447S S481P Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-109	R1A G6S G7T K34Y E50R S103N P107L A132P D445N V447S S481P Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-111	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N P107L A132P D445N V447S S481P E501V Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-112	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N P107L A132P D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
JPO-114	R1A K34Y D75N R77D A78Q S103N R138L D445N V447S Y504T Q594R F595S
JPO-115	R1A G6S G7T R31F K34Y D75N R77D A78Q S103N P107L A132P D445N V447S S481P Y504T D566T T568V Q594R F595S
JPO-124	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N A132P D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
JPO-125	R1A G6S G7T K34Y E50R S103N A132P D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
JPO-126	R1A R31F K34Y D75N R77D A78Q S103N R138L D445N V447S Y504T Q594R F595S
JPO-127	R1A K34Y D75N R77D A78Q S103N R138L D445N V447S Q594R F595S
JPO-128	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N A132P D445N V447S
JPO-129	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
JPO-130	R1A K34Y E50R D75N R77D A78Q S103N R138L D445N V447S Q594R F595S
JPO-131	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R D75N R77D A78Q S103N A132P D445N V447S S481P D566T Q594R F595S
JPO-132	R1A R31F K34Y E50R D75N R77D A78Q S103N R138L D445N V447S Q594R F595S
JPO-133	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R D75N R77D A78Q S103N A132P R138L D445N V447S S481P D566T Q594R F595S

10

20

30

40

【 0 1 2 8 】

【表 2 4】

JPO-138	R1A R135S
JPO-143	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P D445N V447S S481P E501L D566T T568V Q594R F595S
JPO-154	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N A132P R138G D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
JPO-155	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N A132P R138L D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
JPO-156	R1A G6S G7T R31F K34Y S103N A132P R138P D445N V447S S481P D566T T568V Q594R F595S
JPO-167	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P S379P D445N V447S S481P E501A D566T T568V Q594R F595S
JPO-168	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P D445N V447S S481P T484P E501A D566T T568V Q594R F595S
JPO-169	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P D445N V447S S481P E501A N539P D566T T568V Q594R F595S
JPO-171	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P S379P D445N V447S S481P T484P E501A D566T T568V Q594R F595S
JPO-172	R1A G6S G7T R31F K34Y E50R S103N A132P D445N V447S S481P T484P E501A N539P D566T T568V Q594R F595S

10

20

30

40

50

【0129】

実施例3：アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) の発酵

アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 株を、4ml 50% 尿素とともに100ml MU1を含有する500mlバッフル付きフラスコ中で回転振盪台上で220rpm、30℃にて発酵させた。培養ブ罗斯を遠心分離(10,000xg、20分)して、上清を沈殿物から慎重にデカントした。

【0130】

実施例4：PoAMG (JPO-001) バリアントの精製

PoAMGバリアントを、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。各々のピーク分画を個々にプールし、20mMの酢酸ナトリウム緩衝液pH5.0に対して透析し、次いで、サンプルを遠心分離フィルターユニット (Vivaspin Turbo 15、Sartorius) を使用して濃縮した。酵素濃度をA280値によって決定した。

【0131】

実施例5：熱安定性の決定 (TSA)

精製した酵素を50mMの酢酸ナトリウム緩衝液pH5.0で0.5mg/mlまで希釈し、Milli-Q水で希釈した等量のSYPRO Orange (Invitrogen) と混合した。18ulの混合物溶液をLightCycler 480 Multiwell Plate 384 (Roche Diagnostics) に移し、プレートを実験した。

TSAの装置パラメータ：

機器：LightCycler 480リアルタイムPCRシステム（Roche Applied Science）

走査速度：0.02℃／秒

走査範囲：37～96℃

積分時間：1.0秒

励起波長 465nm

発光波長 580nm

【0132】

得られた蛍光シグナルを、0と1の範囲に標準化した。Tdは、シグナル強度が0.5であった温度として定義された。熱安定性改善が表3にリストされており、anPAV498として表記されるPoAMGバリエーションのTdを0とする。

10

【0133】

実施例6：PoAMG活性アッセイ

GOD-POD法によるマルトデキストリン（DE11）アッセイ

基質溶液

30gのマルトデキストリン（MATSUTANI chemical industry Co., Ltd. 製のpindex #2）

100mlの120mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.0

グルコースCII試験キット（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）

20

【0134】

20ulの酵素サンプルを、100ulの基質溶液と混合し、設定温度で2時間インキュベートした。サンプルをアルミニウムブロック上で3分間冷却し、次いで、10ulの反応溶液を590ulの1M トリス-HCl pH8.0と混合して反応を停止させた。10ulの溶液を試験キットの200ulの標準溶液と混合し、次いで、室温で15分間放置した。A505での吸光度を読み取った。活性をanPAV498と表記されるPoAMGバリエーションの相対活性として表3にリストする。

【0135】

30

40

50

【表 2 5】

表 3

変異体	Td 改善[°C] (pH5.0, anPAV498 を 0 とする)	91°C での活性 (anPAV498 を 100 とする)
anPAV498	-	100
JPO-001	1.0	94
JPO-004	2.2	-
JPO-009	0.7	-
JPO-013	1.5	-
JPO-014	2.3	-
JPO-020	1.4	74
JPO-021	2.5	113
JPO-052	2.6	85
JPO-053	0.2	71
JPO-055	1.6	85
JPO-023	3.6	-
JPO-024	2.5	-
JPO-025	3.4	-
JPO-027	2.9	-
JPO-029	3.7	191
JPO-048	4.3	163
JPO-051	5.7	222
JPO-058	4.2	157
JPO-062	4.2	159
JPO-063	5.4	107
JPO-064	4.9	178
JPO-065	7.0	127
JPO-066	6.5	178
JPO-069	4.8	95
JPO-071	6.1	128
JPO-074	6.3	108

10

20

30

40

【0 1 3 6】

50

【表 2 6】

JPO-081	5.5	213
JPO-082	5.6	215
JPO-089	6.0	171
JPO-090	5.5	155
JPO-018	0.6	84
JPO-019	0.5	86
JPO-044	6.3	225
JPO-083	6.1	103
JPO-084	4.4	66
JPO-099	6.8	156
JPO-091	6.6	130
JPO-092	6.7	113
JPO-093	6.8	132
JPO-094	6.6	126
JPO-095	6.9	-
JPO-096	5.9	-
JPO-097	5.2	-
JPO-098	5.6	-
JPO-112	8.2	-
JPO-114	5.2	218
JPO-115	8.0	-
JPO-108	8.5	-
JPO-109	7.2	-
JPO-111	8.4	-
JPO-124	8.0	385
JPO-125	6.8	324
JPO-126	6.6	268
JPO-127	4.9	246
JPO-129	8.2	399
JPO-130	5.3	278
JPO-131	7.9	367
JPO-132	6.6	336

10

20

30

40

【 0 1 3 7 】

50

【表 2 7】

JPO-138	6.4	125
JPO-133	6.1	143
JPO-143	8.8	280
JPO-154	7.6	252
JPO-155	8.3	282
JPO-156	8.3	290
JPO-145	8.2	-
JPO-147	8.2	-
JPO-150	8.2	-
JPO-152	8.4	-
JPO-153	9.0	399
JPO-161	6.0	200
JPO-165	8.9	403
JPO-166	7.0	237
JPO-167	9.1	387
JPO-168	9.3	332
JPO-169	9.6	269
JPO-171	9.4	255
JPO-172	9.9	432

10

20

【0138】

実施例 7：蒸しパンにおける P o A M G の使用

30

華北の蒸しパンを、表 4 及び表 5 に従うレシピによりストレート生地プロセスによって調製した。本明細書で使用される原料はすべて、食品等級のものであり、P o A M G バリエーション J P O - 1 7 2（本明細書で使用される 7 5 p p m は 2 4 . 4 5 m g E P / 粉 1 0 0 0 g に相当する）及びマルトース生成アルファアミラーゼを使用した。本明細書におけるマルトース生成アルファアミラーゼは、Novamyl Boost（Novozymes の商品）とする。手短かに言えば、粉、酵母及び蒸しパン食品添加物の重さを量り、生地タンク（縦型ミキサー、DIOSNA ブランド）に入れ、次いで酵素及び水を添加した。生地が形成され、生地表面が滑らかになるまで、混合物を 6 分間低速で攪拌し、生地が理想的な度合いに達するまで、生地をシート状にした。シート状にする時間は、手ざわりに頼る。シート状にした後、生地を約 1 1 0 g に計量し、それを成型し、蒸しパン形状にした。成型した生地を、3 5 °C で約 4 0 分間発酵用の機械に入れた（部屋の湿度約 8 0 %）。発酵後、生地を、スチーマー（1 0 0 °C）に置き、2 0 分間蒸した。次いで、スチームを切り、約 5 分後、蒸しパンを取り出し、2 時間室温で冷やし、その後、調製した蒸しパンを、テクスチャー及び官能評価のために密封したプラスチック包装で包装した。

40

【0139】

蒸しパンの蒸し直し：調製した蒸しパンを、室温で 2 4 時間又は 4 °C の冷蔵庫で 4 8 時間保存し、次いで、それを、スチーマー（1 0 0 °C）において約 1 5 分間蒸し直した。次いで、スチームを止め、約 5 分後、蒸し直した蒸しパンを官能評価のために取り出した。

【0140】

50

【表 2 8】

表 4.北部の蒸しパンのレシピ

レシピ	供給元	重量パーセンテージ% (粉に基づく)
小麦粉	Wudeili, 中国	100
酵母(活性が高い乾燥酵母)	Angel Yeast	0.8
蒸しパン食品添加物	Angel Yeast (haodadangブランド)	0.5
水		50-52
JPO-172	/	表5を参照されたい
Novamyl Boost	Novozymes A/S	

10

【0 1 4 1】

【表 2 9】

表 5:

バッチ	JPO-172	Novamyl Boost
A	0	0
B	75 ppm	0
C	0	100 ppm

20

【0 1 4 2】

サンプル特性評価

硬さを決定するための方法：蒸しパンをスライサーを使用することによって分け（各蒸しパンのスライスの厚さは1.2 cmとした）、2枚のスライスした蒸しパンのスライスを1つにまとめ（厚さは2.4 cmとなった）、T A . X T P l u s テクスチャーアナライザーによって決定した。グラムを単位として使用し、硬さの値が高いほど、調製した蒸しパンの品質が悪いことを表す。

30

【0 1 4 3】

弾力を決定するための方法：蒸しパンをスライサーを使用することによって分けた（各蒸しパンのスライスの厚さは1.2 cmとした）。2枚のスライスした蒸しパンのスライスを1つにまとめ（厚さは2.4 cmとなった）、T A . X T P l u s テクスチャーアナライザーによって決定した。%を単位として使用した。弾力値が高いほど、調製した蒸しパンの品質が良好であることを表す。

40

【0 1 4 4】

官能評価：

官能評価を実行するために、パネル（5人のよく訓練された人）を、蒸しパン／蒸し直した蒸しパンの品質を判断するために使用した。柔らかさ、弾力、外観の白さ、クラム構造、水分、凝集性、咀嚼性及び／又は甘味度などのパラメータに点数を与えた。バッチAにおいて調製した蒸しパンに5.0ポイントの点数を与え、ベースラインとして使用した。平均値を総合評価のためにとり、平均値の点数が高いほど、調製した蒸しパンの品質が良好であったことが表された。

【0 1 4 5】

50

【表 3 0】

表 6.室温で 24 時間保存した蒸しパンの硬さおよび弾力

バッチ	硬さ/ g	弾力/%
A	2655	54.96
B	1512	63.21
C	1691	60.67

10

【0 1 4 6】

表 6 から分かるように、対照（バッチ A）と比較して、P o A M G（J P O－1 7 2）及び N o v a m y l B o o s t を蒸しパンの調製中に使用した場合、蒸しパンの硬さは両方とも著しく低下したが、蒸しパンの弾力もまた両方とも改善した。しかしながら、対比すると、P o A M G（J P O－1 7 2）は、N o v a m y l B o o s t よりも良好な効果を示した。

【0 1 4 7】

調製した蒸しパンの各バッチを 2 4 時間室温で保存した後に官能評価にかけ、結果を表 7 に示す。対照（バッチ A）と比較して、生地に P o A M G（J P O－1 7 2）及び N o v a m y l B o o s t を添加することにより、触感の柔らかさ、触感の弾力などの蒸しパンの官能評価が改善され、クラム構造、水分、凝集性及び咀嚼性もまた改善された。加えて、P o A M G（J P O－1 7 2）はまた、蒸しパンの甘味度も改善した。対比すると、P o A M G（J P O－1 7 2）は、蒸しパンの品質を改善することにおいて N o v a m y l B o o s t よりも著しく良好であった。

20

【0 1 4 8】

【表 3 1】

表 7.蒸しパンの官能評価(室温で 24 時間後)

バッチ	触 感 の 柔らかさ	触 感 の 弾 力	外 観 の 白 さ	ク ラ ム 構 造	水 分	凝 集 性	咀 嚼 性	甘 味 度	平均
A	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
B	6.3	6.0	4.8	5.1	5.5	5.7	5.7	5.7	5.6
C	5.8	5.5	4.3	4.9	5.6	5.7	5.7	5.3	5.3

30

【0 1 4 9】

調製した蒸しパンの各バッチを 2 4 時間室温で保存し、次いで蒸し直し、次いでそれらを室温まで冷却し、その後、そのような蒸し直した蒸しパンを官能評価にかけ、結果を表 8 に示した。

【0 1 5 0】

40

【表 3 2】

表 8. 蒸しパンの官能評価(24 時間室温で保存した後に蒸し直す)

	触感の柔 らかさ	触 感 の 弾 力	外観の白さ	クラム構造	咀嚼性	甘味度	平均
A	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
B	5.6	5.6	5.5	5.6	5.0	5.5	5.5
C	4.8	4.8	4.4	4.6	4.8	5.0	4.7

10

【0 1 5 1】

調製した蒸しパンの各バッチを 4℃で 48 時間保存し、次いで蒸し直し、次いでそれらを室温まで冷却し、その後、そのような蒸し直した蒸しパンを官能評価にかけ、結果を表 9 に示した。

【0 1 5 2】

【表 3 3】

20

表 9: 蒸しパンの官能評価(4℃で 48 時間保存した後に蒸し直す)

	触感の柔 らかさ	触 感 の 弾 力	外観の白さ	クラム構造	咀嚼性	甘味度	平均
A	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
B	5.5	5.5	5.5	5.3	5.2	5.4	5.4
C	4.9	5.0	4.4	5.1	4.7	5.0	4.8

30

【0 1 5 3】

表 8 及び表 9 から分かるように、対照（バッチ A）と比較して、生地には P o A M G（J P O - 1 7 2）を添加することにより、触感の柔らかさ、触感の弾力などの蒸し直した蒸しパンの官能評価が明らかに改善され、クラム構造、咀嚼性及び甘味度はすべて改善された。P o A M G（J P O - 1 7 2）はまた、蒸し直した蒸しパンの外観の白さも改善した。しかしながら、対比すると、N o v a m y l B o o s t が添加された場合であっても、蒸し直した蒸しパンの官能評価は良好ではなく、さらにバッチ A ほど良好でなかった。

【0 1 5 4】

実施例 8：蒸しスポンジライスケーキにおける P O A M G の使用

蒸しスポンジライスケーキを、表 10 及び表 11 に従うレシピにより調製し、手短かに言えば、容器において蒸しスポンジライスケーキプレミックスパウダー及び水を混合することによって米ペーストを調製し、バッチ A を酵素なしの対照とし、P o A M G（J P O - 1 7 2）をバッチ B として米ペーストに添加した。混合物を密封し、35℃で 16 時間発酵させ、次いで、スクロース及びベーキングパウダーを発酵後に添加した。その後、発酵させた混合物を攪拌し、型に入れ、次いでスチーマー（100℃）で約 15 分間蒸した。次いで、スチームを切り、約 5 分後、蒸しスポンジライスケーキを取り出し、テクスチャー及び官能評価のために 3 時間室温で冷やした。

40

【0 1 5 5】

50

【表 3 4】

表 10. 蒸しスポンジライスケーキのレシピ

レシピ	重量パーセンテージ% (プレミックスパウダーに基づく)
蒸しスポンジライスケーキプレミックスパウダー (Angel Yeast から市販で入手可能)	100
水	100
スクロース	17
ベーキングパウダー	2

10

【0 1 5 6】

【表 3 5】

表 11:

バッチ	含有量
A	0
B	65 mg EP/プレミックスパウダー 1000g

20

【0 1 5 7】

硬さを決定するための方法：型の外縁に沿って蒸しスポンジライスケーキの平面をカットし（各サンプルの高さは 2.5 cm とした）、硬さを T A . X T P l u s テクスチャアナライザーによって決定した。グラムを単位として使用し、硬さの値が高いほど、調製した製品の品質が悪いことを表す。

【0 1 5 8】

弾力を決定するための方法：型の外縁に沿って蒸しスポンジライスケーキの平面をカットし（各サンプルの高さは 2.5 cm とした）、弾力を T A . X T P l u s テクスチャアナライザーによって決定した。弾力値が高いほど、調製した製品の品質が良好であることを表す。

【0 1 5 9】

官能評価：

官能評価を実行するために、パネル（5 人のよく訓練された人）を、蒸しスポンジライスケーキの品質を判断するために使用した。柔らかさについての口あたり、水分についての口あたり、弾力についての口あたり、クラム構造及び甘味度などのパラメータに点数を与えた。バッチ A において調製した蒸しスポンジライスケーキに 5.0 ポイントの点数を与え、ベースラインとして使用した。平均値を総合評価のためにとり、平均値の点数が高いほど、調製した蒸しスポンジケーキの品質が良好であったことを表した。

30

40

【0 1 6 0】

調製した蒸しスポンジライスケーキの官能評価を表 1 2 に示す。P o A M G（J P O - 1 7 2）をペーストに添加した場合、調製した蒸しスポンジケーキの柔らかさについての口あたり、水分についての口あたり、弾力についての口あたり及び甘味度は改善され、クラム構造が損なわれることはなかった。

【0 1 6 1】

50

【表 3 6】

表 12: 蒸しスポンジライスケーキの官能評価

バッチ	柔らかさにつ いての口あた り	水分につい ての口あたり	弾力につい ての口あた り	クラム構 造	甘味度
A	5	5	5	5	5
B	6.4	6.1	5.9	5	5.5

【0 1 6 2】

10

加えて、テクスチャー解析の結果が表 1 3 から分かるように、P o A M G（J P O－1 7 2）を蒸しスポンジライスケーキの調製において使用した場合、調製した蒸しスポンジライスケーキは、硬さが低下し、弾力が改善された。

【0 1 6 3】

【表 3 7】

表 13: 硬さ及び弾力

バッチ	硬さ/g	弾力/%
A	3435.25	74.18
B	1810.09	77.08

20

30

40

50

【図面】

【図 1 - 1】

图 1

オオサキナミ (P_oosakina) RPPDKGGNLTFTPIHKGERSLGGTLDNLGGRGKKTPTAAGLFTASPTNTNPNVYYTWTTR
 AMS_NL RDPDKGGNLTFTPIHKGERSLGGTLDNLGGRGKKTPTAAGLFTASPTNTNPNVYYTWTTR
 AMS_PAV498 RNDSGKGGNLTFTPIHKGERSLGGTLDNLGGRGKKTPTAAGLFTASPTNTNPNVYYTWTTR
 P_ミズノササゲ (P_mizunosasage) RPPDKGGNLTFTPIHKGERSLGGTLDNLGGRGKKTPTAAGLFTASPTNTNPNVYYTWTTR
 JQ0124 ANDKSTNTLTFTPIHKGERSLGGTLDNLGGGPKTPTAAGLFTASPTNTNPNVYYTWTTR
 JQ0172 ANDKSTNTLTFTPIHKGERSLGGTLDNLGGGPKTPTAAGLFTASPTNTNPNVYYTWTTR
 P_ミズノササゲ (P_mizunosasage) PPTSDAKRNASVYIKSGEGRIVGTLNLGGGSKTPTAAGLFTASPTNNMNNYYTWTTR
 P_ミズノササゲ (P_mizunosasage) ---NDTGNLSVYATKGRGKKTPTAAGLFTASPTNTNPNVYYTWTTR
 P_タカラサビ (P_takarasabi) NFNDSKSTNTLTFTPIHKGERSLGGTLDNLGGVYAPGAPGAGLFTASPTNTNPNVYYTWTTR

[illegible][illegible]

オオネナシ (<i>o. onenashi</i>)	QYNNNTGFDLMEEDVGS ³ FTTIAVQIRALRVGGSLAKLKGSCACD ³ SPPO ³ LCTFLQF ³ LS ³
AMG NI	QYNNNTGFDLMEEDVGS ³ FTTIAVQIRALRVGGSLAKLKGSCACD ³ SPPO ³ LCTFLQF ³ LS ³
AMG an_PAN498	QYNNNTGFDLMEEDVGS ³ FTTIAVQIRALRVGGSLAKLKGSCACD ³ SPPO ³ LCTFLQF ³ LS ³
QJ024	QYNNNTGFDLMEEDVGS ³ FTTIAVQIRALRVGGSLAKLKGSCACD ³ SPPO ³ LCTFLQF ³ LS ³
QJ0172	QYNNNTGFDLMEEDVGS ³ FTTIAVQIRALRVGGSLAKLKGSCACD ³ SPPO ³ LCTFLQF ³ LS ³
P.ミシシジキ (<i>p. misizakii</i>)	QYNNNTGFDLMEEDVGS ³ FTTIAVQIRISIRVGGSLAKLKGSCACD ³ SPPO ³ LCTFLQF ³ LS ³
P.ルサティ (<i>p. russali</i>)	QYNNNTGFDLMEEDVGS ³ FTTIAVQIRALRVGGSLAKLKGSCACD ³ SPPO ³ LCTFLQF ³ LS ³
P.ジュバ (<i>p. jubatus</i>)	QYNNNTGFDLMEEDVGS ³ FTTIAVQIRALRVGGSLAKLKGSCACD ³ SPPO ³ LCTFLQF ³ LS ³

AMG_KAL(P_caudum) WNGKNTTNNINTQASRSGLDLSVLSGTHFDPEAACDSTGTCFQCSARALAHNVKVVDSF
 AMG_nPFAV498 WNGKNTTNSINTQASRSGLDLSVLSGTHFDPEAACDSTGTCFQCSARALAHNVKVVDSF
 FJ0001 WNGKNTTNSINTQASRSGLDLSVLSGTHFDPEAACDSTGTCFQCSARALAHNVKVVDSF
 FJ0172 WNGKNTTNNINTQASRSGLDLSVLSGTHFDPEAACDSTGTCFQCSARALAHNVKVVDSF
 F_ミロシナスイド_mizushima WNGKNTTANNINDLSRSGLDLSLGSHTHFDPEASCDSTGTCFQCSARALAHNVKVVADP
 F_ルルセイイ_fusume WNGKNTTANNINDLSRSGLDLSLGSHTHFDPEASCDSTGTCFQCSARALAHNVKVVADP
 F_アラバム_f_alabum WNGKNTTANNINDLSRSGLDLSLGSHTHFDPEASCDSTGTCFQCSARALAHNVKVVADP

【配列表】

2025514825000001.xml

【図 1 - 2】

図1 - 続き

[illegible]

```

P_オキナキラム(P_oocinum) TSLSFFKFDPAVATKIGVSYNSNTKYKJLQTSKSADVGDLQVQQVTSPGSLAEGYDYN
P_ANG_NL TSLSFFKFDPAVATKIGVSYNSNTKYKJLQTSKSADVGDLQVQQVTSPGSLAEGYDYN
P_ANG_narFAV498 TSLSFFKFDPAVATKIGVSYNSNTKYKJLQTSKSADVGDLQVQQVTSPGSLAEGYDYN
P_10P012 TSLSFFKFDPAVATKIGVSYNSNTKYKJLQTSKSADVGDLQVQQVTSPGSLAEGYDYN
P_10P102 TSLSFFKFDPAVATKIGVSYNSNTKYKJLQTSKSADVGDLQVQQVTSPGSLAEGYDYN
P_ミヨシノシロシイ(P_miyoshinoshiro) TSLSAFFKFDPAVAKTGTSAHSSTYKSLTSLRTVADDFGLVQDVTSPGSLAEGYDYN
P_ルベウチシ(P_rubeuchisi) TSLSIAFFKFDPAVAKTGTSAHSASVRLTSLRTVADDFGLVQDVTSPGSLAEGYDYN
P_アラウラム(P_alaulam) TSLSIAFFKFDPAVAKTGTSAHSATKSLTSLRTVADDFGLVQDVTSPGSLAEGYDYN

```

```

オオキヤクハク (oohikyaku) TAAPLNDLNSFLSASFATATQRDAVVPBHWGAKSNKVFVTCSSASVVGVIYKATPTE
ANG_NL TAAPLNDLNSFLSASFATATQRDAVVPBHWGAKSNKVFVTCSSASVVGVIYKATPTE
ANG_narFAV98 TAAPLNDLNSFLSASFATATQRDAVVPBHWGAKSNKVFVTCSSASVVGVIYKATPTE
P_0102 TAAPLNDLNSFLSASFATATQRDAVVPBHWGAKSNKVFVTCSSASVVGVIYKATPTE
P_0172 TAAPLNDLNSFLSASFATATQRDAVVPBHWGAKSNKVFVTCSSASVVGVIYKATPTE
P_mis322 (P_mis322) TGTLPLNDLNSFLSASFATATERRASVPBHWGAKSNKVFVTCSSASVVGVIYKATPTE
P_nar317 (P_nar317) TGTLPLNDLNSFLSASFATATERRASVPBHWGAKSNKVFVTCSSASVVGVIYKATPTE
P_サブラム (P_subram) TVSLNDLNSFLSASFATATERRASVPBHWGAKSNKVFVTCSSASVVGVIYKATPTE

```

[illegible]

メロニソチアミド_P_oxalium	1WFAFSEVPEPATGTEFFEYKYKVEINGDI--TWEGKGNRNVFAVATGCPVDPHSNDVQGF
ANG_NL	1WFAFSEVPEPATGTEFFEYKYKVEINGDI--TWEGKGNRNVFAVATGCPVDPHSNDVQGF
ANG_AM_PAV498	1WFAFSEVPEPATGTEFFEYKYKVEINGDI--TWEGKGNRNVFAVATGCPVDPHSNDVQGF
UF0001	1WFAFSEVPEPATGTEFFEYKYKVEINGDI--TWEGKGNRNVFAVATGCPVDPHSNDVQGF
UF0002	1WFAFSEVPEPATGTEFFEYKYKVEINGDI--TWEGKGNRNVFAVATGCPVDPHSNDVQGF
UF0172	1WFAFSEVPEPATGTEFFEYKYKVEINGTI--TWEGKGNRNVFAVATGCPVDPHSNDVQGF
メ_ミソチンステイド(P_mezynolide)	1WFAFSEVPEPATGTEFFEYKYKVEINGTV--IWENGENRVFAVATGCPQIPQSDVNRV
メ_アルビチド(P_arsibolide)	1WFAFSEVPEPATGTEFFEYKYKVEINGTV--IWENGENRVFAVATGCPQIPQSDVNRV
メ_グラブミド(P_glabum)	1WFGTLEVPATGTEFFEYKYKVEINGTVTW--WEGDNRNVFAVATGCTGCPQIPQSDVNRV

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
	International application No. PCT/EP2022/083874
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/083874

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A21D8/04 A21D13/062 C12N9/34
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A21D C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/007618 A1 (FENG GUOHUA [US] ET AL) 14 January 2016 (2016-01-14)	17, 18
Y	paragraphs [0003], [0006], [0007] - [0042], [0051], [0057], [0058], [0065]; figures 1-16; examples 1-5	1-5, 12-18
Y	WO 2011/127802 A1 (NOVOZYMES AS [DK]; LI MING [CN] ET AL.) 20 October 2011 (2011-10-20) page 10, line 11 - page 11, line 9; example 8; sequence 2	1-5, 12-18
Y	US 2019/062792 A9 (NOVOZYMES AS [DK]) 28 February 2019 (2019-02-28) paragraph [0218] - paragraph [0228]	1-18
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 March 2023

Date of mailing of the international search report

16/03/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schlegel, Birgit

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/083874

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CA 3 098 718 A1 (NOVOZYMES AS [DK]) 5 December 2019 (2019-12-05) page 76, line 31 - page 79, line 25 -----	1-18
Y	US 2014/037790 A1 (XU QINGLONG [JP] ET AL) 6 February 2014 (2014-02-06) the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/083874

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2016007618 A1	14-01-2016	BR 112017000004 A2	07-11-2017
		CA 2954220 A1	14-01-2016
		CN 106659168 A	10-05-2017
		DK 3166412 T3	11-07-2022
		EP 3166412 A1	17-05-2017
		EP 4108087 A1	28-12-2022
		ES 2921532 T3	29-08-2022
		JP 6548679 B2	24-07-2019
		JP 2017524355 A	31-08-2017
		PL 3166412 T3	10-10-2022
		PT 3166412 T	12-07-2022
		US 2016007618 A1	14-01-2016
		US 2017188593 A1	06-07-2017
		US 2018242598 A1	30-08-2018
		US 2022279802 A1	08-09-2022
		WO 2016005452 A1	14-01-2016
WO 2011127802 A1	20-10-2011	AU 2011239257 A1	09-08-2012
		CA 2795806 A1	20-10-2011
		DK 2558484 T3	29-03-2016
		EP 2558484 A1	20-02-2013
		EP 2558584 A1	20-02-2013
		ES 2565060 T3	31-03-2016
		ES 2569033 T3	06-05-2016
		MX 338068 B	01-04-2016
		US 2013095522 A1	18-04-2013
		WO 2011127802 A1	20-10-2011
		WO 2011127820 A1	20-10-2011
US 2019062792 A9	28-02-2019	AR 093680 A1	17-06-2015
		CA 2890383 A1	05-06-2014
		CN 104812905 A	29-07-2015
		CN 114921501 A	19-08-2022
		EP 2925872 A1	07-10-2015
		ES 2749652 T3	23-03-2020
		US 2015291984 A1	15-10-2015
		US 2018245105 A1	30-08-2018
		US 2020095615 A1	26-03-2020
		US 2021230644 A1	29-07-2021
		WO 2014085439 A1	05-06-2014
CA 3098718 A1	05-12-2019	BR 112020024347 A2	23-02-2021
		CA 3098718 A1	05-12-2019
		CN 112166197 A	01-01-2021
		EP 3810785 A2	28-04-2021
		US 2021198618 A1	01-07-2021
		WO 2019231944 A2	05-12-2019
US 2014037790 A1	06-02-2014	CN 103402362 A	20-11-2013
		JP WO2012117879 A1	07-07-2014
		US 2014037790 A1	06-02-2014
		WO 2012117879 A1	07-09-2012

フロントページの続き

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,
ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C
O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX
,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,
SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

中華人民共和国, ベイジン 100085, ハイティエン ディストリクト, シャンハイ ゾーン,
シンシー ロード 14

(72)発明者 ワン ヤーチェン

中華人民共和国, ベイジン 100085, ハイティエン ディストリクト, シャンハイ ゾーン,
シンシー ロード 14

(72)発明者 ホアン リーイェン

中華人民共和国, ベイジン 100085, ハイティエン ディストリクト, シャンハイ ゾーン,
シンシー ロード 14

F ターム (参考) 4B014 GG02 GG03 GG15 GP14 GP27

4B032 DB01 DB06 DB40 DG02 DG08 DK12 DK51 DK55 DK70 DP23
DP46

4B035 LC05 LG32 LG35 LG51 LP03

4B046 LA01 LB05 LC09 LC20 LG46 LP38