

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008 年 8 月 28 日 (28.08.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/102743 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 19/18 (2006.01) *C12R 1/07* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/052691
- (22) 国際出願日: 2008 年 2 月 19 日 (19.02.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-037504 2007 年 2 月 19 日 (19.02.2007) JP
特願2007-037505 2007 年 2 月 19 日 (19.02.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 旭化成ケミカルズ株式会社 (ASAHI KASEI CHEMICALS CORPORATION) [JP/JP]; 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目 105 番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 今津 晋一 (IMAZU, Shinichi) [JP/JP]; 〒1008440 東京都千代田区有楽町一丁目 1 番 2 号 Tokyo (JP). 小西 一誠 (KONISHI, Kazunobu) [JP/JP]; 〒1008440 東京都千代田区有楽町一丁目 1 番 2 号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKs & Co.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: NOVEL α -GALACTOSIDASE

(54) 発明の名称: 新規な α -ガラクトシダーゼ

(57) Abstract: A novel α -galactosidase with which raffinose can be selectively synthesized. The α -galactosidase has the property of attaining a selectivity to raffinose of 65% or higher when the dehydrating condensation of sucrose and galactose as raw materials yields oligosaccharides having a raffinose content of 0.5% or higher.

(57) 要約: 本発明の目的は、選択的にラフィノースを合成することが可能な新規 α -ガラクトシダーゼを提供することである。本発明によれば、スクロースとガラクトースを原料とした脱水縮合反応において、生成オリゴ糖中のラフィノース含有率が 0.5% 以上のとき、ラフィノース合成選択率が 65% 以上という性質を有する α -ガラクトシダーゼが提供される。



WO 2008/102743 A1

明 細 書

新規な α -ガラクトシダーゼ

技術分野

[0001] 本発明は、新規な α -ガラクトシダーゼ、および、それらを用いたラフィノースの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、食生活・社会生活が多様化する中で、健康に対する意識向上から消費者の食品や食品素材等への関心が高まっている。その中で、ラフィノースは、腸内細菌叢を改善する等の機能を有することが認められ、飲食品や医薬品、香粧品等あるいは、その原料として注目を浴びている。さらに最近では、免疫賦活作用やアトピー性皮膚炎に対してもラフィノースが有用であることが明らかとなってきた。

[0003] 現在、ラフィノースは、ビート糖製造の際の副産物として回収されているが、ビート中のラフィノース含有量は0.1%程度に過ぎず、生産量は、主生産物である砂糖の生産量にも関わってくるため、ラフィノース増産には限界がある。

[0004] 従って、このような有用特性をもつラフィノースを安価かつ安定的に市場へ供給するために、天然物からの抽出品のみでなく、安価な原料からの合成品が求められている。

[0005] これまでに試みられている、ラフィノースの合成方法としては、 α -ガラクトシダーゼによる触媒作用を利用した方法が挙げられ、スクロースをガラクトース受容体とし、メリビオースをガラクトース供与体として用いてラフィノースを得る方法(例えば、特許文献1、非特許文献1、非特許文献2参照)が報告されている。ガラクトース供与体としてはこの他にもp-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノイドを利用する方法(例えば、非特許文献3参照)、ガラクチノールを利用する方法(例えば、特許文献2参照)、ガラクトビオースを利用する方法(例えば、特許文献3参照)などが報告されている。

[0006] また、安価なスクロースとガラクトースを原料として利用可能な例もいくつか報告されている。例えば、*Pycnoporus cinnabarinus* 由来の α -ガラクトシダーゼを使用して、ラフィノースを得る方法(例えば、非特許文献4参照)や、*Mortierella vinacea* 由来の

α -ガラクトシダーゼを利用してラフィノースを合成する方法が開示されている(例えば、非特許文献5参照)。

[0007] 特許文献1:特許第2688854号

特許文献2:特開平10-84973

特許文献3:特公平8-24592

非特許文献1:Agric. Biol. Chem., 52(9), 2305-2311, 1988

非特許文献2:Biosci. Biotech. Biochem., 59(4), 619-623, 1995

非特許文献3:Phytochemistry, 18, 35-38, 1979

非特許文献4:Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 38(8), 722-728, 1991

非特許文献5:Carbohydr. Res., 185, 139-146, 1989

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] α -ガラクトシダーゼによるラフィノース生成効率が良いことから、ラフィノース合成原料として、メリビオース、p-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシド、ガラクトチノールやガラクトビオースを利用する例が報告されているが、これらの手法を用いた場合、使用される原料が高価であり、工業的なラフィノースの製造は困難であった。

[0009] 一方、Pycnopus cinnabarinus 由来の α -ガラクトシダーゼを使用してラフィノースを得る方法や、Mortierella vinacea由来の α -ガラクトシダーゼを利用してラフィノースを合成する方法は、安価な原料であるスクロースとガラクトースを利用可能であるということから、工業性を考慮した場合非常に有利な方法である。しかしながら、これらの α -ガラクトシダーゼを利用した場合、生成物中に目的とするラフィノース以外の夾雑三糖が生成してしまうことから、最終製品からの夾雑三糖の分離が必要となり、さらに原料の浪費といった問題が生じてしまう。Pycnopus cinnabarinus 由来の α -ガラクトシダーゼをラフィノース合成反応に用いた場合、生成オリゴ糖中のラフィノース含有率は40%、Mortierella vinacea由来の α -ガラクトシダーゼをラフィノース合成反応に用いた場合、生成オリゴ糖中のラフィノース含有率は60%と低く、従来の技術では酵素法によりラフィノースを選択的に製造することは不可能であった。

[0010] 本発明は、こうした状況のもとに、安価な原料を用い、選択的にラフィノースを合成

することが可能な新規 α -ガラクトシダーゼを提供するものであり、本酵素を用いた革新的なラフィノース製造方法を提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0011] これらの課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、本発明者らは、ラフィノースを選択的に合成可能な新規酵素を発見し、目的ラフィノース以外の夾雑オリゴ糖の生成を抑制したラフィノースの製造方法を見出し、本発明を完成するに至った。

[0012] すなわち、本発明は以下の[1]～[20]に示す新規な α -ガラクトシダーゼ及びラフィノースの製造方法などに関するものである。

[1] 下記の特性を有する α -ガラクトシダーゼ。

(1)作用:本酵素は、スクロースとガラクトースを原料とした脱水縮合反応において、生成オリゴ糖中のラフィノース含有率が0.5%以上のとき、ラフィノース合成選択率が65%以上という性質を有する。

(2)至適pH範囲:3.5～5.0

(3)安定pH範囲:3.5～10.0

(4)分子量:約80,000

[2] *Bacillus coagulans*に属する微生物に由来する、[1]に記載の α -ガラクトシダーゼ。

[3] *Bacillus coagulans*が*Bacillus coagulans* AKC003株、AKC004株(FERM-ABP10948)、AKC005株、AKC006株のいずれかである[2]に記載の α -ガラクトシダーゼ。

[4] *Bacillus coagulans* AKC003株、AKC004株(FERM-ABP10948)、AKC005株、AKC006株のいずれかに属する*Bacillus coagulans*およびその変異体。

[0013] [5] 下記(a)、(b)又は(c)の何れかのアミノ酸配列からなる α -ガラクトシダーゼ。

(a)配列番号2で表わされるアミノ酸配列;

(b)配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列であって、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するアミノ酸配:

(c)配列番号2に表されるアミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するアミノ酸配列:

[6] 下記(a)、(b)又は(c)の何れかのアミノ酸配列からなる α -ガラクトシダーゼをコードする α -ガラクトシダーゼ遺伝子。

(a)配列番号2で表わされるアミノ酸配列;

(b)配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列であって、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するアミノ酸配:

(c)配列番号2に表されるアミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するアミノ酸配列:

[7] 以下の(a)または(b)の塩基配列からなる α -ガラクトシダーゼ遺伝子。

(a)配列番号1で表される塩基配列;

(b)配列番号1で表される塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された塩基配列であって、かつ、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列:

[0014] [8] [6]又は[7]に記載の α -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む組換えベクター。

[9] [6]又は[7]に記載の α -ガラクトシダーゼ遺伝子又は[8]に記載の組み換えベクターを導入した形質転換体。

[10] [9]に記載の形質転換体を培養して得られる α -ガラクトシダーゼ。

[11] [1]～[3]、[5]、又は[10]のいずれか一項に記載の α -ガラクトシダーゼを含む酵素組成物。

[12] α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、ガラクタナーゼ、アラビナナーゼ、マンナナーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチンリアーゼ、及びポリガラクトツロン酸リアーゼから選択される少なくとも1種以上の成分をさらに含有する、[11]に記載の酵素組成物。

[13] [11]又は[12]のいずれかに記載の酵素組成物を含むラフィノース合成試薬。

[14] [1]～[3]、[5]、又は[10]のいずれか一項に記載の α -ガラクトシダーゼ、[11]又は[12]に記載の酵素組成物、若しくは[13]に記載のラフィノース合成試薬を用いることを特徴とするラフィノースの製造方法。

[0015] [15] *Bacillus coagulans*に属する微生物を培養して得た微生物触媒を利用することを特徴とするラフィノースの製造方法。

[16] *Bacillus coagulans* AKC003株、AKC004株(FERM-ABP10948)、AKC005株、AKC006株のいずれかに属する*Bacillus coagulans*及び／又はその変異体を培養して得た微生物触媒を利用することを特徴とするラフィノースの製造方法。

[17] [9]に記載の形質転換体を培養して得た微生物触媒を利用することを特徴とするラフィノースの製造方法。

[0016] [18] 生成オリゴ糖中のラフィノース含有率が65%以上である、[14]～[17]のいずれかに記載のラフィノースの製造方法。

[19] 原料としてスクロース及びガラクトースを用いる、[14]～[18]のいずれかに記載のラフィノースの製造方法。

[20] 原料中のスクロース濃度が30% (w/v)～90% (w/v)であり、原料中のガラクトース濃度が2% (w/v)～45% (w/v)である、[19]に記載のラフィノースの製造方法。

発明の効果

[0017] 本発明を用いることにより、ラフィノースを選択的に製造することが可能である。

発明を実施するための最良の形態

[0018] 以下、本発明について具体的に説明する。

本発明の α -ガラクトシダーゼは、*Bacillus coagulans*に属する微生物に由来するものであり、当該微生物としては、*Bacillus coagulans*に属する微生物であればどのようなものを用いてもよく、ラフィノースを選択的に合成可能な α -ガラクトシダーゼを発現する任意の微生物を用いることができる。好ましくは、*Bacillus coagulans* AKC-003株、AKC-004株、AKC-005株、AKC-006株が挙げられる。また、本発明における微生物は、*Bacillus coagulans*に属する微生物を親株として得られる変異

株であつてもかまわない。Bacillus coagulans AKC-003株, AKC-004株, AKC-005株, AKC-006株はそれぞれ、2006年(平成18年)11月14日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1中央第6)に寄託されている。受託番号は以下の通りである。なお、AKC-004株は、2008年(平成20年)1月30日に、受領番号FERM-ABP10948、及び受託番号FERM-BP10948として国際寄託に移管されている。

AKC-003株(FERM P-21091)

AKC-004株(FERM P-21092;FERM-ABP10948;FERM-BP10948)

AKC-005株(FERM P-21093)

AKC-006株(FERM P-21094)

[0019] 本発明の α -ガラクトシダーゼは、下記の特性を有する。

(1)作用:本酵素は、スクロースとガラクトースを原料とした脱水縮合反応において、生成オリゴ糖中のラフィノース含有率が0.5%以上のとき、ラフィノース合成選択率が65%以上という性質を有する。

(2)至適pH範囲:3.5~5.0

(3)安定pH範囲:3.5~10.0

(4)分子量:約80,000

[0020] 本発明の酵素の具体例としては、基質特異性及び金属イオンの影響として、以下の性質を有するものが挙げられる。

基質特異性:p-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシドを基質とした場合、分解活性は最も高く、次いでメリビオース、次いでラフィノースの順である。一方、p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド、ラクトース、スクロースは分解しない。

金属イオンの影響:カリウム、カルシウム、マグネシウム、クロム、マンガン、コバルト、鉄(II)、鉄(III)イオンをそれぞれ添加した場合、活性の低下は見られない。一方、ニッケル、亜鉛イオンをそれぞれ添加した場合、活性の低下が見られ、銅イオンを添加した場合に最も活性が低下する。

さらに本発明の酵素の具体例としては、下記の特性を有するものでもよい。

(5)(正反応の)至適温度範囲:35~50°C

(6)安定温度範囲:45℃まで安定である。

[0021] 本発明に用いる微生物の培養方法としては、通常の通気攪拌培養あるいは固体培養が用いられ、一般的に行われている微生物の培養方法が適応できる。培地としては、当該微生物が良好に生育し且つ、微生物中の α -ガラクトシダーゼを順調に生産するために必要な炭素源、窒素源、無機塩、必要な栄養源等を含有する合成培地または天然培地が挙げられる。例えば、炭素源としては、グルコース、グリセロール、スクロース、ガラクトース、ラクトース、メリビオース、ラフィノース、スタキオース、セロビオース、エルロース、有機酸、澱粉、オリーブ油、大豆油等を用いることができる。窒素源としては、例えば、硫酸、硝酸、尿素、アミノ酸、アミン類、アンモニア、各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、ペプトン、トリプトン、ポリペプトン、肉エキス、酵母エキス、綿実粕、コーンスティープリカー、および大豆粕等があげられる。また、無機塩類としては、第一リン酸カリウム、第二リン酸カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸マンガン、硫酸銅、硫酸鉄、炭酸カルシウム等が用いられる。微生物の生育性の点から、培養温度は25～80℃が好ましく、より好ましくは40～65℃、さらに好ましくは40～55℃である。また、培地のpHは広範囲で選択可能であり、微生物の生育性の点からpH3.0～9.0が好ましく、より好ましくはpH3.5～8.5、さらに好ましくはpH4.0～8.0である。

[0022] 本発明の α -ガラクトシダーゼの分離・精製は、例えば以下のようにして実施することができる。

[0023] *Bacillus coagulans* AKC-004株を上記の培地で培養し、得られた培養液を、遠心分離、濾過等の公知の手段により菌体と濾液とに分離する。

[0024] こうして得られた菌体には α -ガラクトシダーゼが含まれており、リゾチームや超音波破碎機、フレンチプレス等を用いて菌体の破碎を行うことで α -ガラクトシダーゼの粗抽出液を得る。培養条件等により、 α -ガラクトシダーゼの活性が培養上清に含まれる場合、培養上清をそのまま、または濃縮等の操作を加え、 α -ガラクトシダーゼの粗抽出液として次の精製に用いることもできる。

[0025] 上記のようにして得られる粗抽出液を、通常のタンパクの精製法、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、ハイドロ

キシアパタイトクロマトグラフィー、塩析等を組み合わせて分画することによって、 α -ガラクトシダーゼを精製することができる。

- [0026] 上記の操作の順は特に問わず、各操作は1回、または2回以上行ってもよい。また、それぞれのカラムに試料を通液する前に、透析等によって試料液を適当な緩衝液に交換しておくことが望ましい。さらにそれぞれの段階で試料液を濃縮しても良い。
- [0027] 精製の各段階においては、分画された各フラクション中に含まれる α -ガラクトシダーゼ活性を測定し、活性の高いフラクションを集めて次の段階に供試することが望ましい。
- [0028] α -ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば、6mMのp-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシドを含むpH5.0の100mM酢酸ナトリウム緩衝液450 μ Lに酵素液150 μ Lを混合し、40°Cで5~30分間程度反応させた後、1Mの炭酸ナトリウム水溶液1mLに添加して酵素を失活させ、反応を停止する。得られた溶液の着色度を波長420nmの吸収を測定し、各濃度のp-ニトロフェノールで作製した検量線を用いて濃度を算出する。また、酵素活性の単位は上記条件下で1分間に1 μ molのp-ニトロフェノールを遊離させる酵素量を1Uとして表示する。
- [0029] 精製された α -ガラクトシダーゼの精製度の確認や分子量の測定は、電気泳動やゲル濾過クロマトグラフィー等によって行うことができる。また、酵素学的性質は、反応温度あるいは反応pHを変化させて酵素活性を測定し、あるいは種々の酵素阻害剤や金属イオン等を反応液に添加し、残存活性を測定することによって検討すればよい。さらに α -ガラクトシダーゼを種々のpH条件下又は温度条件下に一定時間さらした後に酵素活性を測定することにより、安定pH範囲及び安定温度範囲を調べることができる。また、基質濃度を変化させて反応を行うことで、各基質に対する α -ガラクトシダーゼのミカエリス定数(K_m)、最大速度(V_{max})を求めることもできる。
- [0030] 本発明の α -ガラクトシダーゼ遺伝子の取得は、例えば以下のように行うことができる。

Bacillus coagulans AKC-004株を上記の培地で培養し、得られた培養液を、遠心分離、濾過等の公知の手段により菌体と濾液とに分離する。上記のようにして得られた菌体についてリゾチームや超音波破碎機、フレンチプレス等を用いた菌体

の破碎を行い、染色体DNAを単離する。上記のようにして得られた染色体DNAを種々の制限酵素で消化し、DNA断片を得る。上記のようにして得られた染色体DNA断片を用いて、ショットガンクローニングやインバースPCR法等を利用した公知の手段により α -ガラクトシダーゼ遺伝子の全長、またはその一部を含むDNA断片を取得する。ここで得られた α -ガラクトシダーゼ遺伝子を含むDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサー等を利用した公知の方法で解析し、その塩基配列を明らかにする。また、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子の部分的な塩基配列のみが明らかになった場合、その塩基配列を基に再度 α -ガラクトシダーゼ遺伝子を含むDNA断片を取得することもできる。また、この操作を繰り返すことで、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子全長の塩基配列を明らかにすることも可能である。上記のようにして解読した α -ガラクトシダーゼ遺伝子の塩基配列を基に、PCR法や制限酵素を用いた公知の方法によって、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子の全長を含むDNA断片を得ることができる。上記のようにして解読した α -ガラクトシダーゼ遺伝子の塩基配列から、 α -ガラクトシダーゼのアミノ酸配列を決定することができる。

[0031] 配列番号2に本発明の α -ガラクトシダーゼのアミノ酸配列を例示するが、このアミノ酸配列からなるタンパク質が α -ガラクトシダーゼ活性を有する限り、当該アミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよく、あるいは当該アミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であってもよい。即ち、本発明の α -ガラクトシダーゼは、下記(a)、(b)又は(c)の何れかのアミノ酸配列からなる α -ガラクトシダーゼである。

(a)配列番号2で表わされるアミノ酸配列；

(b)配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列であって、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するアミノ酸配；

(c)配列番号2に表されるアミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するアミノ酸配列；

[0032] さらに本発明によれば、下記(a)、(b)又は(c)の何れかのアミノ酸配列からなる α -ガラクトシダーゼをコードする α -ガラクトシダーゼ遺伝子。

(a)配列番号2で表わされるアミノ酸配列;

(b)配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列であって、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するアミノ酸配:

(c)配列番号2に表されるアミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するアミノ酸配列:

[0033] 上記(b)における「1又は数個のアミノ酸」とは、一般的には1~50個のアミノ酸、好ましくは1~30個のアミノ酸、より好ましくは1~20個のアミノ酸、さらに好ましくは1~10個のアミノ酸、特に好ましくは1~5個のアミノ酸を意味する。

[0034] 上記(c)における「60%以上の相同性を有するアミノ酸配列」とは、一般的には、60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列を意味する。

[0035] 本発明の α -ガラクトシダーゼ遺伝子の具体例としては、以下の(a)または(b)の塩基配列からなる α -ガラクトシダーゼ遺伝子を挙げることができる。

(a)配列番号1で表される塩基配列;

(b)配列番号1で表される塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された塩基配列であって、かつ、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列:

[0036] 上記(b)における「1又は数個の塩基」とは、一般的には1~150個の塩基、好ましくは1~90個の塩基、より好ましくは1~60個の塩基、さらに好ましくは1~30個の塩基、さらに好ましくは1~20個の塩基、さらに好ましくは1~15個の塩基、さらに好ましくは1~10個の塩基、特に好ましくは1~5個の塩基を意味する。

[0037] 本発明の α -ガラクトシダーゼ遺伝子は公知の遺伝子操作手段により、本来の反応を触媒する性質を損なわないペプチドの変異をなしてもよく、このような変異体遺伝子は、本発明の α -ガラクトシダーゼ遺伝子から遺伝子工学的的手法により作製される人工変異遺伝子を意味し、この人工変異遺伝子は部位特異的変異法や、目的遺伝子の特定DNA断片を人工変異DNAで置換するなどの種々なる遺伝子工学的

方法を使用して得られる。即ち、 α -ガラクトシダーゼ中のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異を生じさせる方法としては、PCR法、エラープローンPCR法、DNAシャッフリング法やキメラ酵素を作製する手法等の公知の方法が利用できる。

[0038] 上記のようにして得られた α -ガラクトシダーゼの構造遺伝子を完全に含むDNA断片を大腸菌用発現ベクター、例えばpBluescriptII KS(+)のマルチクローニングサイトに挿入、連結して、新たな組換えプラスミドを構築することができる。このプラスミドベクターは大腸菌内で外来遺伝子として連結された遺伝子を効率的に発現できるlacプロモーターが導入されており、組換えプラスミドを大腸菌に導入して得られる形質転換体を培養することで α -ガラクトシダーゼの大量発現が可能になる。

[0039] また、上記以外にも種々の宿主微生物、ベクターを利用した α -ガラクトシダーゼの大量発現は可能であり、例えば*Brevibacillus choshinensis*の形質転換体を培養することで、 α -ガラクトシダーゼの大量発現が可能である。より詳細には、本発明の α -ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込むベクターとしては、宿主微生物体内で自律的に増殖しうるファージまたはプラスミドから遺伝子組み換え用として構築されたものが適しており、ファージベクターとしては、例えば、エシェリヒア・コリに属する微生物を宿主微生物とする場合には λ gt $\cdot$ λ C、 λ gt $\cdot$ λ Bなど可以使用できる。また、プラスミドベクターとしては、例えば、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、プラスミドpET-3a、pET-11a、pET-32aなどのpETベクター(Novagen)またはpBR322、pBR325、pACYC184、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pIN I、BluescriptKS+、枯草菌を宿主とする場合にはpWH1520、pUB110、pKH300PLK、放線菌を宿主とする場合にはpIJ680、pIJ702、酵母特にサッカロマイセス・セルビシエを宿主とする場合にはYRp7、pYC1、YEp13など可以使用できる。このようなベクターを、本発明の α -ガラクトシダーゼ遺伝子の切断に使用した制限酵素で生成するDNA末端と、同じ末端を生成する制限酵素で切断してベクター断片を作成し、本発明の α -ガラクトシダーゼ遺伝子断片とベクター断片とを、DNAリガーゼ酵素により常法に従って結合させて本発明の α -ガラクトシダーゼ遺伝子をコードするDNAを目的のベクターに組み込むことができる。

[0040] プラスミドを移入する宿主微生物としては、組み換えDNAが安定かつ自律的に増

殖可能であればよく、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリに属する微生物の場合、エシェリヒア・コリ BL21、エシェリヒア・コリ BL21 (DE3)、エシェリヒア・コリ BL21trxB、エシェリヒア・コリ Rosetta (DE3)、エシェリヒア・コリ Rosetta、エシェリヒア・コリ Rosetta (DE3) pLysS、エシェリヒア・コリ Rosetta (DE3) pLacI、エシェリヒア・コリ RosettaBlue、エシェリヒア・コリ Rosetta-gami、エシェリヒア・コリ Origami、エシェリヒア・コリ Origami、エシェリヒア・コリ Tuner、エシェリヒア・コリ DH1、エシェリヒア・コリ JM109、エシェリヒア・コリ W3110、エシェリヒア・コリ C600などが利用できる。また、微生物宿主がバチラス属に属する微生物の場合、バチラス・サチリス、バチラス・メガテリウムなど、放線菌に属する微生物の場合、ストレプトマイセス・リビダンス TK 24など、サッカロマイセス・セルビシエに属する微生物の場合、サッカロマイセス・セルビシエ INVSC1などが使用できる。

[0041] また、形質転換微生物により本発明の α -ガラクトシダーゼを製造するに当たっては、該形質転換微生物を栄養培地で培養して菌体内または培養液中に本発明の α -ガラクトシダーゼを産生せしめ、培養終了後、得られた培養物を濾過または遠心分離などの手段により菌体を採集し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、又、必要に応じてEDTA及び／または適当な界面活性剤などを添加して本発明の α -ガラクトシダーゼの水溶液を濃縮するか、または濃縮することなく硫酸分画、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー等の吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーにより処理して、純度の良い本発明の α -ガラクトシダーゼを得ることができる。

[0042] 形質転換微生物の培養条件はその栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は、液体培養で行うが、工業的には深部通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用されうる。培養温度は微生物が発育し、本発明の α -ガラクトシダーゼを生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリの場合、好ましくは、10から45℃程度、さらに好ましくは20から30℃程度である。培養条件は、条件によって多少異なるが、本発明の α -ガラクトシダーゼが最高収量に達する時期を見計らって適当な時期に培養を終了すればよく、エシェリヒア・コリの場合、通常は12から48時間程度

である。培地pHは菌が発育し、本発明の α -ガラクトシダーゼを生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリの場合、好ましくはpH6から8程度である。

[0043] 本発明によれば、前述の酵素を用いるに際しては、本発明の酵素の作用を阻害しないかぎり、特別に精製程度等は限定されず、精製された本発明の酵素の他、その酵素含有物を用いてもよい。

[0044] 本発明によれば、上記した本発明の α -ガラクトシダーゼを含む酵素組成物が提供される。上記酵素組成物には、例えば、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、ガラクタナーゼ、アラビナナーゼ、マンナナーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチンリアーゼ、及びポリガラクトツロン酸リアーゼから選択される少なくとも1種以上の成分をさらに含有せしめることができる。

[0045] 本発明によれば、上記した酵素組成物を含むラフィノース合成試薬が提供される。

[0046] 本発明において微生物触媒としては、*Bacillus coagulans* AKC-004株のほか、上記形質転換体を用いることができる。本発明においてラフィノース製造に利用する微生物触媒としては通常行われる培養方法によって得られる微生物そのものを利用することができ、 α -ガラクトシダーゼを微生物から精製する必要はない。また、場合によっては、微生物培養液、微生物培養上清を利用することもできる。一方、培養法により得られた微生物は必要に応じて、水や緩衝液等で洗浄した後、利用することもできる。例えば、培養した微生物の培養液、または遠心分離、バッファーによる洗浄等により得た微生物懸濁液、微生物または微生物の処理物(例えば微生物の破砕物等)を懸濁または溶解させた水溶液、あるいは微生物または微生物処理物を包括法、架橋法、又は担体結合法によって固定化したものを用いることができる。固定化する際の固定化担体の例としては、ガラスビーズ、シリカゲル、ポリウレタン、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、カラギーナン、アルギン酸等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0047] 本発明によれば、上記した本発明の α -ガラクトシダーゼ又は α -ガラクトシダーゼを含む酵素組成物、ラフィノース合成試薬又は微生物触媒を用いたラフィノースの製造方法が提供される。原料としては、例えばスクロース及びガラクトースを用いるこ

とができる。原料としてスクロースとガラクトースを利用する際には例えば、 α -ガラクトシダーゼによる脱水縮合反応を利用する性質上、原料濃度は高い方が好ましいが、ガラクトース濃度が高くなりすぎるとガラクトース分子間の縮合によりスクロースとガラクトース間の脱水縮合反応が抑制されるため、スクロース濃度は30% (w/v) ~ 90% (w/v) にするのが好ましく、より好ましくは35% (w/v) ~ 80% (w/v) さらに好ましくは40% (w/v) ~ 70% (w/v) が好ましい。ガラクトース濃度は2% (w/v) ~ 45% (w/v) にするのが好ましく、より好ましくは、5% (w/v) ~ 35% (w/v) にするのが好ましく、さらに好ましくは7% (w/v) ~ 30% (w/v) が好ましい。また、原料中のスクロースとガラクトースが共に可溶であるような濃度に調製することが好ましい。

[0048] 本発明の α -ガラクトシダーゼ又は α -ガラクトシダーゼを含む酵素組成物又は酵素組成物を含むラフィノース合成試薬又は微生物触媒を用いてラフィノースを製造する際の反応温度は、反応速度や酵素の安定性の点から、好ましくは10~90℃、より好ましくは20~70℃であり、さらに好ましくは30~60℃である。反応pHは広範囲で調整可能であり、酵素の安定性の点から、好ましくはpH2.0~10.0、より好ましくはpH3.0~7.5、さらに好ましくは3.5~6.0である。反応時間は酵素の使用量によっても異なるが、工業的利用を考慮した際、好ましくは通常20分~200時間、より好ましくは、6~80時間である。しかしながら、本発明は以上の反応条件や反応形態に限定されるものではなく、適宜選択することができる。

[0049] 本発明において、 α -ガラクトシダーゼ又は α -ガラクトシダーゼを含む酵素組成物又は酵素組成物を含むラフィノース合成試薬を用いたラフィノース合成反応中、ラフィノースが反応溶液中に0.5%以上蓄積された時点における生成オリゴ糖中のラフィノース含有率を65%以上に向上することができ、より好ましい条件では80%以上に向上することができる。本発明における高い生成オリゴ糖中のラフィノース含有率は、ラフィノースが反応溶液中に0.75%以上、さらには1.0%以上蓄積された時点においても達成可能である。

[0050] また一般的に、微生物そのものを用いたラフィノース合成反応では、夾雑酵素の影響により生成オリゴ糖中のラフィノース含有率が低いのに対し、本発明の微生物触媒を用いたラフィノース合成反応では、生成オリゴ糖中のラフィノース含有率は高い。

[0051] 本発明において得られる生成オリゴ糖中のラフィノース含有率は以下の方法により測定される。

ラフィノース合成反応終了後、反応液を25倍希釈して、99℃で10分間保持することで反応を停止した。反応停止後、遠心分離により微生物を除去し、得られた反応溶液を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて定量した。測定には、Thermoelectron社製 Hypercarbカラム、検出器はRIを用いた。生成オリゴ糖中のラフィノース含有率は、HPLC分析チャートに検出された各々のピーク面積比から(ラフィノースのピーク面積) / (生成オリゴ糖のピーク面積) × 100により算出した。

[0052] 本発明の方法により製造されるラフィノースを精製、分離する方法としては、一般的に用いられている精製処理方法を利用することができる。すなわち、例えば、遠心分離、MF膜やUF膜等による膜処理、フィルタープレス等により微生物触媒を除き、陽イオン交換クロマトグラフィーや陰イオン交換クロマトグラフィー等のクロマト処理や透析等の脱塩処理により緩衝液や培地等から持ち込まれる塩類等を除去し、さらに、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、活性炭クロマトグラフィー等のクロマト処理や溶解度の差等を利用した結晶化処理、その他の常法に従ってラフィノースを分離、精製することができる。クロマト処理はこれらの方法を単独で用いても良いし、組み合わせて用いても良く、移動層方式や擬似移動層方式、多成分分離擬似移動層方式、多成分分離循環方式等を適宜利用することができる。これらのラフィノースの精製、分離処理方法は、バッチ式で行っても良いしカラムを利用するなどして連続的に行っても良い。

[0053] 以下、実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

実施例

[0054] 実施例1

Bacillus coagulans AKC-004株(受託番号FERM P-21092(FERM-A BP10948に移管):寄託機関; 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター)をTBAB(Tryptose Blood Agar Base)プレート(Difco)で、55℃、1日間培養してコロニーを形成させた。

[0055] pH7. 2に調整した表1に示す培地30mLを150mL容の三角フラスコに入れ、上記プレートからコロニーを白金耳で植菌し、50℃で、25時間、180rpmで回転振盪培養を行い、これをジャー培養のシードとした。

[0056] [表1]

培地組成		微量金属元素溶液組成	
ラフィノース	10 g	CH ₃ COONa	12.8 g
グリセロール	10 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
酵母エキス	10 g	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.5 g
ペプトン	10 g	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.4 g
CaCl ₂	0.04 g	CuCl ₂ · 2H ₂ O	50 mg
0.01M クエン酸	0.5 mL	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	50 mg
酢酸ナトリウム三水和物	0.132 g	H ₃ BO ₄	20 mg
KH ₂ PO ₄	0.544 g	NiCl ₂ · 6H ₂ O	20 mg
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.14 g	蒸留水	1 L
微量金属元素溶液	0.5 mL		
蒸留水	1 L		

[0057] 次に、pH7. 2に調整した表1に示す培地6Lを10L容のジャーフェーマンターに入れ、上記のジャー培養のシード15mLを移植し、50℃で、48時間、200rpm、0. 2v vmで通気攪拌培養を行った。

[0058] 次いでこの培養液を、4℃で、10, 000g×30分間遠心分離して上清を除去し、菌体を回収した。得られた菌体のα-ガラクトシダーゼの活性を測定した結果、261Uであった。

[0059] この菌体を、50mM Tris-HCl、20mM EDTA、50mM グルコースを含むLysis緩衝液(pH8. 0)で懸濁し150mLにした。この懸濁液を4℃で、10, 000g×30分間遠心分離して上清を除去し、菌体を回収した。

[0060] Lysis緩衝液で洗浄後の菌体を上記Lysis緩衝液に再度懸濁し、150mLとした。これに0. 02%のリゾチーム(Sigma社製 卵白由来)を添加して、37℃で、13時間、1

20rpmで振盪し、菌体破碎を行った。

[0061] 菌体破碎後の溶液を、4℃で、10,000g×30分間遠心分離して菌体残渣を除去し、上清を回収した。

[0062] この上清に硫酸アンモニウムを加えて37.5%飽和とし、4℃で一夜放置して沈殿を生じさせた。この沈殿を、4℃で、10,000g×30分間遠心分離して除去し、上清を回収した。

[0063] この上清に硫酸アンモニウムを加えて54.5%飽和とし、4℃で一夜放置して沈殿を生じさせた。この沈殿を、4℃で、10,000g×30分間遠心分離して回収し、pH7.0の20mMリン酸緩衝液に溶解させ、4℃で、一夜、上記と同じリン酸緩衝液に対して透析した。

[0064] 透析により得られた上清を、前記と同じリン酸バッファーで平衡化した「DEAE Sepharose FF」(GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社)に吸着させた後、0～0.4Mの塩化ナトリウムを含有するpH7.0の20mMリン酸緩衝液の濃度勾配法によって酵素を溶出させた。

[0065] 上記で溶出した活性画分を集め、平均分画分子量10,000の限外濾過膜を用いて濃縮し、2Mの塩化ナトリウムを含有するpH7.0の20mMリン酸緩衝液で平衡化した「HiTrap Phenyl FF (high sub)」(GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社)に吸着させた後、2.0～0Mの塩化ナトリウムを含有するpH7.0の20mMリン酸緩衝液の濃度勾配法によって酵素を溶出させた。

[0066] 上記で溶出した活性画分を集め、平均分画分子量10,000の限外濾過膜を用いて濃縮し、pH7.0の20mMリン酸緩衝液で平衡化した「MonoQ 5/50 GL」(GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社)に吸着させた後、0～0.4Mの塩化ナトリウムを含有するpH7.0の20mMリン酸緩衝液の濃度勾配法によって酵素を溶出させた。

[0067] 上記で溶出した活性画分を集め、平均分画分子量10,000の限外濾過膜を用いて濃縮し、pH7.0の20mMリン酸バッファーで平衡化した「HiLoad 16/60 Superdex 200」(GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社)に充填した後、同様の緩衝液で溶出を行った。

[0068] 上記で溶出した活性画分を集め、平均分画分子量10,000の限外濾過膜を用いて濃縮し、精製 α -ガラクトシダーゼとした。活性収率は15%で、活性は270U/mLであった。

[0069] 実施例2

実施例1で得られた精製 α -ガラクトシダーゼを用いて、その作用に関する実験を行った。

[0070] (1) 至適pH範囲

各pHの100mM緩衝液に溶解させた6mMのp-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシド150 μ Lに、100倍希釈した本発明の精製酵素液50 μ Lを混合し、40°Cで5分間反応させた。反応後、遊離されたp-ニトロフェノールを定量することで活性を測定し、最大活性を100とする相対活性を求めた。この結果を図1に示す。なお、使用した緩衝液は、グリシン-HCl緩衝液(pH2.5~3.5)、酢酸ナトリウム緩衝液(pH3.5~6.0)、リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0~8.5)、グリシン-NaOH緩衝液(pH8.5~10.0)である。

[0071] (2) 安定pH範囲

pH4.0~10.0の範囲で10mMの緩衝液を用いて、各pHで45°C、140分間の加熱処理を行い、その残存活性を測定し、前記と同様に最大活性を100とする相対活性を求めた。この結果を図2に示す。なお、使用した各pHの緩衝液の種類は前記のものと同様である。

[0072] (3) 至適温度範囲

pH4.5の酢酸ナトリウム緩衝液に溶解させた4.7mMのp-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシド190 μ Lに、20倍希釈した本発明の精製酵素液10 μ Lを混合し、20~60°Cの範囲で5分間反応させた。反応後、遊離されたp-ニトロフェノールを定量することで活性を測定し、最大活性を100とする相対活性を求めた。この結果を図3に示す。

[0073] (4) 安定温度範囲

pH4.5の100mM酢酸ナトリウム緩衝液を用いて、30~55°Cの各温度で20分間加熱処理を行い、その残存活性を測定し、前記と同様に最大活性を100とする相対

活性を求めた。この結果を図4に示す。

[0074] (5) 分子量

分離ゲル濃度が10%の「レディーゲルJ」(日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社)を用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、分子量を求めた。この結果を図5に示す。分子量は約80,000であり、アミノ酸配列から推定される分子量83,122とほぼ一致した。

[0075] (7) 基質特異性

10mMの各種基質を含むpH4.5の100mM酢酸ナトリウム緩衝液150 μ Lに100倍希釈した本発明の精製酵素液50 μ Lを混合し、40°Cで20分間反応させた。ただし、p-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシドを基質に用いた反応では、反応時間を5分間とした。反応後、遊離されたp-ニトロフェノールの定量、あるいは「Shodex SUGAR」(昭和電工株式会社)カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによる分析から分解された基質の定量を行い、最大活性を100とした各基質に対する相対活性を求めた。この結果を表2に示す。また、そのなかで基質となり得たものについて、反応速度を測定した結果を表3に示す。

[0076] [表2]

基質	相対活性
pNP- α -ガラクトピラノシド	100
pNP- β -ガラクトピラノシド	0
ラフィノース	10
メリビオース	38
ラクトース	0
スクロース	0

[0077] [表3]

表3： α -ガラクトシダーゼの反応速度定数

基質	K _m (mM)	V _{max} (U/mg)
pNP- α -ガラクトピラノシド	0.53	82
ラフィノース	40	48
メリビオース	8.4	106

[0078] (8)阻害因子

pH4.5の酢酸ナトリウム緩衝液に溶解させた6mMのp-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシドに各種金属イオンを終濃度1mMとなるように添加して150 μ Lとし、100倍希釈した本発明の精製酵素液50 μ Lを混合し、40°Cで20分間反応させた。反応後、遊離されたp-ニトロフェノールを定量することで活性を測定し、最大活性を100とする相対活性を求めた。この結果を表4に示す。

[0079] [表4]

表4：金属塩による α -ガラクトシダーゼの阻害

金属イオン	相対活性
コントロール	100
カリウム	97
カルシウム	97
マグネシウム	95
クロム	99
マンガン	95
鉄 (II)	98
鉄 (III)	99
コバルト	95
ニッケル	88
銅	33
亜鉛	80

[0080] 実施例3

実施例1記載の精製 α -ガラクトシダーゼ0.5Uを分取し、1.5mL容ポリプロピレン製チューブに入れた200 μ Lの糖液(pH5.0の100mM酢酸ナトリウム緩衝液にスクロース73%、ガラクトース12%を含む)に添加、混合し、60°C、1,200rpmで反応を行った。反応開始から45時間後に反応液のうち20 μ Lを採取し、480 μ L蒸留水で希釈を行った後、99°Cで10分間処理することで酵素を熱失活させた。熱失活後の希釈糖液を常温に戻した後、「Hypercarb」(Thermoelectron社製)カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析を行った。その結果を図6に示す。生成オリゴ糖中のラフィノース含有率は82%であり、反応液中のラフィノース濃度は1.67重量%であった。

[0081] 実施例4

(1)染色体DNAの調製

常法に従ってBacillus coagulans AKC-004株の染色体DNAを調製した。実施例1記載の方法で取得したBacillus coagulans AKC-004株の培養液60 mLを、遠心分離して菌体を回収した。得られた菌体をLysisバッファー(50mM Tris-HCl(pH 8.0)、20mM EDTA、50mM グルコース)に懸濁し、よく洗浄した。遠心分離して菌体を回収した後、Lysisバッファーに再懸濁し、これにリゾチームを加え37℃で45分間インキュベートした。次いでSDSとRNaseを添加し、37℃で45分間インキュベートした。その後Proteinase Kを添加し、50℃で60分間穏やかに振盪した。ここで得られた溶液をフェノールクロロホルム、クロロホルムで処理後、エタノール沈殿し、析出した核酸をガラスピペットに巻きつけて回収した。この核酸を70%エタノールで洗浄後、乾燥し、TEに再溶解した。この操作により、約1mgの染色体DNAを調製した。

[0082] (2) α -ガラクトシダーゼ遺伝子の単離

上記(1)において調製した染色体DNAから、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子断片を増幅するためのPCRプライマーを設計、合成した。プライマーの設計は公知の数種の微生物由来 α -ガラクトシダーゼ遺伝子のアライメント結果を基に行い、センスプライマーは5'-GAAGTITACGGITTYAGYYTTGTITACAGYGG-3' (配列番号3)の配列を有するオリゴDNAを、アンチセンスプライマーは5'-CCAAACCAICCRTCTCIARIACRAA-3' (配列番号4)の配列を有するオリゴDNAをそれぞれ合成した。なお、配列中、Iはイノシン、YはC又はT、RはA又はGを示す。ここで得られたPCRプライマーを用い、上記(1)において調製した染色体DNAを鋳型としてPCR法による α -ガラクトシダーゼ遺伝子断片の増幅を行い、380塩基対からなる α -ガラクトシダーゼ遺伝子断片を取得した。ここで得られた遺伝子断片の塩基配列を、DNAシーケンサーを用いて解析した。

[0083] 解析の結果得られた α -ガラクトシダーゼ遺伝子断片の塩基配列をもとに、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子全長を含むDNA断片を取得するために、インバースPCR用PCRプライマーを設計、合成した。センスプライマーは5'-TGATCAACAACCTGGGAAAGCGACCT-3' (配列番号5)の配列を有するオリゴDNAを、アンチセンスプライマーは5'-GAACTGGTCCTGCTGCACAATTCC-3' (配列番号6)の配列を有するオリ

ゴDNAをそれぞれ合成した。次に、インバースPCRに用いる鋳型を調製した。上記(1)において調製した染色体DNAを制限酵素HindIIIで消化した後、得られたDNA断片をT4 DNA Ligaseを用いて自己環化し、インバースPCRの鋳型とした。この鋳型に対し、上記のように合成したインバースPCR用プライマーを用いて、PCR法による α -ガラクトシダーゼ遺伝子を含むDNA断片の増幅を行い、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子の全配列を含む4500塩基対からなるPCR産物を取得した。

[0084] (3) 塩基配列の解析

DNAシーケンサーを用いて、(2)で得られたPCR産物から α -ガラクトシダーゼ遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、配列番号1に示す5'末端からのDNA塩基配列を有する2190塩基対の α -ガラクトシダーゼの構造遺伝子を解読した。この配列はこれまで見出されていない新規な遺伝子であった。また、このDNA塩基配列より類推される*Bacillus coagulans* AKC-004株が生産する α -ガラクトシダーゼは730個のアミノ酸からなり、配列番号2に示すようなN末端からのアミノ酸配列を有していた。データベース検索の結果、このアミノ酸配列は*Geobacillus stearothermophilus*由来 α -ガラクトシダーゼ(AgaN)と57%、*Geobacillus stearothermophilus*由来 α -ガラクトシダーゼ(AgaA)と56%、*Geobacillus stearothermophilus*由来 α -ガラクトシダーゼ(AgaB)と56%、*Lactococcus raffinolactis*由来 α -ガラクトシダーゼと56%の相同性を有し、新規な α -ガラクトシダーゼをコードしていることが明らかになった。

[0085] (4) α -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現プラスミドベクターの構築及び形質転換

(3)で得られた α -ガラクトシダーゼ遺伝子の配列を基に、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子のSD配列、構造遺伝子、終始コドンを含む領域を増幅するためのPCRプライマーを設計・合成した。PCRプライマーの設計は(2)で得られた4500塩基対からなるPCR産物の塩基配列を基に行い、センスプライマーは5'-TAAGGTAAAGCAGATGTGCCATT-3' (配列番号7)の配列を有するオリゴDNAを、アンチセンスプライマーは5'-TTACTCGTACACCGCCTC-3' (配列番号8)の配列を有するオリゴDNAをそれぞれ合成した。(2)で得られた4500塩基対からなるPCR産物を鋳型として、合成したPCRプライマーを用いてPCR法による増幅を行い、2325塩基対からなるPC

R産物を取得した。ここで得られたPCR産物を平滑末端化、リン酸化した。

制限酵素EcoRVで消化後に脱リン酸化したpBluescriptII KS(+)ベクターに、上記で得られた平滑末端化、リン酸化したPCR産物を連結し、新たなプラスミドベクターpBlue/agaAを構築した。このプラスミドベクターには大腸菌中で外来遺伝子として連結された遺伝子を効率的に転写できるlacプロモーターが導入されており、 α -ガラクトシダーゼを効率的に発現・製造させることができる。得られたプラスミドベクターを、塩化カルシウム法で調製した大腸菌JM109株のコンピテントセルにヒートショック法で形質転換し、組換え微生物を作製した。

[0086] (5)形質転換体の培養及び α -ガラクトシダーゼの発現

(4)で作製した組換え大腸菌JM109-pBlue/agaAを100mg/Lのアンピシリンを含む30mLのLB培地で37°Cで24時間、振盪培養した。培養後、組換え大腸菌を遠心分離して回収した。菌体は100mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)で洗浄後、同緩衝液に再懸濁し、超音波破碎機で破碎した。この破碎液の α -ガラクトシダーゼ活性を、前記の方法で測定したところ、19.9U/培養液(mL)であった。

[0087] 実施例5

実施例4記載の組換え体を培養して得られた α -ガラクトシダーゼ1.0Uを分取し、1.5mL容ポリプロピレン製チューブに入れた200 μ Lの糖液(pH5.0の100mM酢酸ナトリウム緩衝液にスクロース73%、ガラクトース12%を含む)に添加、混合し、60°C、1,200rpmで反応を行った。反応開始から16時間後に反応液のうち20 μ Lを採取し、480 μ L蒸留水で希釈を行った後、99°Cで10分間処理することで酵素を熱失活させた。熱失活後の希釈糖液を常温に戻した後、「Hypercarb」(Thermoelctron社製)カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析を行った。その結果を図7に示す。生成オリゴ糖中のラフィノース含有率は82%であり、反応液中のラフィノース濃度は1.20重量%であった。

[0088] 実施例6

Bacillus coagulans AKC-004株(受託番号FERM P-21092(FERM-AB P10948に移管):寄託機関;独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター)をTBAB(Tryptose Blood Agar Base)プレート(Difco)で、55°C、1日間培養し

てコロニーを形成させる。その1白金耳を表1に記載の培地30mLを150mL容三角フラスコに分注したものに接種して、55°C、150rpmで2日間培養した。

- [0089] 本培養2日後、培養菌体10mL分を15mL容チューブに回収した。培養液を回収した15mL容チューブを10000rpmで遠心後、上清を除去した。次に、100mM酢酸Na buffer (pH5.0)を1mL添加し、再懸濁した後、懸濁液を2mL容ポリプロピレン製チューブに移した。再度、チューブを遠心し、上清を除去した後、糖液(pH5.0の100mM酢酸ナトリウム緩衝液にスクロース62.5%、ガラクトース12.5%を含む)を300 μ L添加し、菌体をボルテックスミキサーでよく懸濁させ、糖合成反応をスタートした。本糖合成反応は反応温度60°C、回転数1200rpmで行った。糖合成反応開始16h後に、反応液40 μ Lを回収し、蒸留水960 μ Lとよく混合し、99°Cで10分間酵素の熱失活を行った。本希釈糖液を常温に戻した後、「Hypercarb」(Thermoelectron社製)カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析を行った結果を図8に示した。生成オリゴ糖中のラフィノース含有率は80%であった(反応液中のラフィノース濃度は0.70重量%)。

[0090] 実施例7

Bacillus coagulans AKC-003株(受託番号FERM P-21091:寄託機関; 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター)をTBAB(Tryptose Blood Agar Base)プレート(Difco)で、55°C、1日間培養してコロニーを形成させる。その1白金耳を表1に記載の培地30mLを150mL容三角フラスコに分注したものに接種して、55°C、150rpmで2日間培養した。

- [0091] 本培養2日後、培養菌体10mL分を15mL容チューブに回収した。培養液を回収した15mL容チューブを10000rpmで遠心後、上清を除去した。次に、100mM酢酸Na buffer (pH5.0)を1mL添加し、再懸濁した後、懸濁液を2mL容ポリプロピレン製チューブに移した。再度、チューブを遠心し、上清を除去した後、糖液(pH5.0の100mM酢酸ナトリウム緩衝液にスクロース62.5%、ガラクトース12.5%を含む)を300 μ L添加し、菌体をボルテックスミキサーでよく懸濁させ、糖合成反応をスタートした。本糖合成反応は反応温度60°C、回転数1200rpmで行った。糖合成反応開始38h後に、反応液40 μ Lを回収し、蒸留水960 μ Lとよく混合し、99°Cで10分間酵素の熱失活を行った。本希釈糖液を常温に戻した後、「Hypercarb」(Thermoelectron社製)カラムを用い

た高速液体クロマトグラフィーで分析を行ったところ、生成オリゴ糖中のラフィノース含有率は80%であった(反応液中のラフィノース濃度は0.76重量%)。

[0092] 実施例8

Bacillus coagulans AKC-005株(受託番号FERM P-21093:寄託機関; 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター)をTBAB(Tryptose Blood Agar Base)プレート(Difco)で、55°C、1日間培養してコロニーを形成させる。その1白金耳を表1に記載の培地30mLを150mL容三角フラスコに分注したものに接種して、55°C、150rpmで2日間培養した。

[0093] 本培養2日後、培養菌体10mL分を15mL容チューブに回収した。培養液を回収した15mL容チューブを10000rpmで遠心後、上清を除去した。次に、100mM酢酸Na buffer (pH5.0)を1mL添加し、再懸濁した後、懸濁液を2mL容ポリプロピレン製チューブに移した。再度、チューブを遠心し、上清を除去した後、糖液(pH5.0の100mM酢酸ナトリウム緩衝液にスクロース62.5%、ガラクトース12.5%を含む)を300 μ L添加し、菌体をボルテックスミキサーでよく懸濁させ、糖合成反応をスタートした。本糖合成反応は反応温度60°C、回転数1200rpmで行った。糖合成反応開始38h後に、反応液40 μ Lを回収し、蒸留水960 μ Lとよく混合し、99°Cで10分間酵素の熱失活を行った。本希釈糖液を常温に戻した後、「Hypercarb」(Thermoelectron社製)カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析を行ったところ、生成オリゴ糖中のラフィノース含有率は91%であった(反応液中のラフィノース濃度は0.32重量%)。

[0094] 実施例9

Bacillus coagulans AKC-006株(受託番号FERM P-21094:寄託機関; 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター)をTBAB(Tryptose Blood Agar Base)プレート(Difco)で、55°C、1日間培養してコロニーを形成させる。その1白金耳を表1に記載の培地30mLを150mL容三角フラスコに分注したものに接種して、55°C、150rpmで2日間培養した。

[0095] 本培養2日後、培養菌体10mL分を15mL容チューブに回収した。培養液を回収した15mL容チューブを10000rpmで遠心後、上清を除去した。次に、100mM酢酸Na buffer (pH5.0)を1mL添加し、再懸濁した後、懸濁液を2mL容ポリプロピレン製チューブに

移した。再度、チューブを遠心し、上清を除去した後、糖液(pH5.0の100mM酢酸ナトリウム緩衝液にスクロース62.5%、ガラクトース12.5%を含む)を300 μ L添加し、菌体をボルテックスミキサーでよく懸濁させ、糖合成反応をスタートした。本糖合成反応は反応温度60°C、回転数1200rpmで行った。糖合成反応開始38h後に、反応液40 μ Lを回収し、蒸留水960 μ Lとよく混合し、99°Cで10分間酵素の熱失活を行った。本希釈糖液を常温に戻した後、「Hypercarb」(Thermoelectron社製)カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析を行ったところ、生成オリゴ糖中のラフィノース含有率は76%であった(反応液中のラフィノース濃度は0.86重量%)。

産業上の利用可能性

[0096] 本発明を用いることにより、安価な原料を用い、選択的にラフィノースを製造する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0097] [図1]図1は、*Bacillus coagulans* AKC-004菌体から精製した α -ガラクトシダーゼの至適pH範囲(実施例2)を示す。

[図2]図2は、*Bacillus coagulans* AKC-004菌体から精製した α -ガラクトシダーゼの安定pH範囲(実施例2)を示す。

[図3]図3は、*Bacillus coagulans* AKC-004菌体から精製した α -ガラクトシダーゼの至適温度範囲(実施例2)を示す。

[図4]図4は、*Bacillus coagulans* AKC-004菌体から精製した α -ガラクトシダーゼの安定温度範囲(実施例2)を示す。

[図5]図5は、*Bacillus coagulans* AKC-004菌体から精製した α -ガラクトシダーゼのSDS-PAGE(実施例2)の結果を示す。

[図6]図6は、*Bacillus coagulans* AKC-004株から精製した α -ガラクトシダーゼを用いた糖合成(実施例3)の反応液をHPLC分析した結果を示す。

[図7]図7は、組換え大腸菌JM109株から得られた α -ガラクトシダーゼを用いた糖合成(実施例5)の反応液をHPLC分析した結果を示す。

[図8]図8は、*Bacillus coagulans* AKC-004株を培養して得た微生物触媒を用いた糖合成(実施例3)の反応液をHPLC分析した結果を示す。

請求の範囲

- [1] 下記の特性を有する α -ガラクトシダーゼ。
- (1)作用:本酵素は、スクロースとガラクトースを原料とした脱水縮合反応において、生成オリゴ糖中のラフィノース含有率が0.5%以上のとき、ラフィノース合成選択率が65%以上という性質を有する。
- (2)至適pH範囲:3.5～5.0
- (3)安定pH範囲:3.5～10.0
- (4)分子量:約80,000
- [2] *Bacillus coagulans*に属する微生物に由来する、請求項1記載の α -ガラクトシダーゼ。
- [3] *Bacillus coagulans*が*Bacillus coagulans* AKC003株、AKC004株(FERM-ABP10948)、AKC005株、AKC006株のいずれかである請求項2記載の α -ガラクトシダーゼ。
- [4] *Bacillus coagulans* AKC003株、AKC004株(FERM-ABP10948)、AKC005株、AKC006株のいずれかに属する*Bacillus coagulans*およびその変異体。
- [5] 下記(a)、(b)又は(c)の何れかのアミノ酸配列からなる α -ガラクトシダーゼ。
- (a)配列番号2で表わされるアミノ酸配列;
- (b)配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列であって、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するアミノ酸配:
- (c)配列番号2に表されるアミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するアミノ酸配列:
- [6] 下記(a)、(b)又は(c)の何れかのアミノ酸配列からなる α -ガラクトシダーゼをコードする α -ガラクトシダーゼ遺伝子。
- (a)配列番号2で表わされるアミノ酸配列;
- (b)配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列であって、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するアミノ酸配:

(c)配列番号2に表されるアミノ酸配列に対して60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するアミノ酸配列:

[7] 以下の(a)または(b)の塩基配列からなる α -ガラクトシダーゼ遺伝子。

(a)配列番号1で表される塩基配列;

(b)配列番号1で表される塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された塩基配列であって、かつ、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列:

[8] 請求項6又は7に記載の α -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む組換えベクター。

[9] 請求項6又は7に記載の α -ガラクトシダーゼ遺伝子又は請求項8に記載の組み換えベクターを導入した形質転換体。

[10] 請求項9記載の形質転換体を培養して得られる α -ガラクトシダーゼ。

[11] 請求項1～3、5、又は10のいずれか一項に記載の α -ガラクトシダーゼを含む酵素組成物。

[12] α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、ガラクタナーゼ、アラビナナーゼ、マンナナーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチンリアーゼ、及びポリガラクトツロン酸リアーゼから選択される少なくとも1種以上の成分をさらに含有する、請求項11記載の酵素組成物。

[13] 請求項11又は12のいずれかに記載の酵素組成物を含むラフィノース合成試薬。

[14] 請求項1～3、5、又は10のいずれか一項に記載の α -ガラクトシダーゼ、請求項11又は12に記載の酵素組成物、若しくは請求項13に記載のラフィノース合成試薬を用いることを特徴とするラフィノースの製造方法。

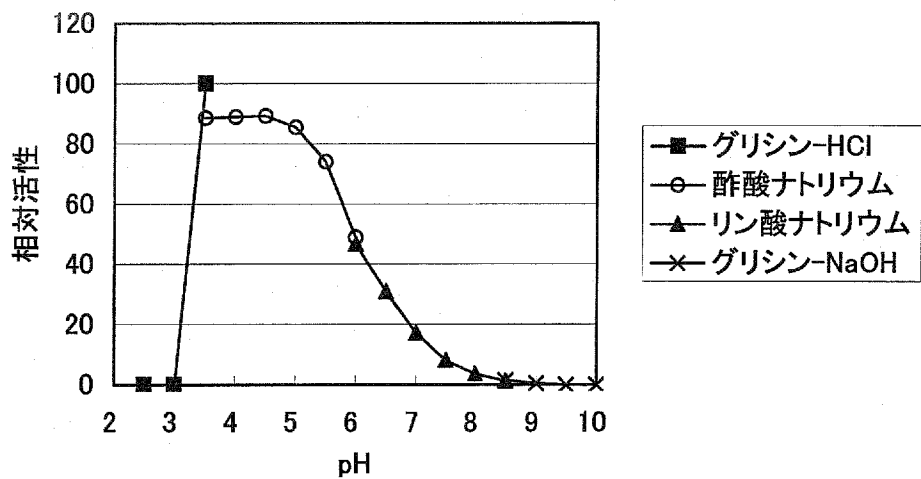
[15] *Bacillus coagulans*に属する微生物を培養して得た微生物触媒を利用することを特徴とするラフィノースの製造方法。

[16] *Bacillus coagulans* AKC003株、AKC004株(FERM-ABP10948)、AKC005株、AKC006株のいずれかに属する*Bacillus coagulans*及び／又はその変異体を培養して得た微生物触媒を利用することを特徴とするラフィノースの製造方法。

- [17] 請求項9に記載の形質転換体を培養して得た微生物触媒を利用することを特徴とするラフィノースの製造方法。
- [18] 生成オリゴ糖中のラフィノース含有率が65%以上である、請求項14～17のいずれかに記載のラフィノースの製造方法。
- [19] 原料としてスクロース及びガラクトースを用いる、請求項14～18のいずれかに記載のラフィノースの製造方法。
- [20] 原料中のスクロース濃度が30% (w/v) ～90% (w/v) であり、原料中のガラクトース濃度が2% (w/v) ～45% (w/v) である、請求項19に記載のラフィノースの製造方法。

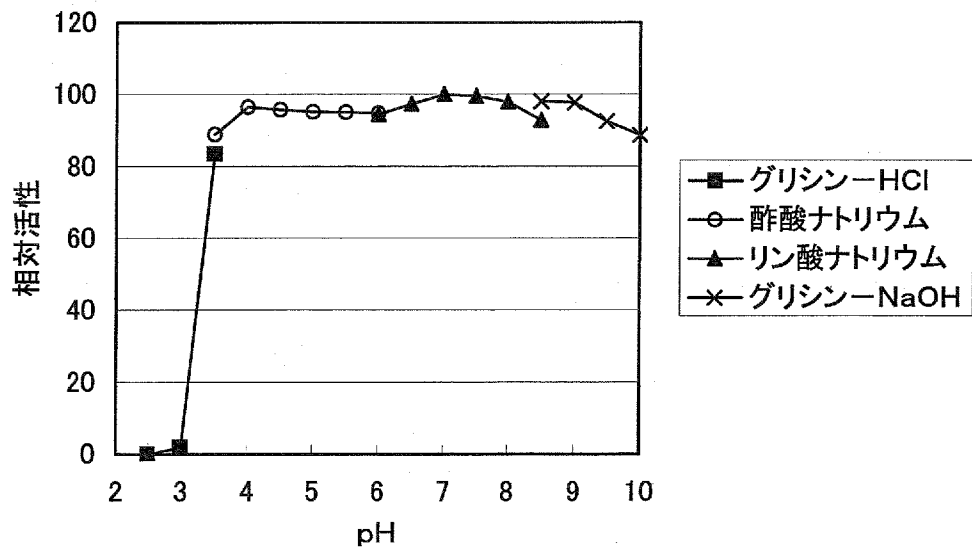
[図1]

α -ガラクトシダーゼの至適 pH 範囲

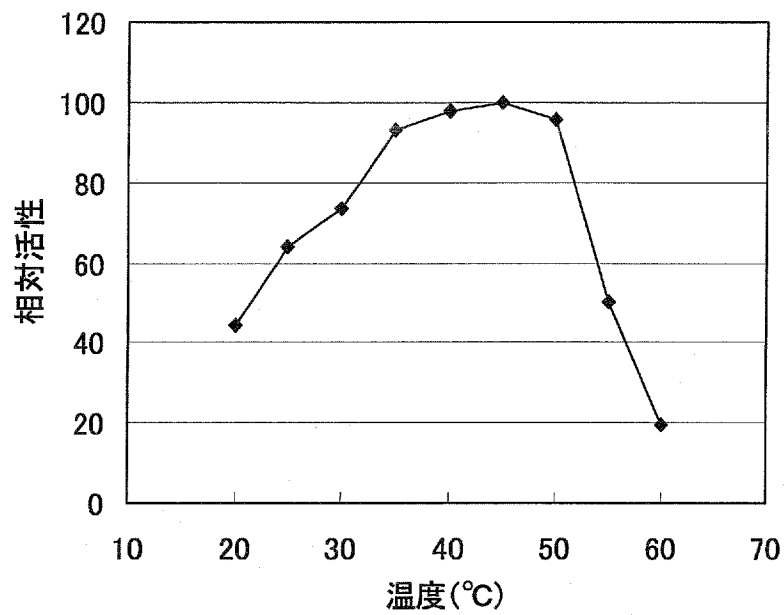


[図2]

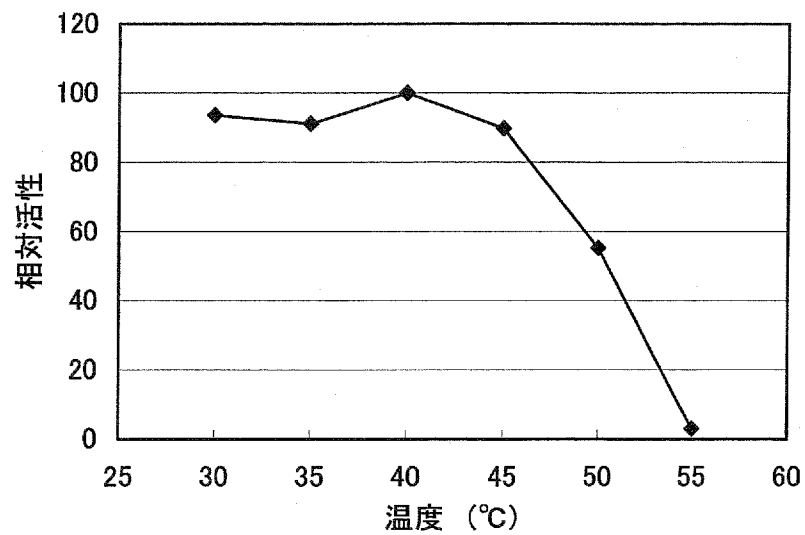
α -ガラクトシダーゼの安定 pH 範囲



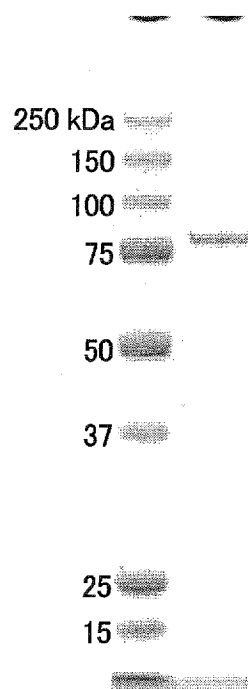
[図3]

 α -ガラクトシダーゼの至適温度範囲

[図4]

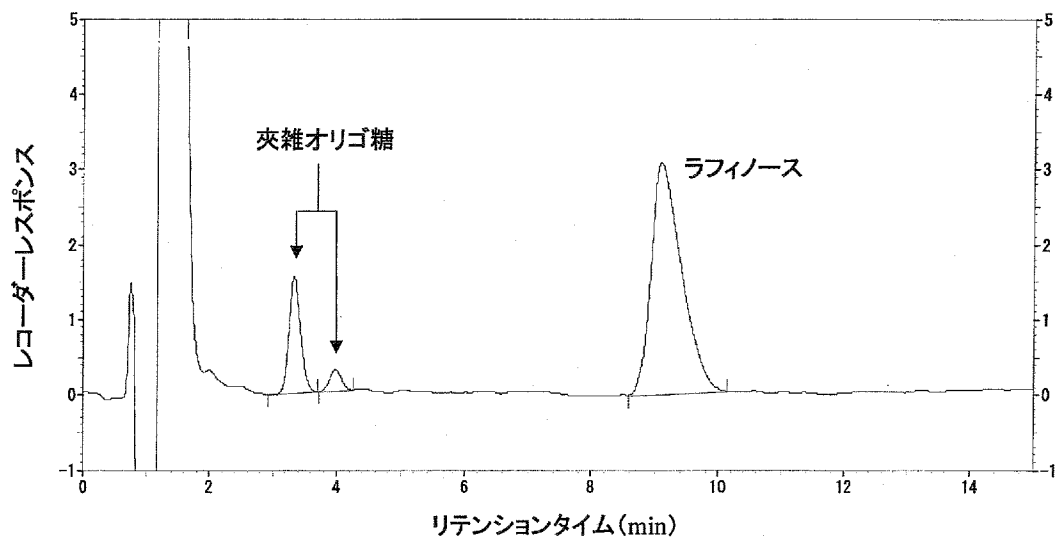
 α -ガラクトシダーゼの安定温度範囲

[図5]

 α -ガラクトシダーゼの分子量 (SDS-PAGE)

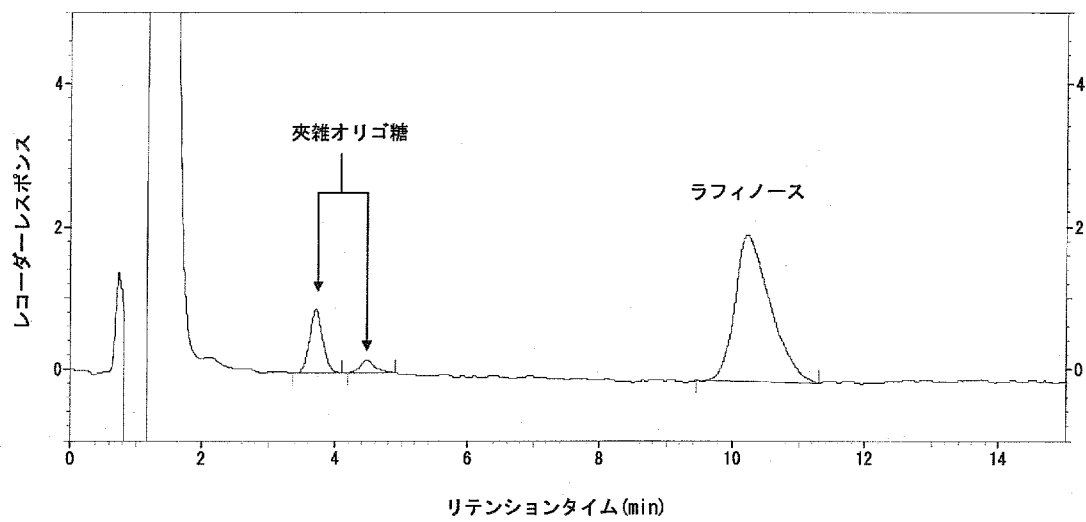
[図6]

HPLCチャート



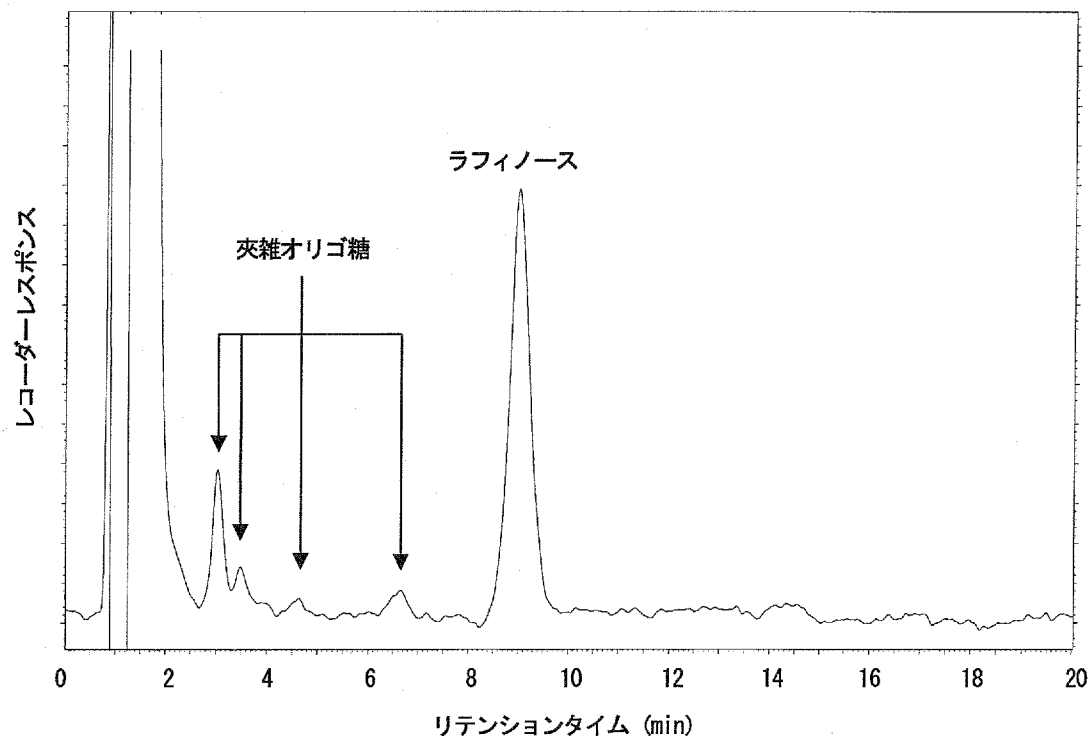
[図7]

HPLCチャート



[図8]

HPLCチャート



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/052691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P19/18(2006.01)i, C12R1/07(2006.01)n

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)

C12P19/18, C12R1/07

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/Caplus (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,

SwissProt/Geneseq, JMEDPlus/JST7580/JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	Katsumi AJISAKA, et. al., Synthetic studies of oligosaccharides by use of a reversed hydrolysis activity of glycohydrolases, Denpun Kagaku, 1989, Vol.36, No.2, p.113-122, Fig.6(a)	<u>1, 11-14, 18-20</u> 2-10, 15-17
<u>X</u> A	P. M. DEY, Transgalactosylation activity of sweet almond α -galactosidase: Synthesis of saccharides, Phytochemistry, 1979, Vol.18, p.35-38, Table 1	<u>1, 11-14, 18</u> 2-10, 15-17, 19, 20

☒ 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
10 March, 2008 (10.03.08)Date of mailing of the international search report
18 March, 2008 (18.03.08)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/052691

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	Christiane GANTER, et. al., Production of thermostable, recombinant α -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup, Journal of Biotechnology, 1988, Vol.8, p.301-310	<u>5-12</u> 1-4, 13-20
A	JP 2001-321179 A (Nippon Tensai Seito Kabushiki Kaisha), 20 November, 2001 (20.11.01), (Family: none)	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P19/18(2006.01)i, C12R1/07(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P19/18, C12R1/07

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 8 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/Geneseq, JMEDPlus/JST7580/JSTPlus(JDream2)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Katsumi AJISAKA, et. al., Synthetic studies of oligosaccharides by use of a reversed hydrolysis activity of glycohydrolases, 澱粉化学, 1989, 第 36 巻, 第 2 号, p.113-122, Fig.6(a)	<u>1, 11-14, 18-20</u> 2-10, 15-17
<u>X</u> A	P. M. DEY, Transgalactosylation activity of sweet almond α -galactosidase: Synthesis of saccharides, Phytochemistry, 1979, Vol.18, p.35-38, Table 1	<u>1, 11-14, 18</u> 2-10, 15-17, 19, 20

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 0 . 0 3 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

1 8 . 0 3 . 2 0 0 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高 美葉子

4 N

4 0 4 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Christiane GANTER, et. al., Production of thermostable, recombinant α -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup, Journal of Biotechnology, 1988, Vol.8, p.301-310	<u>5-12</u> 1-4, 13-20
A	JP 2001-321179 A (日本甜菜製糖株式会社) 2001.11.20, (ファミリーなし)	1-20