

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7011393号
(P7011393)

(45)発行日 令和4年2月10日(2022.2.10)

(24)登録日 令和4年1月18日(2022.1.18)

(51)国際特許分類

C 1 2 P	19/16 (2006.01)	F I	C 1 2 P	19/16
C 1 2 P	1/00 (2006.01)		C 1 2 P	1/00
C 1 2 P	19/18 (2006.01)		C 1 2 P	19/18
C 1 2 N	15/56 (2006.01)		C 1 2 N	15/56

Z

請求項の数 11 (全84頁)

(21)出願番号	特願2016-554321(P2016-554321)	(73)特許権者	520346620 ニュートリション・アンド・バイオサイ
(86)(22)出願日	平成27年2月26日(2015.2.26)		エンシーズ・ユーエスエー・フォー, イ
(65)公表番号	特表2017-518025(P2017-518025 A)		ンコーポレイテッド
(43)公表日	平成29年7月6日(2017.7.6)		アメリカ合衆国ニューヨーク州 1462
(86)国際出願番号	PCT/US2015/017644		3. ロチェスター, ウィントン・ブレイ
(87)国際公開番号	WO2015/130881		ス 3 4 9 0
(87)国際公開日	平成27年9月3日(2015.9.3)	(74)代理人	100127926 弁理士 結田 純次
審査請求日	平成30年2月19日(2018.2.19)	(74)代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
審判番号	不服2020-17733(P2020-17733/J 1)	(72)発明者	ケヴィン・ディー・ナジー アメリカ合衆国デラウェア州 19808 . ウィルミントン, スティーヴンレーン 106
審判請求日	令和2年12月25日(2020.12.25)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	61/945,233		
(32)優先日	平成26年2月27日(2014.2.27)		
(33)優先権主張国・地域又は機関			
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルファ - グルコシダーゼ酵素を用いた二糖およびオリゴ糖の酵素性加水分解

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

少なくとも1つのアルファ-1,3またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合を含む可溶性糖においてアルファ-1,3またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合を加水分解する方法であって、可溶性糖は、グルカン合成反応から得た分画内に含まれる二糖またはオリゴ糖であり、分画は、グルカン合成反応の不溶性アルファ-グルカン生成物から分離されており、方法は、

可溶性糖をアルファ-グルコシダーゼ酵素と接触させることを含み、前記アルファ-グルコシダーゼ酵素は、可溶性糖の少なくとも1つのアルファ-1,3またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合を加水分解し、可溶性糖の量が、前記接触前に存在した可溶性糖の量と比較して減少しており、可溶性糖が、グルカン合成反応の副産物であり、前記不溶性アルファ-グルカン生成物が、少なくとも95%のアルファ-1,3グリコシド結合を含む、方法。

【請求項2】

アルファ-グルコシダーゼ酵素が固定化されている、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

加水分解前の可溶性糖の重合度が3~7である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記不溶性アルファ-グルカン生成物が少なくとも97%のアルファ-1,3グリコシド結合を含む、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記不溶性アルファ - グルカン生成物が少なくとも 9 9 % のアルファ - 1 , 3 グリコシド結合を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記不溶性アルファ - グルカン生成物が少なくとも 1 0 0 % のアルファ - 1 , 3 グリコシド結合を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

分画がグルカン合成反応のろ液である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

分画がグルカン合成反応の上清である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 9】

アルファ - グルコシダーゼ酵素がトランスグルコシダーゼである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

アルファ - グルコシダーゼ酵素がグルコアミラーゼである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

アルファ - グルコシダーゼ酵素が配列番号 1 、 2 、 6 、 9 、 1 2 、 1 5 、 1 8 、 2 0 、 2 4 、 2 6 、 3 0 、 3 2 、 3 6 または 3 8 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本願は、全てそれらの全体において参照により本明細書中に組み込まれる、米国仮特許出願第 6 1 / 9 4 5 , 2 3 3 号明細書（2 0 1 4 年 2 月 2 7 日提出）、同第 6 1 / 9 4 5 , 2 4 1 号明細書（2 0 1 4 年 2 月 2 7 日提出）、同第 6 2 / 0 0 4 , 2 9 0 号明細書（2 0 1 4 年 5 月 2 9 日提出）、同第 6 2 / 0 0 4 , 3 0 8 号明細書（2 0 1 4 年 5 月 2 9 日提出）、同第 6 2 / 0 0 4 , 3 1 2 号明細書（2 0 1 4 年 5 月 2 9 日提出）、同第 6 2 / 0 0 4 , 3 0 0 号明細書（2 0 1 4 年 5 月 2 9 日提出）、同第 6 2 / 0 0 4 , 3 1 4 号明細書（2 0 1 4 年 5 月 2 9 日提出）および同第 6 2 / 0 0 4 , 3 0 5 号明細書（2 0 1 4 年 5 月 2 9 日提出）の利益を主張する。

30

【0002】

本発明は、小型の糖ポリマーの酵素性加水分解の分野にある。具体的には、本発明は、アルファ - グルコシダーゼ酵素で 1 つ以上のアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を含む二糖およびオリゴ糖を加水分解することに関する。

【0003】

電子提出する配列リストに対する参照

配列リストの正式なコピーが、2 0 1 5 年 2 月 1 1 日に作成され、2 6 6 キロバイトのサイズを有する C L 6 2 2 0 U S N P _ S e q u e n c e L i s t i n g _ S T 2 5 . t x t という名称のファイルにより、A S C I I フォーマットの配列リストとして E F S - ウェブを介して電子提出され、本明細書と同時に提出される。この A S C I I フォーマットの文書に含まれる配列リストは、本明細書の一部であり、その全体において参照により本明細書中に組み込まれる。

40

【背景技術】**【0004】**

トランスクルコシダーゼ（E C . 2 . 4 . 1 . 2 4 、 1 , 4 - アルファ - グルカン 6 - アルファ - グルコシルトランスクフェラーゼ）は、アルファ - D - グルコ - オリゴ糖との温置において加水分解性および転移反応の両方を触媒する D - グルコシルトランスクフェラーゼ酵素である（非特許文献 1 ）。マルトースは、この酵素でのトランスクルコシル化反応に対する最も好ましい基質である。転移は H O - 6 に対して最も高い頻度で起こり、これに

50

より、D-グルコースからイソマルトースが、またはマルトースからパノース（6-O-アルファ-グルコシルマルトース）が生成する。トランスグルコシダーゼはまた、グルコシル残基を別のD-グルコシル単位のHO-2またはHO-3にも転移させることができ、コージビオースまたはニゲロースが形成される。この酵素はさらに、D-グルコシル単位をHO-4に転移し戻して、マルトースを再形成させることができる。

【0005】

トランスグルコシダーゼによるトランスグルコシル化反応の結果として、マルト-オリゴ糖残基が、非還元末端から、アルファ-D-1, 6グリコシド結合により連結されるより高い割合のグルコシル残基を含有するイソマルト-オリゴ糖（IMO）に変換される。アジアにおいて、多くの食品および飲料処方物でIMO糖が使用される。Brie rら（特許文献1）は、オオムギ麦芽汁（barley wort）からIMOを生産するためにトランスグルコシダーゼを使用することを開示した。10

【0006】

Pouloseら（特許文献2）は、キサンタンおよびグアーガムなどの多糖を分解するためにトランスグルコシダーゼを使用することを開示した。キサンタンガムは、マンノースおよびグルクロン酸を含有する分枝にグルコースが交互に1, 3-結合されるセルロース骨格を含む。グアーガムの骨格は、ガラクトース残基が1つおきのマンノースでアルファ-1, 6-結合される、ベータ-1, 4-結合マンノース残基を含む。

【0007】

Lanteroら（特許文献3）は、スクロース、メレジトースおよびトレハロースを分解するためにトランスグルコシダーゼを使用することを開示した。これらの糖は、1, 2-（スクロース）、1, 3-（メレジトース）または1, 1-（トレハロース）結合を介してフルクトースに連結されるグルコースを含む。20

【0008】

トランスグルコシダーゼの様々な加水分解活性が開示されているものの、このタイプの酵素は一般に、2つのグルコシル残基間のアルファ結合を加水分解するためのそれらの能力を考えると、アルファ-グルコシダーゼであるとみなされる。例えば、トランスグルコシダーゼは、マルターゼ活性（マルトースの2つのグルコシル残基間のアルファ-1, 4グリコシド結合の加水分解）を有することと関連があり、これはアルファ-グルコシダーゼ活性のタイプである。30

【0009】

前述の開示にもかかわらず、驚くべきことに、トランスグルコシダーゼ（EC 2.4.1.24）などのアルファ-グルコシダーゼが、グルコシル-グルコースのアルファ-1, 3およびアルファ-1, 6グリコシド結合を加水分解し得ることが今回分かった。アルファ-グルコシダーゼ酵素は、グルコシル-アルファ-1, 3-グルコースおよびグルコシル-アルファ-1, 6-グルコースを含有する二糖およびオリゴ糖を分解するのに有用であるものとして本明細書中で開示される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【文献】米国特許出願公開第2003/0167929号明細書

米国特許出願公開第2008/0229514号明細書

米国特許第5770437号明細書

【非特許文献】

【0011】

【文献】1951, Pazur and French, J. Amer. Chem. Soc. 73: 3536

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

10

20

30

40

50

一実施形態において、本発明は、少なくとも1つのアルファ-1, 3またはアルファ-1, 6グルコシル-グルコース結合を含む糖においてアルファ-1, 3またはアルファ-1, 6グルコシル-グルコース結合を加水分解する方法であって、この糖が二糖またはオリゴ糖であり、方法が、適切な条件下で糖をアルファ-グルコシダーゼ酵素と接触させることを含み、アルファ-グルコシダーゼ酵素が、糖の少なくとも1つのアルファ-1, 3またはアルファ-1, 6グルコシル-グルコース結合を加水分解し、糖の量が、接触工程前に存在した糖の量と比較して減少している、方法に関する。

【0013】

別の実施形態において、加水分解法のアルファ-グルコシダーゼ酵素は固定化されている。

【0014】

別の実施形態において、加水分解法の糖は、加水分解前の重合度が3～7である。別の実施形態において、接触工程後の糖の濃度は、接触工程前に存在した糖の濃度の50%未満である。

【0015】

別の実施形態において、加水分解法の適切な条件は、(i) グルカン合成反応、または(ii) グルカン合成反応から得られる分画を含み、糖はグルカン合成反応の副産物である。別の実施形態において、グルカン合成反応は、少なくとも1つの不溶性アルファ-グルカン生成物を生成させる。別の実施形態において、分画はグルカン合成反応のろ液である。別の実施形態において、グルカン合成反応は、(i) グルコシルトランスフェラーゼの生成物、または(ii) 1つ以上のアルファ-1, 3-グリコシド結合または1つ以上のアルファ-1, 6-グリコシド結合を有するグルカンポリマーを加水分解することが可能なグルコシルトランスフェラーゼおよびアルファ-グルカノヒドロラーゼの両方の協奏作用の生成物である、少なくとも1つの可溶性アルファ-グルカン生成物を生成させる。グルカン合成反応が少なくとも1つの可溶性アルファ-グルカン生成物を生成させる別の実施形態において、この分画はグルカン合成反応のクロマトグラフィー分画である。

【0016】

別の実施形態において、アルファ-グルコシダーゼ酵素はトランスクロスグローバルコシダーゼである。別の実施形態において、トランスクロスグローバルコシダーゼは、配列番号1と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0017】

別の実施形態において、本発明は、糖をアルファ-グルコシダーゼ酵素と接触させることにより生成される組成物であって、糖が二糖またはオリゴ糖であり、かつ少なくとも1つのアルファ-1, 3またはアルファ-1, 6グルコシル-グルコース結合を含み、アルファ-グルコシダーゼ酵素が、糖の少なくとも1つのアルファ-1, 3またはアルファ-1, 6グルコシル-グルコース結合を加水分解し、組成物が、接触工程前に存在した糖の量と比較して減少した量の糖を含む、組成物に関する。

【0018】

別の実施形態において、組成物の糖は、加水分解前の重合度が3～7である。接触工程後の糖の濃度は、例えば、接触工程前に存在した糖の濃度の50%未満である。

【0019】

別の実施形態において、組成物の糖は(i) グルカン合成反応、または(ii) グルカン合成反応から得られる分画にあり、この糖はグルカン合成反応の副産物である。別の実施形態において、この分画は、グルカン合成反応のろ液またはグルカン合成反応のクロマトグラフィー分画である。

【0020】

別の実施形態において、本発明は、グルカン合成反応の分画に存在するフルクトースを濃縮する方法であって、(a) グルカン合成反応から得られる分画を適切な条件下でアルファ-グルコシダーゼ酵素と接触させることであって、アルファ-グルコシダーゼ酵素が、分画内に含まれる二糖またはオリゴ糖の少なくとも1つのアルファ-1, 3またはアルファ-1, 6グルコシル-グルコース結合を加水分解する、接触させることと、(b) 工程

10

20

30

40

50

(a) の分画のフルクトース濃度と比較してより高いフルクトース濃度を有する組成物を得るために、工程(a)の加水分解分画からフルクトースを分離することとを含む、方法に関する。

【0021】

別の実施形態において、本発明は、(a) グルカン合成反応から得られる分画を適切な条件下でアルファ - グルコシダーゼ酵素と接触させることであって、アルファ - グルコシダーゼ酵素が、分画内に含まれる二糖またはオリゴ糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解する、接触させることと、(b) 生成物を得るために微生物を用いて工程(a)の分画を発酵させることであって、発酵が、工程(a)の後または工程(a)と同時に行われ得る、発酵させることと、(c) 任意選択により(b)の生成物を単離することとを含み、(b)の生成物の収率が、酵素と接触していないグルカン合成反応の分画を発酵させる生成物の収率と比較して上昇している、発酵方法に関する。

10

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】NOVO188酵素での加水分解処理前(出発物質)および後(処理済み物質)のグルカン反応ろ液物質の¹H NMRスペクトルである(実施例2~3参照)。

【図2】TGL-2000トランスグルコシダーゼでの加水分解処理前(出発物質)および後(処理済み物質)のグルカン反応ろ液物質の¹H NMRスペクトルである(実施例2~3参照)。

20

【発明を実施するための形態】

【0023】

20

30

40

50

【表1】

表 1. 核酸およびタンパク質配列番号のまとめ

説明	核酸 配列番号	タンパク質 配列番号
"TG L-2000"、 <i>A.ニガー(A. niger)</i> トランスグルコシダーゼ(シグナルペプチドのない成熟型)		1 (965aa)
"GC321 グルコアミラーゼ"、 <i>T.リーゼイ(T. reesei)</i> グルコアミラーゼ(TrGA)(シグナルペプチドのない成熟型)		2 (599aa)
"gtfJ"、ストレプトコッカス・サリバリウス(<i>Streptococcus salivarius</i>)グルコシルトランスフェラーゼ。GENBANK 認識番号 47527 と比較して、タンパク質の最初の 42 アミノ酸が欠失; 開始メチオニンが含まれる。		3 (1477aa)
"Aclglu1"、アスペルギルス・クラバツス(<i>Aspergillus clavatus</i>)アルファ-グルコシダーゼ、シグナルペプチドを含む全長前駆体型。	4 (3147 塩基)	5 (990aa)
"Aclglu1"、アスペルギルス・クラバツス(<i>Aspergillus clavatus</i>)アルファ-グルコシダーゼ、シグナルペプチドを欠く成熟型。		6 (971aa)
"Nfiglu1"、ネオサルトリア・フィシェリ(<i>Neosartorya fischeri</i>)アルファ-グルコシダーゼ、シグナルペプチドを含む全長前駆体型。	7 (3158 塩基)	8 (988aa)
"Nfiglu1"、ネオサルトリア・フィシェリ(<i>Neosartorya fischeri</i>)アルファ-グルコシダーゼ、シグナルペプチドを欠く成熟型。		9 (969aa)
"Nrclglu1"、ニューロスボラ・クラッサ(<i>Neurospora crassa</i>)アルファ-グルコシダーゼ、シグナルペプチドを含む全長前駆体型。	10 (3385 塩基)	11 (1044aa)
"Nrclglu1"、ニューロスボラ・クラッサ(<i>Neurospora crassa</i>)アルファ-グルコシダーゼ、シグナルペプチドを欠く成熟型。		12 (1022aa)
"TauSec098"、ラサモソニア・コンポステイコラ(<i>Rasamsonia composticola</i>)アルファ-グルコシダーゼ、シグナルペプチドを含む全長前駆体型。	13 (3293 塩基)	14 (1035aa)

10

20

30

40

【0024】

50

【表2】

"TauSec098"、ラサモソニア・コンポステイコラ(<i>Rasamsonia composticola</i>)アルファ-グルコシダーゼ、シグナルペプチドを欠く成熟型。		15 (1013aa)
"TauSec099"、ラサモソニア・コンポステイコラ(<i>Rasamsonia composticola</i>)アルファ-グルコシダーゼ、シグナルペプチドを含む全長前駆体型。	16 (3162 塩基)	17 (990aa)
"TauSec099"、ラサモソニア・コンポステイコラ(<i>Rasamsonia composticola</i>)アルファ-グルコシダーゼ、シグナルペプチドを欠く成熟型。		18 (973aa)
"BloGlu1"、ビフィドバクテリウム・ロンガム(<i>Bifidobacterium longum</i>) (亜種ロンガム(longum)JDM301)アルファ-グルコシダーゼ(野生型)。	19 (1815 塩基)	20 (604aa)
"BloGlu1"、ビフィドバクテリウム・ロンガム(<i>Bifidobacterium longum</i>) (亜種ロンガム(longum)JDM301)アルファ-グルコシダーゼ、コドン最適化配列。	21 (1812 塩基)	
"BloGlu2"、ビフィドバクテリウム・ロンガム(<i>Bifidobacterium longum</i>)アルファ-グルコシダーゼ(野生型)。		22 (604aa)
"BloGlu2"、ビフィドバクテリウム・ロンガム(<i>Bifidobacterium longum</i>)アルファ-グルコシダーゼ、アミノ酸配列をコードするコドン最適化配列。	23 (1812 塩基)	24 (604aa)
"BloGlu3"、ビフィドバクテリウム・ロンガム(<i>Bifidobacterium longum</i>) (亜種F8)アルファ-グルコシダーゼ(野生型)	25 (1815 塩基)	26 (604aa)
"BloGlu3"、ビフィドバクテリウム・ロンガム(<i>Bifidobacterium longum</i>) (亜種F8)アルファ-グルコシダーゼ、アミノ酸配列をコードするコドン最適化配列。	27 (1812 塩基)	
"BpsGlu1"、ビフィドバクテリウム・シードロングガム (<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>)アルファ-グルコシダーゼ(野生型)。		28 (585aa)
"BpsGlu1"、ビフィドバクテリウム・シードロングガム (<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>)アルファ-グルコシダーゼ、アミノ酸配列をコードするコドン最適化配列。	29 (1755 塩基)	30 (586aa)

10

20

30

40

【0025】

【表3】

"BthGlu1"、ビフィドバクテリウム・サーモフィルム (<i>Bifidobacterium thermophilum</i>)RBL67 アルファ-グルコシダーゼ(野生型)。	31 (1806 塩基)	32 (601aa)
"BthGlu1"、ビフィドバクテリウム・サーモフィルム (<i>Bifidobacterium thermophilum</i>)RBL67 アルファ-グルコシダーゼ、コドン最適化配列。	33 (1803 塩基)	
"BbrGlu2"、ビフィドバクテリウム・ブレブ (<i>Bifidobacterium breve</i>)アルファ-グルコシダーゼ(野生型)。		34 (662aa)
"BbrGlu2"、ビフィドバクテリウム・ブレブ (<i>Bifidobacterium breve</i>)アルファ-グルコシダーゼ、アミノ酸配列をコードするコドン最適化配列。	35 (1812 塩基)	36 (604aa)
"BbrGlu5"、ビフィドバクテリウム・ブレブ (<i>Bifidobacterium breve</i>)ACS-071-V-Sch8b アルファ-グルコシダーゼ(野生型)。	37 (1821 塩基)	38 (606aa)
"BbrGlu5"、ビフィドバクテリウム・ブレブ (<i>Bifidobacterium breve</i>)ACS-071-V-Sch8b アルファ-グルコシダーゼ、コドン最適化配列。	39 (1818 塩基)	
"Gtf-S"、ストレプトコッカス属 (<i>Streptococcus sp.</i>)C150 グルコシルトランスフェラーゼ、GENBANK GI番号 321278321。		40 (1570aa)
"GTF0459"、ストレプトコッカス属 (<i>Streptococcus sp.</i>)C150 グルコシルトランスフェラーゼ、GENBANK GI番号 321278321 の N 末端短縮型。	41 (4179 塩基)	42 (1392aa)
"Gtf-C"、ストレプトコッカス・ミュータンス (<i>Streptococcus mutans</i>)MT-4239 グルコシルトランスフェラーゼ、GENBANK GI番号 3130088。		43 (1455aa)
"GTF0088BsT1"、ストレプトコッカス・ミュータンス (<i>Streptococcus mutans</i>)MT-4239 グルコシルトランスフェラーゼ、GENBANK GI番号 3130088 の N-おおよび C 末端短縮型。	44 (2715 塩基)	45 (904aa)
"MUT3325"、ペニシリウム・マルネッフェイ (<i>Penicillium marneffei</i>)ATCC 18224 ムタナーゼ、GENBANK GI番号 212533325。	46 (1308 塩基)	47 (435aa)

10

20

30

40

【0026】

引用される全ての特許および非特許文献の開示は、それらの全体において参照により本明細書中に組み込まれる。

【0027】

本明細書中で使用される場合、「発明」または「開示される発明」という用語は、限定するものではなく、特許請求の範囲で定義されるかまたは本明細書中に記載される本発明の何れかに一般に適用されるものである。これらの用語は、本明細書中で交換可能に使用される。

【0028】

50

「糖」、「糖分子」および「炭水化物」という用語は、本明細書中で交換可能に使用され、別段の指示がない限り、二糖またはオリゴ糖を指す。本明細書中での「二糖」は、グリコシド結合により連結される2個の単糖を有する炭水化物を指す。本明細書中での「オリゴ糖」は、例えばグリコシド結合により連結される2~9個の単糖からなる炭水化物を指す。オリゴ糖は本明細書中で「オリゴマー」とも呼ばれ得る。二糖またはオリゴ糖内に含まれる単糖は、例えば「単糖単位」または「モノマー単位」とも呼ばれ得る。本明細書中での好ましい単糖はフルクトースおよびグルコースである。

【0029】

「グリコシド結合(glycosidic linkage)」および「グリコシド結合(glycosidic bond)」という用語は、本明細書中で交換可能に使用され、炭水化物分子を別の炭水化物分子と連結する共有結合のタイプを指す。10

【0030】

本明細書中での「アルファ-1,3グルコシル-グルコース結合」、「アルファ-1,3グルコース-グルコース結合」および「グルコース-アルファ1,3-グルコース」という用語は、2つのアルファ-D-グルコース分子間のアルファ-1,3-グリコシド結合を指す。本明細書中での「アルファ-1,6グルコシル-グルコース結合」、「アルファ-1,6グルコース-グルコース結合」および「グルコース-アルファ1,6-グルコース」という用語は、2つのアルファ-D-グルコース分子間のアルファ-1,6-グリコシド結合を指す。本明細書中でのアルファ-1,3グルコシル-グルコース結合および/またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合は、ある一定の実施形態において二糖またはオリゴ糖内に含まれる。20

【0031】

本明細書中での「アルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合」、「アルファ-1,5グルコース-フルクトース結合」および「グルコース-アルファ-1,5-フルクトース」という用語は、アルファ-D-グルコース分子とフルクトース分子との間のアルファ-1,5-グリコシド結合を指す。本明細書中でのアルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合は、ある一定の実施形態において、二糖またはオリゴ糖内に含まれる。

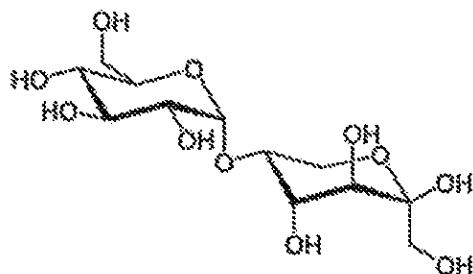
【0032】

本明細書中での「アルファ-D-グルコース」は、「グルコース」も指し得る。

【0033】

アルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合を含有する二糖は、本明細書中で、ロイクロースと呼ぶ。「ロイクロース」および「D-グルコピラノシリル-アルファ(1-5)-D-フルクトピラノース」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される。ロイクロースは次の構造：30

【化1】



を有する。

【0034】

「アルファ-グルコシダーゼ」、「アルファ-1,4-グルコシダーゼ」および「アルファ-D-グルコシドグルコヒドロラーゼ」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される。アルファ-グルコシダーゼ(E.C.3.2.1.20)(「E.C.」は酵素番号(E n40

10

20

30

40

50

zyme Commission number)を指す)は、これまでオリゴ糖(例えば二糖)および多糖基質からの末端の非還元(1,4)-結合アルファ-D-グルコース残基の加水分解性放出を触媒する酵素として認識されてきた。今回、アルファ-グルコシダーゼは、アルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合に対する加水分解活性およびアルファ-1,3およびアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合に対する加水分解活性も有することが本明細書中で開示される。トランスグルコシダーゼおよびグルコアミラーゼ酵素は、このような活性があるアルファ-グルコシダーゼの例である。

【0035】

「トランスグルコシダーゼ」(TG)、「トランスグルコシダーゼ酵素」および「1,4-アルファ-グルカン6-アルファ-グルコシルトランスフェラーゼ」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される。トランスグルコシダーゼ(EC 2.4.1.24)は、これまで、ある種のアルファ-D-グルコ-オリゴ糖との温置において、加水分解性および転移反応の両方を触媒するD-グルコシルトランスフェラーゼ酵素として認識されてきた。今回、トランスグルコシダーゼは、アルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合に対する加水分解活性およびアルファ-1,3およびアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合に対する加水分解活性も有することが本明細書中で開示される。10

【0036】

「グルコアミラーゼ」(GA)、「グルコアミラーゼ酵素」および「アルファ-1,4-グルカングルコヒドロラーゼ」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される。グルコアミラーゼ(EC 3.2.1.3)は、これまで、グルコース含有二糖、オリゴ糖および多糖の非還元末端からのアルファ-1,4およびアルファ-1,6グリコシド結合の両方の加水分解を触媒するエキソ型酵素として認識されてきた。今回、グルコアミラーゼは、アルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合に対する加水分解活性も有することが本明細書中で開示される。20

【0037】

酵素性加水分解は、酵素が、水の構成要素の付加による分子における結合の切断を促進するプロセスである。本明細書中でのアルファ-1,3またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合「を加水分解する」、「の加水分解」または「に対する加水分解活性」は、アルファ-グルコシダーゼ、例えばトランスグルコシダーゼなどによる、2つのグルコース分子間のアルファ-1,3またはアルファ-1,6グリコシル結合の酵素性加水分解を指す。このような加水分解は、アルファ-1,3および/またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合を含有する二糖またはオリゴ糖を本明細書中でのアルファ-グルコシダーゼと適切な条件下で接触させた際に起こる。したがって、本明細書中での「加水分解反応」は、少なくとも(i)アルファ-1,3および/またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合を含有する二糖またはオリゴ糖と、(ii)アルファ-グルコシダーゼとを含む。30

【0038】

本明細書中で「糖化」という用語は、糖(二糖またはオリゴ糖)を単糖成分に分解するプロセスを指す。糖は本明細書中で加水分解反応において糖化され得る。

【0039】

少なくとも1つのアルファ-1,3および/またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合を含む糖(二糖またはオリゴ糖)を本明細書中でのアルファ-グルコシダーゼと接触させるための「適切な条件」は、アルファ-グルコシダーゼによる、糖における1つ以上のアルファ-1,3および/またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合の加水分解を支える条件(例えば温度、pH、時間)を指す。適切な条件は、例えば少なくとも20wt%の水を含む「水性条件」を含み得る。水性条件は、溶液または混合物を特徴付け得る。少なくとも1つのアルファ-1,3および/またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合を含む糖をアルファ-グルコシダーゼと接触させる溶液または混合物は、例えばアルファ-グルコシダーゼ反応(例えばトランスグルコシダーゼまたはグルコアミラーゼ反応)と呼ばれ得る。40

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

本明細書中での「固定化」酵素は、不活性、不溶性材料に付着させられている酵素を指す。固定化酵素を調製するための方法が、例えば参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第5541097号明細書で開示される。

【 0 0 4 1 】

「グルカン」および「グルカンポリマー」という用語は、本明細書中で交換可能に使用され、グリコシド結合により連結されるグルコースモノマーの多糖を指す。本明細書中での「アルファ - グルカン」は、少なくとも約 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アルファ - グリコシド結合を含むグルカンポリマーを指す。10

【 0 0 4 2 】

本明細書中での「不溶性グルカン」は、水性条件で可溶性ではないグルカンポリマーを指す。本明細書中での不溶性グルカンの例は、DP が少なくとも 8 または 9 であるポリアルファ - 1, 3 - グルカンである。今回開示されるようなある一定の実施形態におけるグルコシルトランスフェラーゼ反応は、少なくとも 1 つの不溶性グルカン生成物を生成させる。

【 0 0 4 3 】

「可溶性グルカン」、「可溶性アルファ - グルカン」、「可溶性纖維」、「可溶性グルカン纖維」、「可溶性食物纖維」などの用語は、本明細書中で交換可能に使用され、水性条件で可溶性であるグルカンポリマーを指す。本明細書中での可溶性グルカンの例は、ある種のオリゴ糖、例えば DP が 8 未満のポarialpha - 1, 3 - グルカンなど、および下記で提供される実施例において開示されるある種のオリゴ糖である。今回開示されるようなある一定の実施形態におけるグルコシルトランスフェラーゼ反応は、少なくとも 1 つの可溶性グルカン生成物を生成させる。本明細書中でのある一定の実施形態における可溶性アルファ - グルカン化合物を特徴付ける別の一連の特性は、それらが (i) 重合度が 3 以上である水溶性グルコースオリゴマー、(ii) ヒト小腸で殆どまたは全く吸収されない消化抵抗性（すなわち消化性が非常に遅いかまたは全くない）および (iii) 下部消化管において少なくとも部分的に発酵性であることである。可溶性グルカン纖維組成物の消化性は、例えば A O A C 法 2009.01 を用いて測定することができる。20

【 0 0 4 4 】

「ポarialpha - 1, 3 - グルカン」および「アルファ - 1, 3 - グルカンポリマー」という用語は本明細書中で交換可能に使用される。ポarialpha - 1, 3 - グルカンは、グリコシド結合により一緒に連結されるグルコースモノマー単位を含むポリマーであり、ここでこのグリコシド結合の少なくとも約 50% がアルファ - 1, 3 - グリコシド結合である。「アルファ - 1, 3 - グリコシド結合」という用語は、本明細書中で使用される場合、隣接するアルファ - D - グルコース環において炭素 1 および 3 を通じてアルファ - D - グルコース分子を互いに連結する共有結合のタイプを指す。30

【 0 0 4 5 】

本明細書中でのグルカンの「分子量」は、数平均分子量 (M_n) または重量平均分子量 (M_w) として表すことができる。あるいは、分子量は、ダルトン、グラム / モル、DP_w (重合の重量平均度) または DP_n (重合の数平均度) として表すことができる。高压液体クロマトグラフィー (HPLC)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) またはグル浸透クロマトグラフィー (GPC) によるなど、これらの分子量測定を計算するために、様々な手段が当技術分野で公知である。40

【 0 0 4 6 】

「グルコシルトランスフェラーゼ酵素」、「g t f 酵素」、「g t f 酵素触媒」、「g t f」、「グルカンスクラーゼ」などの用語は本明細書中で交換可能に使用される。本明細書中での g t f 酵素の活性は、生成物をグルカンおよびフルクトースにするスクロース基質の反応を触媒する。g t f 反応の他の生成物 (副産物) は、グルコース (グルコースがグルコシル - g t f 酵素中間体複合体から加水分解される場合からの結果)、様々な可溶

10

20

30

40

50

性オリゴ糖（例えばDP 2～DP 7）およびロイクロース（グルコシル-g tf 酵素中間体複合体のグルコースがフルクトースに連結される場合からの結果）を含み得る。グルコシルトランスフェラーゼ酵素の野生型形態は一般に、（N末端からC末端方向で）シグナルペプチド、可変ドメイン、触媒性ドメインおよびグルカン結合ドメインを含有する。本明細書中のグルコシルトランスフェラーゼは、CAZy（糖質関連酵素（Carbohydrate Active Enzymes））データベースによりグリコシドヒドロラーゼファミリー70（GH70）（Cantarel et al., Nucleic Acids Res. 37: D233-D238, 2009）下で分類される。

【0047】

本明細書中の「スクロース」という用語は、アルファ-1, 2-グリコシド結合により連結されるアルファ-D-グルコース分子およびベータ-D-フルクトース分子から構成される非還元二糖を指す。スクロースは砂糖として一般に知られる。 10

【0048】

「グルカン合成反応」、「グルカン反応」、「gtf 反応」などの用語は、本明細書中で交換可能に使用され、グルコシルトランスフェラーゼ酵素により行われる反応を指す。グルカン合成反応は、本明細書中で使用される場合、一般に、スクロースおよび水、および任意選択により他の成分を含む溶液中で少なくとも1つの活性グルコシルトランスフェラーゼ酵素を含む溶液を指す。本明細書中でグルカン合成反応中にあり得る他の成分としては、例えば、フルクトース、グルコース、ロイクロース、可溶性オリゴ糖（例えばDP 2～DP 7）および可溶性グルカン生成物が挙げられる。また、1つ以上のアルファ-グルカノヒドロラーゼ酵素は、いくつかの態様においてグルカン合成反応中に含まれ得る。ある種のグルカン生成物、例えば重合（DP）度が少なくとも8または9であるポリアルファ-1, 3-グルカンなどは水に不溶性であり、したがってグルカン合成反応において溶解されないが、むしろ溶液から出現し得ることが理解される。 20

【0049】

「アルファ-グルカノヒドロラーゼ」および「グルカノヒドロラーゼ」という用語は、本明細書中で交換可能に使用され、アルファ-グルカンオリゴマーを加水分解することができる酵素を指す。アルファ-グルカノヒドロラーゼは、ある一定のアルファ-D-グリコシド結合に対するそのエンド型加水分解活性によって定義され得る。本明細書中のアルファ-グルカノヒドロラーゼ酵素の例としては、デキストラナーゼ（EC 3.2.1.1 30；アルファ-1, 6-結合グリコシド結合をエンド型加水分解可能）、ムタナーゼ（EC 3.2.1.59；アルファ-1, 3-結合グリコシド結合をエンド型加水分解可能）およびアルテルナナーゼ（alternanase）（EC 3.2.1.-；アルテルナンをエンド型加水分解性に切断可能）が挙げられる。ある種のアルファ-グルカン内の、分岐レベル、分岐のタイプおよび相対的な分岐の長さを含むが限定されない様々な要因は、一部のグリコシド結合をエンド型加水分解する、アルファ-グルカノヒドロラーゼの能力に悪影響を及ぼし得る。

【0050】

グルカン合成反応の「パーセント乾燥固体」は、グルカン合成反応における糖全てのwt %を指す。gtf 反応のパーセント乾燥固体は、例えば反応を準備するために使用したスクロースの量に基づいて計算することができる。 40

【0051】

本明細書中のグルカン合成反応の「分画」は、グルカン合成反応の溶液部分を指す。分画は、グルカン合成反応からの溶液の一部または全てであり得、反応で合成された可溶性または不溶性グルカン生成物から分離されている。分画は、任意選択により、生成物が不溶性（固体）グルカン生成物である実施形態において「母液」とも呼ばれ得る。分画の例はグルカン合成反応のろ液である。分画は溶解された糖、例えばスクロース、フルクトース、グルコース、ロイクロース、可溶性オリゴ糖（例えばDP 2～DP 7）を含有し得るため、分画はまた、グルカン合成反応由来の「混合糖溶液」とも呼ばれ得る。本明細書中の「加水分解分画」は、分画中に存在するロイクロースおよび/またはオリゴ糖を加水

10

20

30

40

50

分解するために本明細書中でのアルファ - グルコシダーゼで処理されている分画を指す。

【 0 0 5 2 】

「ろ液」、「グルカン反応ろ液」、「グルカンろ液」などの用語は、本明細書中で交換可能に使用され、グルカン合成反応で合成される固体グルカン生成物からろ過して分離している分画を指す。本明細書中での「加水分解ろ液」は、ろ液中に存在するロイクロースおよび／またはオリゴ糖を加水分解するために本明細書中でのアルファ - グルコシダーゼで処理されているろ液を指す。

【 0 0 5 3 】

「体積によるパーセント」、「体積パーセント」、「v o l %」、「v / v %」などの用語は、本明細書中で交換可能に使用される。溶液中の溶質の体積によるパーセントは、式：[(溶質の体積) / (溶液の体積)] × 1 0 0 % を用いて決定することができる。10

【 0 0 5 4 】

「重量によるパーセント」、「重量パーセント (w t %)」、「重量 - 重量パーセント (% w / w)」などの用語は、本明細書中で交換可能に使用される。重量によるパーセントは、それが組成物、混合物または溶液中に含まれる場合の、質量ベースでの物質のパーセンテージを指す。本明細書中での全てのパーセンテージは、別段の指示がない限り、重量パーセントである。

【 0 0 5 5 】

本明細書中で使用される場合、「多分散指標」、「P D I」、「不均一性指標」、「分散度」などは、あるポリマー（例えばグルコースオリゴマー、例えば可溶性アルファ - グルカンなど）試料中の分子量の分布の目安を指し、数平均分子量によって重量平均分子量を除することによって計算することができる (P D I = M w / M n)。20

【 0 0 5 6 】

「増加させる (increased)」、「促進される (enhanced)」および「改善される (improved)」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される。これらの用語は、より大きい量または活性、例えば元の量もしくは活性よりも僅かに大きい量もしくは活性、または元の量もしくは活性と比較してそれを大きく超える量もしくは活性などを指し、その間の全ての量または活性を含む。あるいは、これらの用語は、例えば、増大した量または活性が比較されている量または活性よりも少なくとも 1 %、 2 %、 3 %、 4 %、 5 %、 6 %、 7 %、 8 %、 9 %、 1 0 %、 1 1 %、 1 2 %、 1 3 %、 1 4 %、 1 5 %、 1 6 %、 1 7 %、 1 8 %、 1 9 % または 2 0 % 大きい量または活性を指し得る。30

【 0 0 5 7 】

「配列同一性」または「同一性」という用語は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に関して本明細書中で使用される場合、指定される比較枠にわたり最大の一一致となるように並べた場合に同じである 2 つの配列における核酸塩基またはアミノ酸残基を指す。したがって、「配列同一性のパーセンテージ」または「パーセント同一性」は、比較枠にわたり 2 つの最適に並べられた配列を比較することにより決定される値を指し、ここで比較枠中のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、2 つの配列の最適なアライメントに対して、（付加または欠失を含まない）参照配列と比較した場合、付加または欠失（すなわちギャップ）を含み得る。パーセンテージは、一致する位置の数を得るために両配列で同一である核酸塩基またはアミノ酸残基が生じる位置の数を決定し、一致した位置の数を比較枠中の位置の総数で除して、その結果に 1 0 0 を乗じて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。40

【 0 0 5 8 】

National Center for Biotechnology Information (N C B I) ウェブサイト上でオンラインで利用可能な Basic Local Alignment Search Tool (B L A S T) アルゴリズムを使用して、例えば本明細書中で開示される 2 つ以上のポリヌクレオチド配列 (B L A S T N アルゴリズム) またはポリペプチド配列 (B L A S T P アルゴリズム) 間でパーセント同一性を測定し得る。あるいは、配列間のパーセント同一性は、 Clustal アルゴリズム (例えれば50

C l u s t a l W または C l u s t a l V) を用いて行い得る。アライメントの C l u s t a l 法を用いた多重アライメントの場合、初期設定値は、 G A P P E N A L T Y = 1 0 および G A P L E N G T H P E N A L T Y = 1 0 に相当し得る。ペアワイズアライメントおよび C l u s t a l 法を用いたタンパク質配列のパーセント同一性の計算のための初期設定パラメーターは、 K T U P L E = 1 、 G A P P E N A L T Y = 3 、 W I N D O W = 5 および D I A G O N A L S S A V E D = 5 であり得る。核酸の場合、これらのパラメーターは、 K T U P L E = 2 、 G A P P E N A L T Y = 5 、 W I N D O W = 4 および D I A G O N A L S S A V E D = 4 であり得る。あるいはさらに、配列間のパーセント同一性は、 E M B O S S アルゴリズム（例えばニードル）を用いて、パラメーター、例えば G A P O P E N = 1 0 、 G A P E X T E N D = 0 . 5 、 E N D G A P P E N A L T Y = f a l s e 、 E N D G A P O P E N = 1 0 、 E N D G A P E X T E N D = 0 . 5 で、 B L O S U M マトリクス（例えば B L O S U M 6 2 ）を用いて行い得る。

【 0 0 5 9 】

様々なポリペプチドアミノ酸配列が、ある一定の実施形態の特性として本明細書中で開示される。本明細書中で開示される配列と少なくとも約 7 0 ~ 8 5 % 、 8 5 ~ 9 0 % または 9 0 % ~ 9 5 % 同一であるこれらの配列の変異体を使用することができる。あるいは、変異体アミノ酸配列は、本明細書中で開示される配列と、少なくとも 7 0 % 、 7 1 % 、 7 2 % 、 7 3 % 、 7 4 % 、 7 5 % 、 7 6 % 、 7 7 % 、 7 8 % 、 7 9 % 、 8 0 % 、 8 1 % 、 8 2 % 、 8 3 % 、 8 4 % 、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % または 9 9 % の同一性を有し得る。本明細書中での変異体アミノ酸配列は、開示される配列の同じ機能 / 活性、または開示される配列の、少なくとも約 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % または 9 9 % の機能 / 活性を有する。

【 0 0 6 0 】

「単離される」という用語は、ある一定の実施形態において使用される場合、そのネイティブの起源から完全に分離されている何らかの細胞成分を指す（例えば、単離ポリヌクレオチドまたはポリペプチド分子）。一部の例において、単離ポリヌクレオチドまたはポリペプチド分子は、より大きい組成物、緩衝液系または試薬混合液の一部である。例えば、単離ポリヌクレオチドまたはポリペプチド分子は、不均質に細胞または生物内に含まれ得る。別の例は、単離アルファ - グルコシダーゼ（例えばグルコアミラーゼ、トランスクルコシダーゼ）またはグルコシルトランスフェラーゼ酵素である。本明細書中で開示される酵素反応（例えば、アルファ - グルコシダーゼ反応、グルコシルトランスフェラーゼ反応）は、合成、非天然のプロセスである。

【 0 0 6 1 】

開示される本発明の実施形態は、少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を含む糖中のアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解する方法に関する。糖は二糖またはオリゴ糖である。この方法は、適切な条件下で糖をアルファ - グルコシダーゼ酵素と接触させることを含む。接触工程において、アルファ - グルコシダーゼ酵素は、糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解する。この加水分解ゆえに、糖の量は、接触工程前に存在した糖の量と比較して減少する。したがって、この加水分解法は、あるいは組成物中の糖の量を減少させる方法とも呼び得る。

【 0 0 6 2 】

重要なこととして、アルファ - グルコシダーゼ酵素がアルファ - 1 , 3 およびアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解できることは以前には知られていなかったと考えられる。したがって、この加水分解法後のアルファ - グルコシダーゼ反応は、グルカン合成反応および / またはそれから得られる分画からこれらのグルコース - グルコース結合を含有するオリゴ糖副産物を除去するために使用することができる。このような除去は、結果としてグルカン生成物を分解することができる酸加水分解など、副産物除去の化

10

20

30

40

50

学的プロセスを上回る改善に相当する。最終的に、上記加水分解法に従い処理されるグルカン反応分画は、発酵などの下流の適用により良好に適しており、これは例えばグルコース単糖のレベルが分画中で上昇するからである。単糖は、一般にオリゴ糖副産物と比較して、下流のプロセスに対してより扱い易い。

【0063】

アルファ - グルコシダーゼ (E C 3 . 2 . 1 . 2 0) は、本明細書中の実施形態において、アルファ - 1 , 3 および / またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合の少なくとも 1 つを含む糖中のアルファ - 1 , 3 および / またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解するために使用される。アルファ - グルコシダーゼ酵素は、これまで、オリゴ糖 (例えば二糖) および多糖基質からの末端の非還元 (1 , 4) - 結合アルファ - D - グルコース残基の加水分解性放出を触媒することが認識されていた。今回、これらの酵素は、例えばアルファ - 1 , 3 およびアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合に対する加水分解活性を有することも本明細書中で開示される。10

【0064】

アルファ - グルコシダーゼは、何らかの起源由来 (例えば植物、動物、微生物、例えば細菌または真菌 / 酵母など) 、例えばトランスグルコシダーゼおよび / またはグルコアミラーゼが由来し得る以下で開示される供給源などからのものであり得る。例えばアルファ - グルコシダーゼは真菌アルファ - グルコシダーゼであり得る。本明細書中の適切なアルファ - グルコシダーゼの他の例としては、全て参照により本明細書中に組み込まれる、米国特許第 6 3 5 5 4 6 7 号明細書、同第 5 9 2 2 5 8 0 号明細書、同第 5 7 9 5 7 6 6 号明細書、同第 5 7 6 3 2 5 2 号明細書および同第 8 6 3 3 0 0 6 号明細書で開示されるものが挙げられる。20

【0065】

本明細書のある一定の実施形態において、アルファ - グルコシダーゼ酵素は、配列番号 5 、 6 、 8 、 9 、 11 、 12 、 14 、 15 、 17 、 18 、 20 、 22 、 24 、 26 、 28 、 30 、 32 、 34 、 36 、 38 の、または D I A Z Y M E R D F U L T R A (DuPont Industrial Biosciences) の、アミノ酸配列を含み得る。あるいは、アルファ - グルコシダーゼ酵素は、配列番号 5 、 6 、 8 、 9 、 11 、 12 、 14 、 15 、 17 、 18 、 20 、 22 、 24 、 26 、 28 、 30 、 32 、 34 、 36 、 38 と、または D I A Z Y M E R D F U L T R A のアミノ酸配列と、少なくとも約 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含み得、糖中のアルファ - 1 , 3 および / またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合に対する加水分解活性を有する。前述の配列のいくつかは、例えば、N 末端シグナルペプチドを欠く成熟アルファ - グルコシダーゼである。このような配列に対して、一般的には、シグナルペプチドを使用せずにそれを発現させる場合 (酵素が細胞内で発現され、細胞溶解液から得られる発現系によってなど) 、N 末端開始メチオニンが (直接的にまたはエピトープなどの介在する異種アミノ酸配列を介して) (必要に応じて) 付加されるであろうことが理解される。30

【0066】

本明細書中のある一定の実施形態において、アルファ - 1 , 3 および / またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合のうち少なくとも 1 つを含む糖中のアルファ - 1 , 3 および / またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解するためにアルファ - グルコシダーゼとしてトランスグルコシダーゼ (E C 2 . 4 . 1 . 2 4 ; 1 , 4 - アルファ - グルカン 6 - アルファ - グルコシルトランスフェラーゼ) を使用することができる。このクラスの酵素は、これまで、ある種のアルファ - D - グルコ - オリゴ糖との温置時に加水分解性および転移反応を触媒する D - グルコシルトランスフェラーゼ酵素として認識してきた。今回本明細書中で開示されるようなトランスグルコシダーゼは、アルファ - 1 , 3 およびアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合に対する加水分解活性も有する。40

【0067】

10

20

30

40

50

本明細書中のトランスグルコシダーゼ酵素は、細菌または真菌などの何らかの微生物起源由来であり得る。真菌トランスグルコシダーゼの例としては、トリコデルマ属 (*Trichoderma species*) (例えば *T. reesei*) 、アスペルギルス属 (*Aspergillus species*) およびネオサルトリア属 (*Neosartorya species*) (例えば、*N. fischeri*) のものが挙げられるが限定されない。トランスグルコシダーゼが由来し得るアスペルギルス属 (*Aspergillus species*) の例としては、*A. niger* (*A. niger*) 、*A. awamori* (*A. awamori*) 、*A. oryzae* (*A. oryzae*) 、*A. terreus* (*A. terreus*) 、*A. clavatus* (*A. clavatus*) 、*A. fumigatus* (*A. fumigatus*) および *A. nidulans* (*A. nidulans*) が挙げられるが限定されない。本明細書中で有用なトランスグルコシダーゼ酵素の他の例は、全て参照により本明細書中に組み込まれる、Barker et al. (1953, J. Chem. Soc. 3588 - 3593) ; Pazur et al. (1986, Carbohydr. Res. 149: 137 - 147) 、 Nakamura et al. (1997, J. Biotechnol. 53: 75 - 84) および米国特許出願公開第2008/0229514号明細書に記載されている。本明細書中で有用なトランスグルコシダーゼ酵素のさらに他の例は、熱安定性であるものであり；参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第4689296号明細書は、熱安定性のトランスグルコシダーゼを生成させるためのプロセスを開示する。本明細書中で有用なトランスグルコシダーゼ酵素のまたさらなる例は、GENBANKデータベース (NCBI) にあるものの何れか、例えば、全て参照により本明細書中に組み込まれる、受入番号 D45356 (GID: 2645159) 、*A. niger* (*A. niger*) 、BAD06006.1 (GID: 4031328) 、*A. awamori* (*A. awamori*) 、BA08125.1 (GID: 1054565) 、*A. oryzae* (*A. oryzae*) 、XP_001210809.1 (GID: 115492363) 、*A. terreus* (*A. terreus*) 、XP_001216899.1 (GID: 115433524) 、*A. clavatus* (*A. clavatus*) 、XP_751811.1 (GID: 70993928) 、*A. fumigatus* (*A. fumigatus*) 、XP_659621.1 (GID: 67523121) 、*A. nidulans* (*A. nidulans*) 、XP_001266999.1 (GID: 119500484) 、*N. fischeri* (*N. fischeri*) および XP_001258585.1 (GID: 119473371) 、*N. fischeri* (*N. fischeri*))などにおけるものの何れかであり得る。あるいは、本明細書中のトランスグルコシダーゼは、前述の開示されるトランスグルコシダーゼ配列の何れかのアミノ酸配列と少なくとも 90 % または 95 % 同一であるアミノ酸配列を有し得、糖中のアルファ - 1 , 3 および / またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合に対する加水分解活性を有し得る。前述のトランスグルコシダーゼは全て、本明細書中の加水分解反応で使用される場合、好ましくは N 末端シグナルペプチドを欠く成熟型である。

【0068】

本明細書中のある一定の実施形態において、トランスグルコシダーゼ酵素は、*A. niger* (*A. niger*) トランスグルコシダーゼである、配列番号 1 のアミノ酸配列 (TGL - 2000) を含み得る (米国特許出願公開第2008/0229514号明細書)。あるいは、トランスグルコシダーゼは、配列番号 1 と少なくとも約 90 % 、 91 % 、 92 % 、 93 % 、 94 % 、 95 % 、 96 % 、 97 % 、 98 % または 99 % 同一であるアミノ酸配列を含み得、糖中のアルファ - 1 , 3 および / またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合に対する加水分解活性を有し得る。例えば参照により本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0229514号明細書の開示に従い、配列番号 1 またはそれらの変異体の何れかを生成させることができる。配列番号 1 は、N 末端シグナルペプチドを欠く成熟トランスグルコシダーゼである。配列番号 1 はメチオニン残基で開始しないため、一般的には、シグナルペプチドを使用せずにそれを発現させる場合 (酵素が

10

20

30

40

50

細胞内で発現され、細胞溶解液から得られる発現系によってなど)、配列番号1に(直接的にまたはエピトープなどの介在する異種アミノ酸配列を介して)N末端開始メチオニンが付加されることが理解される。

【0069】

グルコアミラーゼ(E C 3 . 2 . 1 . 3 ; アルファ - 1 , 4 - グルカングルコヒドロラーゼ)は本明細書中のある一定の実施形態において、アルファ - グルコシダーゼとして使用することができる。例えば、グルコアミラーゼは、本明細書中で開示される加水分解反応設定 / 条件のそれぞれにおいて、トランスグルコシダーゼとともに含まれ得る。これに関連して、グルコアミラーゼは、これらの結合タイプの何れかを含有する糖中に存在する(i)アルファ - 1 , 5 グルコシル - フルクトース結合および/または(ii)アルファ - 1 , 3 および/またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解するため 10 に使用することができる。このクラスの酵素は、これまで、グルコース含有二糖、オリゴ糖および多糖の非還元末端からのアルファ - 1 , 4 およびアルファ - 1 , 6 グリコシド結合の両方の加水分解を触媒するエキソ型酵素として認識してきた。今回本明細書中で開示されるグルコアミラーゼは、アルファ - 1 , 5 グルコシル - フルクトース結合に対する加水分解活性も有する。ある一定の実施形態において、アルファ - グルコシダーゼはグルコアミラーゼではない。

【0070】

本明細書中のグルコアミラーゼ酵素は、何らかの微生物起源、例えば細菌または真菌など由来であり得る。細菌グルコアミラーゼの例としては、バチルス属(*Bacillus species*) (例えば、*B.*アルカロフィルス(*B. alkalophilus*)、*B.*アミロリケファシエンス(*B. amylolyquefaciens*)、*B.*レンツス(*B. lentus*)、*B.*リシェニホルミス(*B. licheniformis*)、*B.*ステアロサーモフィルス(*B. stearothermophilus*)、*B.*サブチリス(*B. subtilis*)、*B.*スリンクエンシス(*B. thuringiensis*))およびストレプトミセス属(*Streptomyces species*) (例えば、*S.*リビダンス(*S. lividans*))のものが挙げられるが限定されない。真菌グルコアミラーゼの例としては、トリコデルマ属(*Trichoderma species*) (例えば、*T.*リーゼイ(*T. reesei*)、*T.*ロンギブラキアツム(*T. longibrachiatum*)、*T.*ストリクチピリス(*T. strictipilis*)、*T.*アスペレルム(*T. asperellum*)、*T.*コニラングブラ(*T. konilangbra*)、*T.*ハジアヌム(*T. hazianum*))、アスペルギルス属(*Aspergillus species*) (例えば*A.*ニガー(*A. niger*)、*A.*オリゼ(*A. oryzae*)、*A.*テレウス(*A. terreus*)、*A.*クラバツス(*A. clavatus*)、*A.*ニズランス(*A. nidulans*)、*A.*カワチ(*A. kawachi*)、*A.*アワモリ(*A. awamori*))、リゾpus属(*Rhizopus species*) (例えば*R.*オリゼ(*R. oryzae*)、*R.*ニベウス(*R. niveus*))、タラロミセス属(*Talaromyces species*) (例えば、*T.*エメリソニイ(*T. emersonii*)、*T.*サーモフィルス(*T. thermophilus*)、*T.*デュポンチ(*T. duponti*))、ムコール属(*Mucor species*)、ヒポクレア属(*Hypocreales species*) (例えば、*H.*ゲラチノサ(*H. gelatinosa*)、*H.*オリエンタリス(*H. orientalis*)、*H.*ビノサ(*H. vinosa*)、*H.*シトリナ(*H. citrina*))、フサリウム属(*Fusarium species*) (例えば*F.*オキシスポルム(*F. oxysporum*)、*F.*ロセウム(*F. roseum*)、*F.*ベネナツム(*F. venenatum*))、ニューロスボラ属(*Neurospora species*) (例えば*N.*クラッサ(*N. crassa*))、フミコラ属(*Humicola species*) (例えば、*H.*グリセア(*H. grisea*)、*H.*インソレンス(*H. insolens*)、*H.*ラヌギノース(*H. lanuginose*))、ペニシリウム属(*Penicillium species*) (例えば、*P.*ノタツム(*P. nota* 50

tum)、P.クリソゲヌム(P. chrysogenum)）およびサッカロミコプシス属(Saccharomyces species)（例えばS.フィブリゲラ(S. fibuligera)）のものが挙げられるが限定されない。本明細書中での使用のためのこれらの細菌および真菌グルコアミラーゼの例は、参照により本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第2013/0102035号明細書で開示されている。本明細書中で有用なグルコアミラーゼ酵素の他の例は、全て参照により本明細書中に組み込まれる、Svensson et al. (1983, Carlsberg Res. Commun. 48: 529-544)、Boel et al. (1984, EMBO J. 3: 1097-1102); Hayashida et al. (1989, Agric. Biol. Chem. 53: 923-929); 米国特許第5024941号明細書、米国特許第4794175号明細書、米国特許第4247637号明細書、米国特許第6255084号明細書、米国特許第6620924号明細書、Ashikari et al. (1986, Agric. Biol. Chem. 50: 957-964)、Ashikari et al. (1989, Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 129-133)、米国特許第4863864号明細書；米国特許第4618579号明細書、Houghton-Larsen et al. (2003, Appl. Microbiol. Biotechnol. 62: 210-217)および米国特許第7413887号明細書に記載されている。あるいは、本明細書中でのグルコアミラーゼは、前述の開示されるグルコアミラーゼ配列の何れかのアミノ酸配列と少なくとも90%または95%同一であるアミノ酸配列を有し得、(i)アルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合および/または(ii)アルファ-1,3および/またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合に対する加水分解活性を有し得る。前述のグルコアミラーゼは全て、本明細書中での加水分解反応で使用される場合、好ましくはN末端シグナルペプチドを欠く成熟型である。本明細書中で有用な市販のグルコアミラーゼとしては、例えばOPTIDEX L-400、GC147、GC321、GZYME G990 4X、OPTIMAX 7525、DEXTROZYME、DISTILLASEおよびGLUCZYMEが挙げられる。

【0071】

本明細書中のある一定の実施形態において、グルコアミラーゼ酵素は、T.リーゼイ(T. reesei)グルコアミラーゼである、配列番号2(GC321)のアミノ酸配列を含み得る。あるいは、グルコアミラーゼは、配列番号2と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含み得、(i)アルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合および/または(ii)アルファ-1,3および/またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合に対する加水分解活性を有し得る。例えば参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第7413887号明細書または米国特許出願公開第2013/0102035号明細書の開示に従い、配列番号2またはその変異体の何れかを生成させることができる。配列番号2は、N末端シグナルペプチドを欠く成熟グルコアミラーゼである。配列番号2はメチオニン残基で開始しないため、一般的に、シグナルペプチドを使用せずにそれを発現させる場合(酵素が細胞内で発現され、細胞溶解液から得られる発現系によってなど)、N末端開始メチオニンが(直接的にまたはエピトープなどの介在する異種アミノ酸配列を介して)配列番号2に付加されることが理解される。

【0072】

トランスグルコシダーゼまたはグルコアミラーゼなどの本明細書中のアルファ-グルコシダーゼ酵素は市販のものであり得る(例えば、DuPont Industrial Biosciences / Genencor, USA; Megazyme International, Ireland; Amano Enzyme Inc., Japan)。あるいは、参照により本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0229514号明細書、米国特許第7413887号明細書または米国特許出願公開第2013/0102035号明細書に記載されるものなど、当技術分野で公知の何らかの手段によって

10

20

30

40

50

、このような酵素を生成させ得る。例えば、アルファ - グルコシダーゼは、異種発現系、例えば微生物または真菌異種発現系などで組み換え產生させ得る。異種発現系の例としては、細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*）、バチルス属（*Bacillus sp.*））および真核系が挙げられる。真核系は、例えば、酵母（例えばピキア属（*Pichia sp.*）、サッカロミセス属（*Saccharomyces sp.*））または真菌（例えば、トリコデルマ属（*Trichoderma sp.*）、例えば*T. reesei*（*T. reesei*）など；アスペルギルス属（*Aspergillus species*）、例えば*A. niger*（*A. niger*）など）発現系を使用し得る。例えば*T. reesei*宿主において、配列番号1のトランスグルコシダーゼおよび配列番号2のグルコアミラーゼおよびそれらの変異体を発現させることができる。

10

【0073】

本明細書中の加水分解反応で使用される場合、アルファ - グルコシダーゼ酵素は、好ましくはN末端シグナルペプチドを欠く成熟型である。本明細書中の成熟アルファ - グルコシダーゼ酵素を產生させるための発現系は、細胞外分泌を指示するためのN末端シグナルペプチドをコードする配列をさらに含む、酵素をコードするポリヌクレオチドを使用し得る。このような実施形態でのシグナルペプチドは、分泌プロセス中に酵素から切り出される。シグナルペプチドは、トランスグルコシダーゼまたはグルコアミラーゼに対して、ネイティブまたは異種の何れかであり得る。あるいは、成熟型のアルファ - グルコシダーゼ酵素は、酵素が細胞内で発現され、細胞溶解液から得られる発現系によってなど、シグナルペプチドを用いることなくそれを発現させることによって提供され得る。何れかのシナリオ（分泌または細胞内発現）において、エピトープなどの異種アミノ酸配列がアルファ - グルコシダーゼのN末端に任意選択により含まれ得る。

20

【0074】

ある一定の実施形態において、アルファ - グルコシダーゼ酵素は、その酵素を発現する細胞の直接的な使用により、本明細書中での加水分解反応において提供され得る。言い換えると、糖と接触させるアルファ - グルコシダーゼは、加水分解に対して適切な条件に置かれた細胞からのその発現によって存在し得る。したがって、このような細胞は、加水分解反応に単離アルファ - グルコシダーゼ標品を添加する代わりに使用し得る。この目的のための細胞は、例えば細菌、酵母または真菌細胞であり得る。酵母の例としては、サッカロミセス（*Saccharomyces*）属（例えば、*S. cerevisiae*）、クリベロミセス（*Kluyveromyces*）属、カンジダ（*Candida*）属、ピキア（*Pichia*）属、シゾサッカロミセス（*Schizosaccharomyces*）属、ハンセンユラ（*Hansenula*）属、クロエケラ（*Kloeckera*）属およびシュワニオミセス（*Schwanniomyces*）属からのものが挙げられる。本明細書中で有用な他の発現系は、参照により本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第2013/0323822号明細書で開示されている。

30

【0075】

本明細書中の糖は、少なくとも1つのアルファ - 1, 3またはアルファ - 1, 6グルコシル - グルコース結合を含む。したがって、糖の長さに依存して、これは例えば1、2、3、4、5、6、7または8個のアルファ - 1, 5グルコシル - グルコース結合を含有し得る。糖は、好ましくは1、2または3個のこのタイプの結合を含有する。他の好ましい実施形態における糖は、アルファ - 1, 3および/またはアルファ - 1, 6グルコシル - グルコース結合のみを有する。他の実施形態において、糖は、1つ以上のアルファ - 1, 5グルコシル - フルクトース結合を有し得る。

40

【0076】

本明細書中の糖は少なくとも1つのアルファ - 1, 3またはアルファ - 1, 6グルコシル - グルコース結合を含むため、この糖は少なくとも2つのグルコース単位を含む。ある一定の実施形態において、本明細書中の糖は、グルコース単位のみを含むか、またはグルコースおよびフルクトース単位の両方を含む。このような組成物は、グルカン合成反応の二糖およびオリゴ糖副産物を特徴付け得る。あるいは、本明細書中の糖は、グルコ-

50

スおよびフルクトースに加えて、ガラクトース、リボースおよびキシロースなどの他の单糖を含有し得る。

【 0 0 7 7 】

開示される本発明のある一定の実施形態において、加水分解される糖はオリゴ糖であり得る。本明細書中でのオリゴ糖は、例えば、2、3、4、5、6、7、8または9個の单糖単位を有し得る。当技術分野で理解されるように、本明細書中でのオリゴ糖は、オリゴ糖中のモノマー単位の数を規定する、その重合(DP)度数に関して言及され得る。DP3オリゴ糖は、例えば3個のモノマー単位を有する。したがって、オリゴ糖は、例えばDP3、DP4、DP5、DP6、DP7、DP8またはDP9オリゴ糖であり得る。ある一定の実施形態において、糖のDPは3~7(すなわちDP3~7)である。

10

【 0 0 7 8 】

3単位以上の单糖单位がある本明細書中でのオリゴ糖は、例えば、少なくとも1つのアルファ-1,3またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合に加えて、他の結合を含み得る。例えば、オリゴ糖中に、本明細書中で示されるようなアルファ-グルコシダーゼによってまた加水分解され易い、1つ以上のアルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合もあり得る。

【 0 0 7 9 】

ある一定の実施形態において、オリゴ糖は、アルファ-1,3および/またはアルファ-1,6グリコシド結合により連結されるグルコースモノマーのみを含む。したがって、このようなオリゴ糖は、アルファ-1,3グルコシル-グルコースおよび/またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合のみを含む。このようなオリゴ糖の例は、アルファ-1,3結合またはアルファ-1,6結合のみを含有する。オリゴ糖は、ある一定の実施形態において、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%グルコシル-グルコース結合を含み得る。その他の実施形態において、本明細書中でのオリゴ糖中に約75~85%のアルファ-1,3グルコシル-グルコース結合および約15~25%のアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合があり得る。あるいは、本明細書中でのオリゴ糖は、これらのパーセンテージの合計が100%以下である限り、何れかのパーセンテージ(1%~99%の何れかの整数値)のアルファ-1,3グルコシル-グルコース結合および何れかのパーセンテージ(1%~99%の何れかの整数値)のアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合を含み得る。これらのオリゴ糖の何れも、例えば(i)不溶性アルファ-グルカン(例えばポリアルファ-1,3-グルカン)または(ii)可溶性アルファ-グルカン生成物を生成させるグルカン合成反応からの分画中にあり得る。この結合含量は、(i)個々に各オリゴ糖を、または(ii)オリゴ糖群(すなわち平均結合含量)を特徴付けることができる。アルファ-1,3および/またはアルファ-1,6グリコシド結合により連結されるグルコースモノマーのみを含むオリゴ糖は、例えばDP2~DP7またはDP3~DP7であり得る。オリゴ糖中の結合の厳密分布は、オリゴ糖副産物を生成させるグルカン合成反応の条件(例えばg t f酵素)によって変動し得ることが理解されよう。厳密な結合分布が今回開示される方法に対して重要ではないことがさらに理解されよう。

20

【 0 0 8 0 】

本明細書中での実施例は、アルファ-グルコシダーゼ(例えばトランスクルコシダーゼおよびグルコアミラーゼ酵素)が(i)アルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合を含むロイクロースおよび(ii)アルファ-1,3グルコシル-グルコースおよび/またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合のみを含むオリゴ糖の両方を加水分解し得ることを明らかにする。したがって、例えばアルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合、アルファ-1,3グルコシル-グルコース結合および/またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合を加水分解するための反応において、アルファ-グルコシダーゼを使用することができる。

【 0 0 8 1 】

30

40

50

本明細書中での糖中の少なくとも1つのアルファ-1,3またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合は、本明細書中でのアルファ-グルコシダーゼによって加水分解され得る。あるいは、例えばアルファ-グルコシダーゼによって、糖中の2、3、4、5またはそれを超えるこのような結合が加水分解され得ると考えられる。少なくとも1つのアルファ-1,3またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合の加水分解は、ある一定の実施形態において糖の非還元末端で起こり得る。

【0082】

接触工程前に存在した糖の量と比較して、開示される加水分解法において糖の量が減少する。この減少は、糖中の少なくとも1つのアルファ-1,3またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合の加水分解切断によるものである。本明細書中での加水分解法における接触工程後の糖の量（例えば濃度）は、接触工程前に存在した糖の量（適切な条件下で糖類とアルファ-グルコシダーゼを接触させる前）の、約1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%（または1%～90%の何らかの整数値）未満であり得る。

10

【0083】

接触工程前に存在した糖の量と比較して、開示される加水分解法において糖の量は減少する。あらゆる方法でこのような比較を行い得ることが理解されよう。例えば、加水分解法を行う前後両方で糖濃度を測定することができる。あるいは、今回開示されるようなアルファ-グルコシダーゼを対照反応に添加しないことを除き、同じ条件を有する対照反応に對して比較を行うことができる。

20

【0084】

本明細書中のある一定の実施形態において、アルファ-グルコシダーゼは、固定化され得る。酵素は、両方とも参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第5541097号明細書および同第4713333号明細書で開示されるものなど、当技術分野で公知のあらゆる方法および／または手段を用いて固定化し得る。例えば、付加体（例えば酵素-グルタルアルデヒド付加体）を形成させるためにアミン反応性物質（例えばグルタルアルデヒド）の溶液と酵素を接触させ、その後、ポリアミン（例えばEPOMIN P-1050などのポリエチレンイミン）で処理された固体担体に付加体を結合させることによって、1つ以上の酵素を固定化することができる。

30

【0085】

ある一定の実施形態においてアルファ-グルコシダーゼ酵素を固定化することができる固体担体（固体支持体）は、無機または有機物質であり得る。このような物質としては、例えばガンマ-アルミナ、チタニア、粒状活性炭素、粒状珪藻土、ガラスビーズ、多孔質ガラス、軽石、シリカゲル、金属酸化物および酸化アルミニウムが挙げられる。

【0086】

固体担体を処理するために、酵素およびアミン反応性物質を含む付加物への固体担体のその後の曝露によって、固体担体への酵素の付着が導かれるように、ポリアミンを使用することができる。本明細書中で有用なポリアミンの例としては、ポリエチレンジアミン、ポリエチレンイミン（例えば、ポリジエチレントリアミン、ポリトリエチレンテトラミン、ポリペンタエチレンヘキサミン、ポリヘキサメチレンジアミン）、ポリメチレンジシクロヘキシルアミン、ポリメチレンジアニリン、ポリテトラエチレンペニタミン、ポリフェニレンジアミンおよびこれらのポリアミン化合物の2種類以上の混合物が挙げられる。好ましいポリアミンは、水溶性であり、および／または約500～100,000ダルトンの分子量を有する。ある一定の実施形態においてEPOMIN P-1050などのポリエチレンイミンを使用することができる。

40

【0087】

本明細書中の酵素を含む付加体を調製するのに有用なアミン反応性物質は、例えば、アルデヒド、有機ハロゲン化物、無水物、アゾ化合物、イソチオシアネートおよび／またはイソシアネートであり得る。これらのアミン反応性物質の例としては、グルタルアルデヒド、スクシンジアルデヒド、テレフトアルデヒド（terephthaldehyde）

50

、ビス - ジアゾベンジジン - 2 , 2' - ジスルホン酸、4 , 4' - ジフルオロ - 3 , 3' - ジニトロジフェニルスルホン、ジフェニル - 4 , 4' - ジチオシアネート - 2 , 2' - ジスルホン酸、3 - メトキシジフェニルメタン - 4 , 4' - ジイソシアネート、トルエン - 2 - イソシアネート - 4 - イソチオシアネート、トルエン - 2 , - 4 - ジイソチオシアネート、ジアゾベンジジン、ジアゾベンジジン - 3 , 3' - ジアニシジン、N , N' - ヘキサメチレンビスヨードアセトアミド、ヘキサメチレンジイソシアネート、塩化シアヌルおよび / または 1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼンが挙げられる。好ましくは、アミン反応性物質はグルタルアルデヒドなどのアルデヒドである。

【 0 0 8 8 】

アミン反応性化合物が付加したアルファ - グルコシダーゼ酵素をポリアミン処理固体担体と接触させることができ、それによって酵素を固体担体上に固定化する。本明細書中での固定化酵素は、本明細書中で開示されるような加水分解反応を行うために、カラム（例えば充填カラム）または攪拌タンクリアクター中など、様々なリアクター系で使用することができる。

10

【 0 0 8 9 】

本明細書中での糖をアルファ - グルコシダーゼ（例えばトランスグルコシダーゼ）と接触させるための適切な条件は、アルファ - グルコシダーゼによる糖中の 1 つ以上のアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合の加水分解を支持する条件である。適切な条件の例は、下記の実施例で開示される。アルファ - グルコシダーゼを糖基質と接触させるための条件（例えば温度、pH、時間）はまた、米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 2 2 9 5 1 4 号明細書、米国特許第 7 4 1 3 8 8 7 号明細書および米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 0 2 0 3 5 号明細書（これらは全て参照により本明細書中に組み込まれる）でも開示されており、開示される加水分解法に適用可能でもあり得る。

20

【 0 0 9 0 】

開示される加水分解法中の二糖およびオリゴ糖は、一般的には、水または水溶液中で可溶性である。したがって、本明細書中での糖をアルファ - グルコシダーゼと接触させることは、好ましくは、糖が溶解される、水性である適切な条件下で行われる。水性条件は、少なくとも約 2 0 w t % の水を含む溶液または混合物を特徴付け得る。あるいは、本明細書中での水性条件は、例えば少なくとも約 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 8 5 、 9 0 または 9 5 w t % の水（または 2 0 ~ 9 5 w t % の何れかの整数値）である。水性条件は、適切な濃度であり、緩衝液により提供される pH 範囲に基づき選択される、例えば酸性、中性またはアルカリ緩衝液などの緩衝液をさらに含み得る。緩衝液 / 緩衝剤の例としては、クエン酸、酢酸（例えば酢酸ナトリウム）、K H 2 P O 4 、M O P S 、C H E S 、ホウ酸、炭酸ナトリウムおよび重炭酸ナトリウムが挙げられる。

30

【 0 0 9 1 】

本明細書中での加水分解反応の pH は、例えば約 3 . 0 ~ 9 . 0 であり得る。加水分解反応 pH は、例えば、約 3 . 0 、 3 . 5 、 4 . 0 、 4 . 5 、 5 . 0 、 5 . 5 、 6 . 0 、 6 . 5 、 7 . 0 、 7 . 5 、 8 . 0 、 8 . 5 または 9 . 0 であり得る。あるいは、pH は約 4 ~ 5 であり得る。pH を設定するための技術には、例えば緩衝液、アルカリおよび / または酸の使用が含まれ、当技術分野で周知である。

40

【 0 0 9 2 】

本明細書中での加水分解反応の温度は、例えば約 2 0 ~ 約 8 0 であり得る。加水分解反応温度は、例えば、約 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 または 8 0 （または 2 0 ~ 8 0 の何れかの整数値）であり得る。ある一定の実施形態において、約 6 0 、 6 5 または 6 0 ~ 6 5 の加水分解温度が好ましい。

【 0 0 9 3 】

本明細書中での加水分解反応は、少なくとも例えば約 1 0 分 ~ 約 9 0 時間にわたり行われ得る。加水分解反応の時間は、例えば少なくとも約 0 . 5 、 1 、 2 、 3 、 4 、 8 、 1 2 、 1 6 、 2 0 、 2 4 、 3 0 、 3 6 、 4 2 、 4 8 、 5 4 、 6 0 、 6 6 、 7 2 、 7 8 、 8 4 または 9 0 時間（または 0 . 5 ~ 7 2 時間の何れかの整数値）であり得る。ある一定の実施形

50

態において、例えば4時間未満（例えば0.5～4時間）、加水分解反応を行うことができる。所望のレベルの加水分解を達成するために必要とされる時間は、使用される正確な条件により変動し、当業者により理解される。例えば反応に添加されるかまたは反応で使用される固体支持体に固定化される酵素の量を増加させると、接触時間は短縮される。

【0094】

ある一定の実施形態において、加水分解反応において、本明細書中でのアルファ-グルコシダーゼ酵素のうち1つ以上を使用し得る。例えば反応において、トランスグルコシダーゼおよびグルコアミラーゼの両方を使用することができる。本明細書中での加水分解反応におけるアルファ-グルコシダーゼの量は、例えば下記の実施例（例えば実施例2）で使用される量の何れかから±10%～20%（または5%～10%）であり得る。あるいは、約0.1～0.5volum%または0.1～1.0volum%のアルファ-グルコシダーゼを加水分解反応において使用することができる。あるいはまた、加水分解反応において約または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15ppmで本明細書中のアルファ-グルコシダーゼを使用することができる。トランスグルコシダーゼ単位（TGU）は、例えば、次のアッセイ条件下で1分あたりに1マイクロモルのパノースを生成させるトランスグルコシダーゼ酵素の量として定義することができる。トランスグルコシダーゼ活性を例えば次のようにアッセイすることができる：4mMパラ-ニトロフェニル-アルファ-グルコシドおよび1mg/mLウシ血清アルブミン（BSA）を含有する100mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.5中でトランスグルコシダーゼを合わせる。30度30分間温置後、等体積の1M炭酸ナトリウムの添加によって反応を停止させ、OD405を記録する。グルコアミラーゼ単位（GAU）は、例えばpH4.2および6.0で可溶性デンプン基質（4%DSC [置換度]）からグルコース/時間として計算される、1gの還元糖を生成させるグルコアミラーゼ酵素の量として定義することができる。

10

20

30

【0095】

開示される本発明のある一定の実施形態において、加水分解反応中の糖の初濃度は、例えば約1wt%～50wt%であり得る。例えば、ロイクロースの濃度は、約5、10、15、20、25、30、35または40wt%（または5～40wt%の何れかの整数値）であり得る。別の例として、本明細書中の加水分解反応中の1つ以上のオリゴ糖（例えば、DP2、DP3、DP4、DP2～DP7、DP3～DP7）の濃度は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15wt%であり得る。当業者は、糖の合計の濃度（二糖およびオリゴ糖を含む）がアルファ-グルコシダーゼ酵素の活性に影響があり得ることを認識し；酵素活性を最大化するための加水分解反応中の好ましい糖の合計濃度は、50wt%乾燥固体（DS）未満であり得、いくつかの態様においては最も好ましい濃度は20～35wt%DSであり得る。

40

【0096】

糖を本明細書中のアルファ-グルコシダーゼと接触させるためのある一定の実施形態における適切な条件は、(i)グルカン合成反応、または(ii)グルカン合成反応から得られる分画を含み得、ここで糖はグルカン合成反応の副産物である。言い換えると、本明細書中の加水分解反応は、グルカン合成反応またはグルカン合成反応の分画という状況で行われ得るが、一般的には後者で行われる。本明細書中のグルカン合成反応によって、例えば1つ以上の不溶性および/または可溶性アルファ-グルカン生成物が生成し得る。したがって、グルカン合成反応は、「アルファ-グルカン合成反応」として本明細書中のいくつかの実施形態において特徴付けられ得る。

【0097】

グルカン合成反応は一般に、少なくともスクロース、水および1つの活性グルコシルトランスフェラーゼ酵素および任意選択により他の成分を含む溶液を指す。グルカン合成反応中にあり得る他の成分としては、フルクトース、グルコース、ロイクロース、可溶性オリゴ糖（例えばDP2～DP7）および可溶性グルカン生成物が挙げられる。また、1つ以上のアルファ-グルカノヒドロラーゼ酵素は、いくつかの態様においてグルカン合成反応

50

に含まれ得る。D P が少なくとも 8 または 9 の、ポリアルファ - 1 , 3 - グルカンなどのある種のグルカン生成物は水に不溶性であり得、したがってグルカン合成反応中で溶解せず、むしろ溶液から出現し得ると理解されよう。したがって、本明細書中でのグルカン合成反応により生成したグルカンは不溶性であり得る。本明細書中でのアルファ - グルコシダーゼ酵素は、反応の最初の準備中または反応終了近く（例えば 80 ~ 90 % 完了）または反応終了時など、その何れかの段階でグルカン合成反応に添加され得、後者の 2 つの時点が好ましい。

【 0 0 9 8 】

本明細書中でのグルカン合成反応は、グルカン生成物を生成させることに加えて、ロイクロースおよび / または可溶性オリゴ糖などの副産物を生成させるものであり得る。グルカンは、いくつかの態様において、ポリアルファ - グルカンである。したがって、本明細書中でのグルカン合成反応は、例えば、グルカン合成反応において一般的には少なくともロイクロースおよび / またはオリゴ糖副産物と同時生成されるポリアルファ - 1 , 3 - グルカンまたはムタンを生成させるためのものであり得る。

10

【 0 0 9 9 】

ある一定の実施形態において、グルカン合成反応は、ポリアルファ - 1 , 3 - グルカンなどのポリアルファ - グルカンを生成させるグルコシルトランスフェラーゼ酵素を含む。本明細書中で有用なこののようなグルコシルトランスフェラーゼ酵素の例は、米国特許第 70 00000 号明細書および米国特許出願公開第 2013 / 0244288 号明細書、同第 2013 / 0244287 号明細書および同第 2014 / 0087431 号明細書（全て参照により本明細書中に組み込まれる）で開示されている。

20

【 0 1 0 0 】

本明細書中でのグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、何らかの微生物起源、例えば細菌または真菌など由来であり得る。細菌グルコシルトランスフェラーゼ酵素の例は、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus species*)、ロイコノストック属 (*Leuconostoc species*) またはラクトバチルス属 (*Lactobacillus species*) 由来のものである。ストレプトコッカス属 (*Streptococcus species*) の例としては、*S. salivarius*、*S. sobrinus*、*S. dentirousettii*、*S. downei*、*S. mutans*、*S. oralis*、*S. galloyticus* および *S. sanguinis* が挙げられる。ロイコノストック属 (*Leuconostoc species*) の例としては、*L. mesenteroides*、*L. amelobiosum*、*L. argentinum*、*L. carnosum*、*L. citreum*、*L. cremoris*、*L. dextranicum* および *L. fructosum* が挙げられる。ラクトバチルス属 (*Lactobacillus species*) の例としては、*L. acidophilus*、*L. delbrueckii*、*L. helveticus*、*L. salivarius*、*L. casei*、*L. curvatus*、*L. plantarum*、*L. sakei*、*L. brevis*、*L. buchneri*、*L. fermentum* および *L. reuteri* が挙げられる。

30

【 0 1 0 1 】

本明細書中でのグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、プライマー非依存性またはプライマー依存性であり得る。プライマー非依存性グルコシルトランスフェラーゼ酵素は、グルカン合成を行うためにプライマーの存在を必要としない。プライマー依存性グルコシルト

40

50

ランスフェラーゼ酵素は、グルカンポリマー合成中に酵素に対してプライマーとして作用するための開始分子が反応溶液中に存在することを必要とする。「プライマー」という用語は、本明細書中で使用される場合、グルコシルランスフェラーゼ酵素に対する開始剤として作用し得る何らかの分子を指す。ある一定の実施形態において使用することができるプライマーとしては、例えばデキストランおよび他の炭水化物に基づくプライマー、例えば加水分解グルカンなどが挙げられる。参照により本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第2013/0244287号明細書は、出発物質としてポリアルファ-1,3-グルカンを用いた加水分解グルカンの調製を開示する。プライマーとしての使用のためのデキストランは、例えばデキストランT10（すなわち分子量が10kDのデキストラン）であり得る。

10

【0102】

本明細書中でのグルカン合成反応のためのグルコシルランスフェラーゼ酵素は、当技術分野で公知の何らかの手段によって生成させ得る。例えば、グルコシルランスフェラーゼ酵素は、異種発現系、例えば微生物異種発現系などで組み換え産生させ得る。異種発現系の例としては、細菌（例えば大腸菌（*E. coli*）、例えばTOP10またはMG1655など；バチルス属（*Bacillus sp.*））および真核（例えば酵母、例えばピキア属（*Pichia sp.*）およびサッカロミセス属（*Saccharomyces sp.*）など）発現系が挙げられる。

【0103】

本明細書中に記載のグルコシルランスフェラーゼ酵素は、何らかの精製状況（例えば純粋または純粋でない）で使用し得る。例えば、グルコシルランスフェラーゼ酵素をその使用前に精製し、および/または単離し得る。純粋でないグルコシルランスフェラーゼ酵素の例としては、細胞溶解液の形態のものが挙げられる。酵素を異種発現させるために使用される細菌（例えば大腸菌（*E. coli*））から細胞溶解液または抽出物を調製し得る。例えば、細菌をフレンチプレスセルを用いて破壊し得る。代替的な実施形態において、ホモジエナイザー（例えばAPV、Rannie、Gaulin）で細菌をホモジエナライズ処理し得る。グルコシルランスフェラーゼ酵素は、これらのタイプの調製物中で一般的に可溶性である。本明細書中での細菌細胞溶解液、抽出物またはホモジエネートは、スクロースからポリアルファ-1,3-グルカンなどのポリアルファ-グルカンを生成させるために、例えば反応溶液中約0.15~0.3%（v/v）で使用し得る。

20

【0104】

本明細書中でのグルカン合成反応の温度は、必要に応じて調節することができる。ある一定の実施形態において、反応の温度は、約5~約50である。ある一定の他の実施形態における温度は約20~約40である。

【0105】

本明細書中でのグルカン合成反応におけるスクロースの初濃度は、例えば約20g/L~約400g/Lあり得る。あるいは、スクロースの初濃度は、約75g/L~約175g/Lまたは約50g/L~約150g/Lあり得る。あるいはまた、スクロースの初濃度は、例えば約40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150または160g/L（または40~160g/Lの何れかの整数値）あり得る。「スクロースの初濃度」は、反応溶液成分全て（少なくとも水、スクロース、gtf酵素）が添加された直後のgtf反応溶液中のスクロース濃度を指す。

40

【0106】

本明細書中でのグルカン合成反応において使用されるスクロースは非常に純度が高い（99.5%）または何らかの他の純度またはグレードであり得る。例えば、スクロースの純度は少なくとも99.0%であり得るか、または試薬グレードのスクロースであり得る。別の例として、不完全精製スクロースを使用することができる。本明細書中での不完全精製スクロースは、白色精製スクロースに処理加工されていないスクロースを指す。したがって、不完全精製スクロースは、完全に未精製であるかまたは部分的に精製されたものであり得る。未精製スクロースの例は、「粗スクロース」（「粗糖」）およびその溶液

50

である。部分精製スクロースの例は、1、2、3またはそれを超える結晶化工程を経ていない。本明細書中の不完全精製スクロースの I C U M S A (International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis) は例えば 150 より大きいものであり得る。本明細書中のスクロースは、サトウキビ、サトウダイコン、キャッサバ、サトウモロコシまたはトウモロコシなど、何らかの再生可能な糖の起源に由来し得る。本明細書中で有用な適切な形態のスクロースは、例えば結晶形態または非結晶形態(例えば、シロップ、サトウキビ汁、ビート汁)である。不完全精製スクロースのさらなる適切な形態は、米国特許出願第 61 / 969 , 958 号明細書で開示される。

【 0107 】

スクロースに対して I C U M S A 値を決定する方法は、当技術分野で周知であり、例えば、参照により本明細書中に組み込まれる、 I C U M S A Methods of Sugar Analysis : Official and Tentative Methods Recommended by the International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (I C U M S A) (Ed . H . C . S . de Whalley , Elsevier Pub . C o . , 1964) において、 International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis により開示されている。 I C U M S A は、例えば、参照により本明細書中に組み込まれる、 R . J . M c C owage , R . M . Urquhart and M . L . Burge (Determination of the Solution Colour of Raw Sugars , Brown Sugars and Coloured Syrups at pH 7 . 0 - Official , Verlag Dr Albert Bartens , 2011 revision) により記載されるような、 I C U M S A 法 GS 1 / 3 - 7 によって測定することができる。

【 0108 】

ある一定の実施形態において、グルカン合成反応の pH は、約 4 . 0 ~ 約 8 . 0 であり得る。あるいは、 pH は、約 4 . 0 、 4 . 5 、 5 . 0 、 5 . 5 、 6 . 0 、 6 . 5 、 7 . 0 、 7 . 5 または 8 . 0 であり得る。 pH は、リン酸、トリス、クエン酸またはそれらの組み合わせを含むが限定されない、適切な緩衝液の添加または組み込みによって調整または調節され得る。グルカン合成反応における緩衝液濃度は、例えば 0 mM ~ 約 100 mM または約 10 、 20 または 50 mM であり得る。

【 0109 】

本明細書中のグルカン合成反応において生成されるポリアルファ - 1 , 3 - グルカンは、少なくとも約 50 % 、 60 % 、 70 % 、 80 % 、 90 % 、 95 % 、 96 % 、 97 % 、 98 % 、 99 % または 100 % (または 50 % ~ 100 % の何れかの整数値) の、アルファ - 1 , 3 であるグリコシド結合を有し得る。したがって、このような実施形態において、ポリアルファ - 1 , 3 - グルカンは、アルファ - 1 , 3 ではないグリコシド結合の約 50 % 、 40 % 、 30 % 、 20 % 、 10 % 、 5 % 、 4 % 、 3 % 、 2 % 、 1 % または 0 % (または 0 % ~ 50 % の何れかの整数値) 未満である。

【 0110 】

本明細書中のポリアルファ - 1 , 3 - グルカンは、好ましくは、直鎖状 / 非分岐状である骨格を有する。ある一定の実施形態において、ポリアルファ - 1 , 3 - グルカンは、ポリマー中のグリコシド結合のパーセントとして、分岐点なしであるか、または約 10 % 、 9 % 、 8 % 、 7 % 、 6 % 、 5 % 、 4 % 、 3 % 、 2 % または 1 % 未満の分岐点を有する。分岐点の例としては、アルファ - 1 , 6 - 分岐点が挙げられる。

【 0111 】

本明細書中のグルカン合成反応において生成されるポリアルファ - 1 , 3 - グルカンの分子量は、数平均分子量 (M_n) または重量平均分子量 (M_w) として測定され得る。あるいは、分子量は、ダルトンまたはグラム / モルで測定され得る。ポリアルファ - 1 , 3

10

20

30

40

50

- グルカンポリマーの D P_W (重量平均の重合度) または D P_n (数平均の重合度) を参照することも有用であり得る。

【 0 1 1 2 】

本明細書中でのポリアルファ - 1 , 3 - グルカンの M_n または M_w は少なくとも約 1 0 0 0 あり得る。あるいは、M_n または M_w は、例えば少なくとも約 1 0 0 0 ~ 約 6 0 0 0 0 0 (または 1 0 0 0 ~ 6 0 0 0 0 0 の何れかの整数値) であり得る。あるいはまた、ポリアルファ - 1 , 3 - グルカンの分子量は D P_n または D P_w で少なくとも約 1 0 0 または少なくとも約 1 0 0 ~ 1 0 0 0 (または 1 0 0 ~ 1 0 0 0 の何れかの整数値) であり得る。

【 0 1 1 3 】

グルカン合成反応の分画は、糖を今回開示されるようなアルファ - グルコシダーゼに接触させるために適切な条件を構築し得る。分画は、グルカン合成反応からの溶液の一部または全てであり得る。一般的には、分画は、反応において合成された溶解性または不溶性グルカン生成物から分離されている。例えば、水中で不溶性である 1 つ以上のグルカン生成物 (例えばポリアルファ - 1 , 3 - グルカン) から、それらの合成中の溶液から落ちる分画を分離することができる。本開示のある一定の好ましい実施形態における分画は、ポリアルファ - 1 , 3 - グルカン合成反応由来である。

10

【 0 1 1 4 】

分画の体積 (任意選択により分画を希釈または濃縮する前、下記参照) は、ある一定の実施形態において、それが得られるグルカン合成反応の体積の、少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 % または 9 0 % (または 1 0 % ~ 9 0 % の何れかの整数値) であり得る。一般的には、不溶性グルカン (例えばポリアルファ - 1 , 3 - グルカン) を生成させるグルカン合成反応において、分画は、反応の溶液成分の一部 (全てではない) であろう。分画はグルカン合成反応の何れかの段階で得ることができるが、好ましくは反応完了近く (例えば 8 0 または 9 0 % 超完了) または反応完了後に得られる。

20

【 0 1 1 5 】

グルカン合成反応の分画の例は、ある一定の実施形態において、ろ液および上清を含む。したがって、不溶性グルカン生成物が合成される実施形態において、漏斗、フィルター、(例えばプレスフィルター)、遠心または、固形物から一部または全液体を除去することを可能にする当技術分野で公知の何らかの他の方法または機器を用いて、グルカン合成反応から本明細書中の分画を得る (分離する) ことができる。ろ過は、例えば重力、真空または加圧ろ過によるものであり得る。ろ過は、好ましくは不溶性グルカンの全てまたは殆どを除去し；液体から固形物を除去するのに十分な平均孔径 (例えば約 4 0 ~ 5 0 ミクロン) を有する何らかのフィルター材料 (例えばろ紙) を使用することができる。分画は一般に、その溶解成分、例えばグルカン合成反応の副産物などの全てまたは殆どを保持する。

30

【 0 1 1 6 】

本明細書中の分画は、必要に応じて任意選択により希釈または濃縮することができる。分画の濃縮は、溶液を濃縮するのに適切な当技術分野で公知の何らかの他の方法または機器を用いて行うことができる。例えば、蒸発によって、例えばロータリーエバボレーター (例えば約 4 0 ~ 5 0 の温度に設定) を用いることなどによって分画を濃縮することができる。分画は、本明細書中のいくつかの態様において、元の分画体積の約 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % である体積まで濃縮することができる。濃縮分画 (例えば濃縮ろ液) は、任意選択によりシロップと呼ばれ得る。

40

【 0 1 1 7 】

分画は、いくつかの態様において、分画が得られた組成物中に存在した水に代わる水を含み得る。例えば、グルカン合成反応からの糖副産物は、元の溶媒が別の溶媒で置き換えられるある種のクロマトグラフィー法において分離することができる (例えば、カラムに結合する糖副産物 [したがって、元の溶媒から除去される] を新しい溶媒に溶出することができる)。

50

【0118】

分画は、いくつかの態様において、糖をアルファ - グルコシダーゼと接触させるために上記で開示される適切な条件（例えば、温度、pHおよび時間）の何れかを有するように処理し得る。例えば、アルファ - グルコシダーゼを分画に添加する前に約4～5のpHを有するように分画を修飾することができる。別の例として、分画との加水分解反応の温度は約55～65（例えば約60）であり得る。また別の例において、加水分解反応においてシロップまで濃縮されている分画を使用することができる。

【0119】

分画は、本明細書中のある一定の好ましい実施形態において、ポリアルファ - 1, 3 - グルカン合成反応由来であり；このような分画は好ましくはろ液である。本明細書中でのポリアルファ - 1, 3 - グルカン合成反応の分画は、少なくとも水、フルクトースおよび1つ以上のタイプの糖（ロイクロースおよび／またはオリゴ糖、例えばDP2～DP7など）を含む。このタイプの分画中にあり得る他の成分は、例えば、スクロース（すなわち、gtf反応で消費されなかった残留スクロース）、1つ以上のgtf酵素、グルコース、緩衝液、塩、FermaSure（登録商標）、ホウ酸、水酸化ナトリウム、塩酸、細胞溶解液成分、タンパク質および／または核酸を含む。最低限、ポリアルファ - 1, 3 - グルカン合成反応からの分画の成分は、例えば水、フルクトース、グルコース、1つ以上のタイプの糖（ロイクロースおよび／またはオリゴ糖、例えばDP2～DP7など）および任意選択によりスクロースを含む。分画の組成は、一部、分画が得られるグルカン合成反応の条件に依存することが理解される。1つ以上のgtf酵素を含有する分画において、本明細書中での加水分解反応において分画を使用する前に、このような1つ以上のgtf酵素が不活性化（例えば熱不活性化）されることが好ましい。

10

20

30

【0120】

グルカン合成反応におけるスクロースの重合を介して生成される糖副産物の厳密分布は、使用される反応条件およびgtf酵素、特に温度およびスクロース濃度に基づいて変動し得ることを理解されたい。グルカン合成反応の分画中の糖の厳密な組成は開示される加水分解プロセスに対して重要ではないことも理解されたい。一般に、スクロースの量が増加すると、ロイクロースおよびオリゴ糖の両方に対する反応の選択性が向上する。逆に、温度が上昇すると、ロイクロースに対する反応の選択性が低下する傾向があり、一方でオリゴ糖に対する選択性は大きく影響を受けない。糖と水との比率、すなわち総溶液重量に対して糖の質量を除することによって計算されるwt%乾燥固体（DS）は、好ましくは真空中で50を下回る温度で水を蒸発させるか、または水を添加するかの何れかによって、グルカン合成反応の分画における糖の相対分布に顕著な影響を与えずに調整し得ることも理解されたい。gtf酵素に対する活性範囲を下回るようにpHを低下させることによるかまたはgtf酵素の熱不活性化によるかの何れかで（グルカンへの）完全な変換が達成される前にgtf反応を停止させることによって、分画中のスクロースのパーセンテージを上昇させることも可能である。

【0121】

ある一定の実施形態において、本明細書中のグルカン合成反応は、1つ以上の可溶性アルファ - グルカン生成物を生成させることができる。可溶性アルファ - グルカン生成物（あるいは「可溶性纖維」）は、（i）グルコシルトランスフェラーゼの直接生成物、または（ii）1つ以上のアルファ - 1, 3 - グリコシド結合もしくは1つ以上のアルファ - 1, 6 - グリコシド結合を有するグルカンポリマーを加水分解することが可能なグルコシルトランスフェラーゼおよびアルファ - グルカノヒドロラーゼの両方の協奏作用の生成物であり得る。

40

【0122】

本明細書中の可溶性アルファ - グルカンは、例えば次のものを含み得る：

- a) 少なくとも75%のアルファ - 1, 3 - グリコシド結合；
- b) 25%未満のアルファ - 1, 6 - グリコシド結合；
- c) 10%未満のアルファ - 1, 3, 6 - グリコシド結合；

50

- d) 5 0 0 0 ダルトン未満の M_w ;
- e) 2 0 の水中 1 2 w t % で 0 . 2 5 パスカル秒 (Pa · s) 未満の粘度 ;
- f) 4 ~ 4 0 の範囲のデキストロース当量 (D E) ;
- g) Association of Analytical Communities (AAC) 法 2 0 0 9 . 0 1 により測定した場合の 1 0 % 未満の消化性 ;
- h) 2 5 で pH 7 の水中少なくとも 2 0 % (w / w) の溶解度 ; および
- i) 5 未満の多分散指標 (PDI) 。

【 0 1 2 3 】

このような可溶性アルファ - グルカンは、米国特許出願第 6 2 / 0 0 4 , 2 9 0 号明細書で開示されるように生成させることができる。

10

【 0 1 2 4 】

例として、可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、少なくとも 7 5 % 、好ましくは少なくとも 8 0 % 、より好ましくは少なくとも 8 5 % 、さらにより好ましくは少なくとも 9 0 % 、最も好ましくは少なくとも 9 5 % のアルファ - (1 , 3) グリコシド結合を含み得る。

【 0 1 2 5 】

別の例として、上記のアルファ - (1 , 3) グリコシド結合実施形態に加えて、可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、 2 5 % 未満、好ましくは 1 0 % 未満、より好ましくは 5 % 以下、さらにより好ましくは 1 % 未満のアルファ - (1 , 6) グリコシド結合をさらに含み得る。

20

【 0 1 2 6 】

別の例として、上記のアルファ - (1 , 3) およびアルファ - (1 , 6) グリコシド結合含量の実施形態に加えて、可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、 1 0 % 未満、好ましくは 5 % 未満、最も好ましくは 2 . 5 % 未満のアルファ - (1 , 3 , 6) グリコシド結合をさらに含み得る。

【 0 1 2 7 】

別の例として、可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、 9 3 ~ 9 7 % アルファ - (1 , 3) グリコシド結合および 3 % 未満のアルファ - (1 , 6) グリコシド結合を含み得、 3 ~ 7 の DP の混合物に対応する重量平均分子量を有する。さらなる実施形態において、可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、約 9 5 % のアルファ - (1 , 3) グリコシド結合および約 1 % のアルファ - (1 , 6) グリコシド結合を含み得、 3 ~ 7 の DP の混合物に対応する重量平均分子量を有する。上記実施形態のさらなる態様において、可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、 1 ~ 3 % のアルファ - (1 , 3 , 6) 結合または好ましくは約 2 % のアルファ - (1 , 3 , 6) 結合をさらに含み得る。

30

【 0 1 2 8 】

別の例として、上述のグリコシド結合含量の実施形態に加えて、可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、 5 % 未満、好ましくは 1 % 未満、最も好ましくは 0 . 5 % 未満のアルファ - (1 , 4) グリコシド結合をさらに含み得る。

【 0 1 2 9 】

別の例として、上述のグリコシド結合含量の実施形態に加えて、可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、 5 0 0 0 ダルトン未満、好ましくは 2 5 0 0 ダルトン未満、より好ましくは 5 0 0 ~ 2 5 0 0 ダルトン、最も好ましくは約 5 0 0 ~ 約 2 0 0 0 ダルトンの重量平均分子量 (M_w) を含み得る。

40

【 0 1 3 0 】

別の例として、上記特性の何れかに加えて、可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、 2 0 の水中 1 2 w t % で、 2 5 0 センチポアズ (0 . 2 5 Pa · s) 未満、好ましくは 1 0 cP (0 . 0 1 Pa · s) 未満、好ましくは 7 cP (0 . 0 0 7 Pa · s) 未満、より好ましくは 5 cP (0 . 0 0 5 Pa · s) 未満、より好ましくは 4 cP (0 . 0 0 4 Pa · s) 未満、最も好ましくは 3 cP (0 . 0 0 3 Pa · s) 未満の粘度を含み得る。

【 0 1 3 1 】

可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、ある一定の実施形態において、 A s s o c i a

50

tion of Analytical Communities (AOAC) 法 2009.01 により測定した場合の 10% 未満の消化性、または好ましくは 9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2% または 1% 未満の消化性を有し得る。別の態様において、消化性の相対レベルは、あるいは AOAC 2011.25 (Integrated Total Dietary Fiber Assay) (McCleary et al., 2012, J. AOAC Int., 95(3), 824-844) を用いて決定され得る。

【0132】

上記実施形態の何れかに加えて、可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、25 で pH 7 の水中、少なくとも 20% (w/w)、好ましくは少なくとも 30%、40%、50%、60% または 70% の溶解度を有し得る。 10

【0133】

一実施形態において、可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、10 wt % 未満、好ましくは 5 wt % 未満、最も好ましくは 1 wt % 以下の還元糖含量を含み得る。

【0134】

一実施形態において、可溶性アルファ - グルカン纖維組成物は、4 kcal/g 未満、好ましくは 3 kcal/g 未満、より好ましくは 2.5 kcal/g 未満、最も好ましくは約 2 kcal/g 以下のカロリー含量を含み得る。

【0135】

別の例として、本明細書中での可溶性アルファ - グルカンは、次のものを含み得る： 20

- a) 10% ~ 30% のアルファ - 1, 3 - グリコシド結合；
- b) 65% ~ 87% のアルファ - 1, 6 - グリコシド結合；
- c) 5% 未満のアルファ - 1, 3, 6 - グリコシド結合；
- d) 5000 ダルトン未満の重量平均分子量 (M_w)；
- e) 20 の水中 12 wt % で 0.25 パスカル秒 (Pa·s) 未満の粘度；
- f) 4 ~ 40、好ましくは 10 ~ 40 の範囲のデキストロース当量 (DE)；
- g) Association of Analytical Communities (AOAC) 法 2009.01 により測定した場合の 10% 未満の消化性；
- h) 25 で pH 7 の水中、少なくとも 20% (w/w) の溶解度；および
- i) 5 未満の多分散指標 (PDI)。 30

【0136】

このような可溶性アルファ - グルカンは、米国特許出願第 62/004,308 号明細書で開示されるように生成させることができる。

【0137】

別の例として、本明細書中での可溶性アルファ - グルカンは、次のものを含み得る：

- a) 25 ~ 35 のアルファ - 1, 3 - グリコシド結合；
- b) 55 ~ 75% のアルファ - 1, 6 - グリコシド結合；
- c) 5 ~ 15% のアルファ - 1, 3, 6 - グリコシド結合；
- d) 5000 ダルトン未満の重量平均分子量；
- e) 20 の水中 12 wt % で 0.25 パスカル秒 (Pa·s) 未満の粘度； 40
- f) 4 ~ 40 の範囲のデキストロース当量 (DE)；
- g) Association of Analytical Communities (AOAC) 法 2009.01 により測定した場合の 10% 未満の消化性；
- h) 25 で水中、少なくとも 20% (w/w) の溶解度；および
- i) 5 未満の多分散指標。

【0138】

このような可溶性アルファ - グルカンは、米国特許出願第 62/004,312 号明細書で開示されるように生成させることができる。

【0139】

別の例として、本明細書中での可溶性アルファ - グルカンは、次のものを含み得る：

10

20

30

40

50

- a) 少なくとも 9 5 % のアルファ - 1 , 6 - グリコシド結合 ;
- b) 1 % 以下のアルファ - 1 , 3 - グリコシド結合 ;
- c) 2 % 未満のアルファ - 1 , 3 , 6 - グリコシド結合 ;
- d) 1 . 5 % 未満のアルファ - 1 , 4 - グリコシド結合 ;
- e) 2 0 0 0 0 ダルトン未満の重量平均分子量 ;
- f) 2 0 の水中 1 2 w t % で 0 . 2 5 パスカル秒 (P a · s) 未満の粘度 ;
- g) 1 ~ 3 0 の範囲のデキストロース当量 (D E) ;
- h) A s s o c i a t i o n o f A n a l y t i c a l C o m m u n i t i e s (A O A C) 法 2 0 0 9 . 0 1 により測定した場合の 1 0 % 未満の消化性 ;
- i) 2 5 で pH 7 の水中、少なくとも 2 0 % (w / w) の溶解度 ; および
- j) 5 未満の多分散指標。

【 0 1 4 0 】

このような可溶性アルファ - グルカンは、米国特許出願第 6 2 / 0 0 4 , 3 1 4 号明細書で開示されるように生成させることができる。

【 0 1 4 1 】

別の例として、本明細書中での可溶性アルファ - グルカンは、次のものを含み得る :

- a) 一連の、
- i) 1 % ~ 5 0 % のアルファ - 1 , 3 - グリコシド結合 ; または
- i i) 1 0 % より大きいが 4 0 % 未満のアルファ - 1 , 4 - グリコシド結合 ; または
- i i i) i) および i i) の何らかの組み合わせ ;
- b) 1 ~ 5 0 % のアルファ - 1 , 2 - グリコシド結合 ;
- c) 0 ~ 2 5 % のアルファ - 1 , 3 , 6 - グリコシド結合 ;
- d) 9 8 % 未満のアルファ - 1 , 6 - グリコシド結合 ;
- e) 3 0 0 k D a 未満の重量平均分子量 ;
- f) 2 0 の水中 1 2 w t % で 0 . 2 5 パスカル秒 (P a · s) 未満の粘度 ;
- g) A s s o c i a t i o n o f A n a l y t i c a l C o m m u n i t i e s (A O A C) 法 2 0 0 9 . 0 1 により測定した場合の 2 0 % 未満の消化性 ;
- h) 2 5 で pH 7 の水中、少なくとも 2 0 % (w / w) の溶解度 ; および
- i) 2 6 未満、好ましくは 5 未満の多分散指標。

【 0 1 4 2 】

このような可溶性アルファ - グルカンは、米国特許出願第 6 2 / 0 0 4 , 3 0 5 号明細書で開示されるように生成させることができる。

【 0 1 4 3 】

ある一定の実施形態において、可溶性アルファ - グルカンはグルコシルトランスフェラーゼの直接生成物である。このようなグルコシルトランスフェラーゼおよび適切なグルカン合成反応におけるその使用のための条件は、本明細書中で開示されるとおりであり得るか、または例えば米国特許出願第 6 2 / 0 0 4 , 2 9 0 号明細書、同第 6 2 / 0 0 4 , 3 0 8 号明細書、同第 6 2 / 0 0 4 , 3 1 2 号明細書、同第 6 2 / 0 0 4 , 3 1 4 号明細書および/または同第 6 2 / 0 0 4 , 3 0 5 号明細書の何れかで開示されるとおりであり得る。

【 0 1 4 4 】

可溶性アルファ - グルカンは、あるいは、例えば 1 つ以上のアルファ - 1 , 3 - グリコシド結合または 1 つ以上のアルファ - 1 , 6 - グリコシド結合を有するグルカンポリマーを加水分解可能なグルコシルトランスフェラーゼおよびアルファ - グルカノヒドロラーゼの両方の協奏作用の生成物であり得る。いくつかの態様において、可溶性アルファ - グルカン生成物を生成させるためのグルカン合成反応は、少なくとも 1 つのグルコシルトランスフェラーゼおよび少なくとも 1 つのアルファ - グルカノヒドロラーゼの両方を含み得る。他の態様において、グルカン合成反応は、最初に、唯一の酵素成分として 1 つ以上のグルコシルトランスフェラーゼを含み得る。このような反応は、アルファ - グルカノヒドロラーゼによる修飾に未だ供されていない第一のアルファ - グルカン生成物を生成させる。そして、可溶性アルファ - グルカン生成物に対する第一の生成物の修飾を可能にするのに適

10

20

30

40

50

切な時間にわたり、少なくとも 1 つのアルファ - グルカノヒドロラーゼを反応に添加する。このように、グルコシルトランスフェラーゼおよびアルファ - グルカノヒドロラーゼの両方の協奏作用を通じて可溶性アルファ - グルカン生成物を合成するための様々な方法がある。グルカン合成反応中および / またはグルカン合成後に 1 つ以上のアルファ - グルカノヒドロラーゼ酵素が含まれるグルカン合成反応を行うための条件は、本明細書中で開示されるとおりであり得るか、または例えば米国特許出願第 6 2 / 0 0 4 , 2 9 0 号明細書、同第 6 2 / 0 0 4 , 3 0 8 号明細書、同第 6 2 / 0 0 4 , 3 1 2 号明細書、同第 6 2 / 0 0 4 , 3 1 4 号明細書および / または同第 6 2 / 0 0 4 , 3 0 5 号明細書の何れかで開示されるとおりであり得る。

【 0 1 4 5 】

本明細書中でのアルファ - グルカノヒドロラーゼは、例えばデキストラナーゼ（アルファ - 1 , 6 - 結合グリコシド結合を加水分解可能； E . C . 3 . 2 . 1 . 1 1 ）、ムタナーゼ（アルファ - 1 , 3 - 結合グリコシド結合を加水分解可能； E . C . 3 . 2 . 1 . 5 9 ）、ミコデキストラナーゼ（（ 1 - 3 ） - および（ 1 - 4 ） - 結合の両方を含有するアルファ - D - グルカン中の（ 1 - 4 ） - アルファ - D - グルコシド結合をエンド型加水分解可能； E C 3 . 2 . 1 . 6 1 ）、グルカン 1 , 6 - アルファ - グルコシダーゼ（ E C 3 . 2 . 1 . 7 0 ）およびアルテルナーゼ（アルテルナンをエンド型加水分解性に切断可能； E . C . 3 . 2 . 1 . - ；米国特許第 5 7 8 6 1 9 6 号明細書を参照）であり得る。

【 0 1 4 6 】

配列番号 4 7 を含むムタナーゼは、ある一定の態様において使用することができる。あるいは、ムタナーゼは、配列番号 4 7 と少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含み得、例えばムタナーゼ活性を有し得る。

【 0 1 4 7 】

1 つ以上の可溶性アルファ - グルカン生成物を生成させるための今回開示されるようなグルカン合成反応は、アルファ - 1 , 5 グルコシル - フルクトース結合を加水分解するためにアルファ - グルコシダーゼを使用する、本明細書中での加水分解反応を行うための適切な条件として直接役立ち得る。このような加水分解は、例えばポリアルファ - 1 , 3 - グルカンを生成させるグルカン合成反応の加水分解処理に関して上記で開示される条件の何れかに従い行うことができる。あるいは、1 つ以上の可溶性アルファ - グルカン生成物を生成させるためのグルカン合成反応の分画（例えばクロマトグラフィー分画）は、アルファ - 1 , 5 グルコシル - フルクトース結合のアルファ - グルコシダーゼ介在性の加水分解を行うための適切な条件として使用することができる。

【 0 1 4 8 】

分画は、本明細書中のある一定の実施形態において、グルカン合成反応のクロマトグラフィー分画であり得る。例えば、分画は、本明細書中で開示されるような 1 つ以上の可溶性アルファ - グルカン生成物を生成させるグルカン合成反応のクロマトグラフィー分画であり得る。このような反応は、任意選択により、グルカン合成中および / またはグルカン合成完了後に 1 つ以上のアルファ - グルカノヒドロラーゼを含み得る。実施形態のこれらのタイプの何れかでの分画は、一般的に、それが生成された反応組成物からの可溶性アルファ - グルカン生成物の全てまたは殆ど（例えば少なくとも約 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % ）を分離する目的で得られてきた。可溶性アルファ - グルカン生成物の全てまたは殆どから分離したら、1 つ以上のアルファ - グルカナーゼを用いて、分画を本明細書中で開示されるアルファ - 1 , 5 グルコシル - フルクトース加水分解プロセスの何れかに供することができる。

【 0 1 4 9 】

本明細書中でのクロマトグラフィー分画は一般に、適切なタイプの液体クロマトグラフィーを用いて得ることができる。液体クロマトグラフィーは、例えばサイズ排除クロマトグラフィー（ S E C ）、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（ H P L C ）、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、限外ろ過、

10

20

30

40

50

精密ろ過または透析を用いて行うことができる。

【0150】

開示される本発明はまた、糖をアルファ - グルコシダーゼ（例えば、トランスグルコシダーゼ）に接触させることによって生成される組成物にも関し、ここで、(i) 糖は、少なくとも 1 つのアルファ - 1, 3 またはアルファ - 1, 6 グルコシル - グルコース結合を含む二糖またはオリゴ糖であり、かつ(ii) アルファ - グルコシダーゼは、糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1, 3 またはアルファ - 1, 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解する。このようにして生成される組成物は、接触前に存在した糖の量と比較して減少した量の糖を含む。組成物の例としては、本明細書中で開示されるものの何れか、例えばグルカン合成反応からの加水分解ろ液または可溶性アルファ - グルカンを生成させるために使用したグルカン合成反応の加水分解分画が挙げられる。加水分解法に関して上記および実施例で開示される特性およびその生成物の何れも、組成物を特徴付け得る。組成物の次の特性は例である。

10

【0151】

アルファ - グルコシダーゼ酵素は、組成物のある一定の実施形態において、配列番号 5、6、8、9、11、12、14、15、17、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38 または DIAZYME RDF ULTRA (DuPont Industrial Biosciences) のアミノ酸配列と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一であるアミノ酸配列を含み得る。トランスグルコシダーゼは、組成物のある一定の実施形態において、配列番号 1 と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含み得る。あるいは、開示される組成物を生成させるために、本明細書中で開示されるアルファ - グルコシダーゼの何れかを使用することができる。

20

【0152】

組成物のある一定の実施形態における糖は、加水分解前の重合度が 3 ~ 7 である。

【0153】

本明細書中の加水分解法により生成される組成物は、例えば、アルファ - グルコシダーゼと糖を接触させる前に存在した糖の濃度の 50% 未満の糖の濃度を有し得る。

30

【0154】

本明細書中のある一定の実施形態における加水分解法により生成される組成物は、グルカン合成反応またはその分画であり得、グルカン合成反応の糖副産物をアルファ - グルコシダーゼと接触させる。この実施形態における分画は、グルカン合成反応のろ液または例えば可溶性アルファ - グルカンを生成させるために使用されるグルカン合成反応の分画であり得る。この実施形態における糖は、例えば加水分解前の重合度が 3 ~ 7 であり得る。

【0155】

今回開示される実施形態が、一部分において、さもなければ分解が困難であり得る二糖およびオリゴ糖を糖化するために有用であることが当業者によって理解されよう。この特性は、例えば(i) フルクトース濃縮および(ii) 発酵の促進方法を行うために利用することができる。

40

【0156】

下記の実施例 6 は、加水分解されなかったろ液を使用した場合と比較して、アルファ - グルコシダーゼ（トランスグルコシダーゼ）によって加水分解したグルカンろ液を使用した場合に、クロマトグラフィーによるフルクトース濃縮が促進されることを明らかにする。

【0157】

したがって、開示される本発明は、グルカン合成反応の分画に存在するフルクトースを濃縮する方法にさらにに関する。この方法は、(a) グルカン合成反応から得られる分画を適切な条件下でアルファ - グルコシダーゼ（例えば、トランスグルコシダーゼ）と接触させることであって、酵素が、分画内に含まれる二糖またはオリゴ糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1, 3 またはアルファ - 1, 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解する、接触させることと、(b) 工程(a) の分画のフルクトース濃度と比較してより高濃度のフル

50

クトースを有する組成物を得るために、工程 (a) の加水分解分画からフルクトースを分離することとを含む。

【0158】

例えばアルファ - グルコシダーゼ（例えばトランスグルコシダーゼ）酵素に関する開示されるフルクトース濃縮法の特性およびグルカン合成反応の分画は、これらの各特性について本明細書中で提供される開示の何れかに従い得る。

【0159】

フルクトースを分離する工程 (b) は、当技術分野で公知の何れかの手段により行うことができる。例えば、下記実施例で開示されるように、または参照により本明細書中に組み込まれる欧州特許公開欧州特許第 2292803B1 号明細書の開示に従うことによって、クロマトグラフィーを使用することができる。10

【0160】

開示される濃縮法から得られるフルクトース濃度がより高い組成物（例えば、フルクトース溶液またはフルクトースシロップ）は、少なくとも約 90、91、92、93、94、95、96、97、98 または 99 wt % フルクトースを有し得る。

【0161】

本明細書中のフルクトース濃縮法は、今回開示されるようなアルファ - グルコシダーゼで加水分解されていないろ液を使用するものよりも良好に行うことができる。このような性能向上は、少なくとも 40%、45% または 50% のパーセントフルクトース回収について測定することができる。20

【0162】

本開示は、(a) グルカン合成反応から得られる分画を適切な条件下でアルファ - グルコシダーゼ酵素（例えばトランスグルコシダーゼまたはグルコアミラーゼ）と接触させることであって、このアルファ - グルコシダーゼ酵素が、分画内に含まれる二糖またはオリゴ糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1,5 グルコシル - フルクトース結合で加水分解する、接触させることと、(b) 生成物を得るために微生物を用いて工程 (a) の分画を発酵させることと、(c) 任意選択により (b) の生成物を単離することとを含む、発酵方法にさらに関する。(b) の発酵工程は、工程 (a) の後または工程 (a) と同時に行うことができる。重要なこととして、この方法は、例えばグルカン合成反応の加水分解ろ液を発酵させることによってエタノールを生成させるために使用することができる。このようなプロセスからのエタノール収率は、加水分解されていないグルカンろ液を発酵させる場合に得られるエタノール収率よりも高い。30

【0163】

アルファ - グルコシダーゼ（例えば、トランスグルコシダーゼまたはグルコアミラーゼ）酵素に関する開示される発酵方法、二糖およびオリゴ糖、グルカン合成反応の分画および適切な接触条件の特性は、例えば、これらの各特性について本明細書中で提供される開示の何れかに従い得る。

【0164】

本明細書中の発酵方法での使用のための微生物は、例えば細菌、酵母または真菌であり得る。本明細書中で有用な細菌の例としては、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus species*)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus species*)、ビフィドバクテリウム属 (*Bifidobacterium species*)、ロイコノストック属 (*Leuconostoc species*)、エシェリキア属 (*Escherichia species*)（例えば大腸菌 (*E. coli*)）およびバチルス属 (*Bacillus species*) が挙げられる。本明細書中で有用な酵母の例としては、サッカロミセス属 (*Saccharomyces species*)、例えば *S. cerevisiae* および *S. bayanus* などが挙げられる。40

【0165】

本明細書中の発酵方法は、エタノールまたは酸（例えば乳酸）などの生成物を生じさせ

10

20

30

40

50

得る。しかし、必要に応じて他の生成物を產生させることができると考えられる。開示されるような発酵方法を用いたある種の生成物の產生が、発酵で使用される微生物などの様々な条件に依存することは、当業者により理解されよう。本明細書中での発酵のための条件は、下記実施例で開示されるとおり、または例えば、両方とも参照により本明細書中に組み込まれる、El - Mansi et al. (2006, Fermentation Microbiology and Biotechnology, Second Edition, CRC Press) および Stanbury et al. (1999, Principles of Fermentation Technology, Second Edition, Butterworth - Heinemann) で開示されるとおりであり得る。

10

【0166】

本明細書中での発酵方法のある一定の実施形態における生成物の収率は、本明細書中でのアルファ - グルコシダーゼで加水分解されていないグルカンろ液を発酵させる場合に得られる生成物収率よりも高い。この比較は、例えばグルカン合成反応の非加水分解分画を使用した対照発酵に対するものであり得る。本明細書中での発酵の生成物収率は、例えば少なくとも約 10 %、20 %、40 %、60 %、80 % または 100 % (または 10 % ~ 100 % の何れかの整数値)、向上させることができる。さらに、本明細書中での発酵による生成物形成の速度を向上させることができる。

【0167】

下記の実施例 7 は、加水分解されていないグルカンろ液を含むフィードを提供された酵母によってロイクロースを発酵させてエタノールにし得ることを明らかにする。したがって、ロイクロースを発酵させて生成物 (例えばエタノール) を生成させるために微生物を用いる方法が本明細書中でさらに開示される。このような方法は、本明細書中で開示されるようなアルファ - グルコシダーゼで (i) 加水分解されているかまたは (ii) 加水分解されていないグルカンろ液を発酵させることを含み得る。グルカンろ液中でまたは別の形態 (例えば半精製または濃縮形態) でロイクロースが提供されるか否かにかかわらず、ロイクロースを発酵させるための方法は、ロイクロースを使用するために微生物 (例えば酵母、例えば S. cerevisiae)などを順応させることを含み得る。このような順応は、例えば、少なくとも 2 または 3 回の増殖サイクルにわたり、ロイクロースおよび任意選択により他の糖の存在下で微生物を増殖させ、その後、生成物を発酵させるために微生物がより多くのロイクロースを使用することを含み得る。ある一定の実施形態において、微生物は、(i) ロイクロースを含む第一のフィード中で増殖させ (1 サイクル完了)、(ii) 第一のフィードから回収し、(iii) ロイクロースを含む第二のフィード中で増殖させ (2 回のサイクル完了)、(iv) 任意選択により第二のフィードから除去し、および (v) 任意選択により第三のフィード中で増殖させ得る (3 回のサイクル完了)。このように順応させた微生物は、ある一定の実施形態におけるロイスクロース発酵能が向上し得る。

20

30

【0168】

下記実施例 9 は、同時に酵母で発酵させながら、グルカンろ液がトランスクルコシダーゼで加水分解される場合、酵母による発酵に対してグルカンろ液中に存在する殆ど全て (例えば > 98 % または > 99 %) のロイクロースを使用し得ることを明らかにする。したがって、本明細書中のロイクロース発酵方法の促進は、微生物でロイクロースを発酵させながら同時にアルファ - グルコシダーゼ (例えばトランスクルコシダーゼまたはグルコアミラーゼ) でロイクロースを加水分解することを含み得る。

40

【0169】

本明細書中で開示される組成物および方法の非限定例は次のものを含む：

- 少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を含む糖においてアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解する方法であって、糖が二糖またはオリゴ糖であり、方法が、適切な条件下で糖をアルファ - グルコシダーゼ酵素と接触させることを含み、アルファ - グルコシダ

50

ーゼ酵素が、糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシリ - グルコース結合を加水分解し、糖の量が、接触前に存在した糖の量と比較して減少している、方法。

- 2 . アルファ - グルコシダーゼ酵素が固定化されている、実施形態 1 に記載の方法。
- 3 . 加水分解前の糖の重合度が 3 ~ 7 である、実施形態 1 または 2 に記載の方法。
- 4 . 接触工程後の糖の濃度が、接触前に存在した糖類の濃度の 50 % 未満である、実施形態 1 、 2 または 3 に記載の方法。

5 . 適切な条件が、

(i) グルカン合成反応、または (i i) グルカン合成反応から得られる分画を含み、糖がグルカン合成反応の副産物である、実施形態 1 、 2 、 3 または 4 に記載の方法。 10

6 . グルカン合成反応が、少なくとも 1 つの不溶性アルファ - グルカン生成物を生成させる、実施形態 5 に記載の方法。

7 . 分画がグルカン合成反応のろ液である、実施形態 6 に記載の方法。

8 . グルカン合成反応が、

(i) グルコシルトランスフェラーゼの生成物、または

(i i) 1 つ以上のアルファ - 1 , 3 - グリコシド結合または 1 つ以上のアルファ - 1 , 6 - グリコシド結合を有するグルカンポリマーを加水分解することが可能なグルコシルトランスフェラーゼおよびアルファ - グルカノヒドロラーゼの両方の協奏作用の生成物である、少なくとも 1 つの可溶性アルファ - グルカン生成物を生成させる、実施形態 5 に記載の方法。 20

9 . 分画がグルカン合成反応のクロマトグラフィー分画である、実施形態 8 に記載の方法。

10 . アルファ - グルコシダーゼ酵素がトランスグルコシダーゼである、実施形態 1 ~ 9 の何れか 1 つに記載の方法。

11 . 糖をアルファ - グルコシダーゼ酵素と接触させることにより生成される組成物であって、糖が二糖またはオリゴ糖であり、かつ少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシリ - グルコース結合を含み、酵素が、糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシリ - グルコース結合を加水分解し、組成物が、接触前に存在した糖の量と比較して減少した量の糖を含む、組成物。

12 . 加水分解前の糖の重合度が 3 ~ 7 である、実施形態 11 に記載の組成物。

13 . 糖が (i) グルカン合成反応、または (i i) グルカン合成反応から得られる分画にあり、糖がグルカン合成反応の副産物である、実施形態 11 または 12 に記載の組成物。 30

14 . グルカン合成反応の分画に存在するフルクトースを濃縮する方法であって、

(a) グルカン合成反応から得られる分画を適切な条件下でアルファ - グルコシダーゼ酵素と接触させることであって、アルファ - グルコシダーゼ酵素が、分画内に含まれる二糖またはオリゴ糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシリ - グルコース結合を加水分解する、接触させることと、

(b) 工程 (a) の分画のフルクトース濃度と比較してより高いフルクトース濃度を有する組成物を得るために、工程 (a) の加水分解分画からフルクトースを分離することとを含む、方法。

15 . (a) グルカン合成反応から得られる分画を適切な条件下でアルファ - グルコシダーゼ酵素と接触させることであって、アルファ - グルコシダーゼ酵素が、分画内に含まれる二糖またはオリゴ糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシリ - グルコース結合を加水分解する、接触させることと、 40

(b) 生成物を得るために微生物を用いて工程 (a) の分画を発酵させることであって、発酵が、工程 (a) の後または工程 (a) と同時に行われる、発酵させることと、

(c) 任意選択により (b) の生成物を単離することと

を含み、(b) の生成物の収率が、アルファ - グルコシダーゼ酵素と接触していないグルカン合成反応の分画を発酵させる生成物収率と比較して上昇している、発酵方法。

【実施例】

【 0 1 7 0 】

開示される本発明は、次の実施例でさらに定義される。これらの実施例は、本発明のある一定の好ましい態様を示しながら、単なる説明のために与えられることを理解されたい。上記の考察およびこれらの実施例から、当業者は、本発明の基本的な特徴を確かめることができ、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な使用および条件にそれを順応させるために本発明の様々な変更形態および改変形態をなし得る。

【0171】

略語

本明細書中で使用される略語の一部の意味は次のとおりである：「g」はグラムを意味し、「h」は時間を意味し、「m L」はミリリットルを意味し、「psi」はポンド／平方インチを意味し、「wt %」は重量パーセントを意味し、「μm」はマイクロメートルを意味し、「%」はパーセントを意味し、「」は摂氏温度を意味し、「mg」はミリグラムを意味し、「mm」はミリメートルを意味し、「mL / 分」はミリリットル／分を意味し、「m」はメートルを意味し、「μL」はマイクロリットルを意味し、「mmol」はミリモルを意味し、「min」は分を意味し、「mol %」はモルパーセントを意味し、「M」はモル濃度を意味し、「mg / g」はミリグラム／グラムを意味し、「rpm」は1分間あたりの回転数を意味し、「MPa」はメガパスカルを意味する。

10

【0172】

一般的方法

別段の断りがない限り、試薬は全てSigma - Aldrich (St. Louis, MO) から得た。スクロースはVWR (Radnor, PA) から得た。

20

【0173】

グルコシルトランスフェラーゼ (gtf) 酵素の粗製抽出物の調製

イソプロピルベータ-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) 誘導発現系を用いて、大腸菌 (*E. coli*) 株DH10Bにおいてストレプトコッカス・サリバリウス (*streptococcus salivarius*) gtfJ酵素 (配列番号3) を発現させた。配列番号3は、GENBANK認識番号47527の*S. salivarius* gtfJアミノ酸配列と比較するとN末端に42個の残基欠失があるが、開始メチオニンを含む。簡潔に述べると、大腸菌 (*E. coli*) においてgtfJ酵素を発現させるためにコドン最適化されたDNA配列から配列番号3を発現させるために、大腸菌 (*E. coli*) DH10B細胞を形質転換した。このDNA配列は、発現ベクター、pJexpress404 (登録商標) (DNA 2.0, Menlo Park CA) 中に含有された。形質転換細胞をLB培地 (10g/Lトリプトン; 5g/L酵母抽出物、10g/L NaCl) 中で0.025の初期光学密度 (600nmでのOD) になるように接種し、250rpmで振盪させながらインキュベーター中で37℃で増殖させた。培養物のOD600が0.8~1.0に到達したら、1mM IPTGを添加することによって、培養物に対して誘導を行った。誘導した培養物を振盪器に置き、誘導後3時間で回収した。

30

【0174】

Eppendorf (登録商標) 遠心機において培養細胞を遠心 (25000 rpm) することによって、GtfJ酵素 (配列番号3) を回収し、5.0mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で細胞を再懸濁し、氷上で4℃に冷却した。0.1mMシリカビーズとともにビーズビーターを用いて細胞を破壊し、次いで4℃で16000 rpmで遠心して、破壊されていない細胞および細胞残屑をペレット化した。粗製抽出物 (可溶性GtfJ酵素、配列番号3を含有) をペレットから分離し、タンパク質濃度 (mg/mL) を決定するためにプラッドフォードタンパク質アッセイによって分析した。

40

【0175】

ストレプトコッカス属 (*streptococcus sp.*) C150gtf-S酵素 (配列番号40) を次のように調製した。SG1184は、ストレプトコッカス属 (*streptococcus sp.*) C150 (GENBANK (登録商標) GI:321278321) からのグリコシルトランスフェラーゼGtf-Sの短縮型 ('GTF04

50

59」)を発現するバチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)発現株である。大腸菌(*E. coli*)発現プラスミドpMP79からのN末端短縮タンパク質GTF0459(配列番号42)をコードする遺伝子(配列番号41)をaprEプロモーター下のバチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)組み込み発現プラスミドp4JHのNheIおよびHindIII部位にクローニングし、ベクター上でB.サブチリス(*B. subtilis*)AprEシグナルペプチドと融合させた。コンストラクトを最初に大腸菌(*E. coli*)DH10Bに形質転換し、アンピシリン(100g/mL)入りのLBプレート上で選択した。次いで、9個のプロテアーゼ欠失(*amyE*:*xylRPxy1AcomK-ermC*, *degUHy32*, *oppA*, *spoIE3501*, *aprE*, *nprE*, *epr*, *ispA*, *bpr*, *vpr*, *wprA*, *mprybfJ*, *nprB*)を含有するB.サブチリス(*B. subtilis*)BG6006に、GTF0459を発現する、確認されたコンストラクトpDCQ984を形質転換し、クロラムフェニコール(5μg/mL)入りのLBプレート上で選択した。5μg/mLクロラムフェニコール入りのLBプレート上で増殖させたコロニーを25μg/mLクロラムフェニコール入りのLBプレート上に数回画線した。得られたB.サブチリス(*B. subtilis*)発現株、SG1184を最初に25μg/mLクロラムフェニコールを含有するLB培地で増殖させ、次いで25μg/mLクロラムフェニコール入りのGrantsII培地に継代培養し、30で2~3日間増殖させた。培養物を4で30分間、15,000gで回転させ、0.22μmフィルターに通して上清をろ過した。ろ過した上清を分注し、-80で凍結させた。

【0176】

従来の流加発酵によって、GTF0459(配列番号42)を発現するB.サブチリス(*B. subtilis*)SG1184株を有酸素の液内条件下で増殖させた。0~0.25%コーンスティープ固体物(*corn steep solid*)(Roquette)、5~25g/Lリン酸ナトリウムおよびカリウム、0.3~0.6M硫酸第一鉄の溶液、塩化マンガンおよび塩化カルシウム、0.5~4g/L硫酸マグネシウムおよび0.01~3.7g/L硫酸亜鉛の溶液、硫酸銅(I)、ホウ酸およびクエン酸を含有する栄養培地を使用した。泡形成を調節するために2~4mL/Lで消泡剤、FOAMB LAST 882を添加した。バッチ中の初期グルコースが検出不可能であった場合、10L発酵に50%(w/w)グルコースフィードを与えた。グルコースフィード速度を数時間にわたり徐々に変化させた。30および20%D Oで、かつ750rpmの初期攪拌で発酵を調節した。50%(v/v)水酸化アンモニウムを用いてpHを7.2に調節した。2日間の発酵実施全体にわたり、pH、温度、気流およびD O%などの発酵パラメーターを監視した。発酵実施の最後に培養プロセスを回収し、遠心して上清を得た。次いで、GTF0459(配列番号42)を含有する上清を-80で凍結保存した。

【0177】

S.ミュータンス(*S. mutans*)MT-4239gtf-C酵素(配列番号43)を次のように調製した。バチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)での発現のために最適化されたコドンを使用して、GENBANK(登録商標)でGI:3130088(配列番号43; S.ミュータンス(*S. mutans*)MT-4239からのgtf-C)として同定されるグルコシルトランスクレオチド(ktf)酵素の短縮型をコードする遺伝子を合成し、GenScriptによって合成した。N末端短縮化およびC末端T1短縮化を有するGTF0088Bst1(配列番号45)をコードする遺伝子(配列番号44)をGENSCRIPTプラスミドから増幅させ、aprEプロモーター下のバチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)組み込み発現プラスミドp4JHのNheIおよびHindIII部位にクローニングし、ベクター上でB.サブチリス(*B. subtilis*)AprEシグナルペプチドと融合させた。コンストラクトを最初に大腸菌(*E. coli*)DH10Bに形質転換し、アンピシリン(100μg/mL)入りのLB上で選択した。次いで、9個のプロテアーゼ欠失(*amyE*:*xylRPxy1AcomK-ermC*, *degUHy32*, *oppA*, *spo*

10

20

30

40

50

I I E 3 5 0 1、ap r E、n p r E、e p r、i s p A、b p r、v p r、w p r A、m p r - y b f J、n p r B)を含有するB.サブチリス(B. subtilis)BG 6 0 0 6にG T F 0 0 8 8 B s T 1を発現する、確認されたコンストラクトp D C Q 1 0 2 1を形質転換し、クロラムフェニコール(5 μg / mL)入りのLBプレート上で選択した。5 μg / mLクロラムフェニコール入りのLBプレート上で増殖させたコロニーを25 μg / mLクロラムフェニコール入りのLBプレート上に数回画線した。得られたB.サブチリス(B. subtilis)発現株SG 1 2 2 1を最初に25 μg / mLクロラムフェニコール入りのLB培地で増殖させ、次いで25 μg / mLクロラムフェニコールを含有するGrants II培地に継代培養し、30で2~3日間増殖させた。培養物を4で30分間、15,000 gで回転させ、0.22 μmフィルターに通して上清をろ過した。ろ過した上清を分注し、-80で凍結させた。

【0178】

従来の流加発酵によって、G T F 0 0 8 8 B s T 1(配列番号45)を発現するB.サブチリス(B. subtilis)SG 1 2 2 1株を有酸素の液内条件下で増殖させた。0~0.25%コーンスティープ固体物(Roquette)、5~25 g / Lリン酸ナトリウムおよびカリウム、0.3~0.6 M硫酸第一鉄の溶液、塩化マンガンおよび塩化カルシウム、0.5~4 g / L硫酸マグネシウムおよび0.01~3.7 g / L硫酸亜鉛の溶液、硫酸銅(I)、ホウ酸およびクエン酸を含有する栄養培地を使用した。泡形成を調節するために2~4 mL / Lで消泡剤、FOAMBLAST 882を添加した。バッヂ中の初期グルコースが検出不可能であった場合、2 L発酵に50% (w / w) グルコースフィードを与えた。グルコースフィード速度を数時間にわたり徐々に変化させた。30および20% DOで、かつ400 rpmの初期搅拌で発酵を調節した。50% (v / v) 水酸化アンモニウムを用いてpHを7.2に調節した。2日間の発酵実施全体にわたり、pH、温度、気流およびDO%などの発酵パラメーターを監視した。発酵実施の最後に培養プロセスを回収し、遠心して上清を得た。次いで、G T F 0 8 8 B s T 1(配列番号45)を含有する上清を-80で凍結保存した。

【0179】

グルコシルトランスクレオダーゼG T F 0 4 5 9およびG T F 0 0 8 8 B s T 1活性の決定25 g / Lデキストラン(MW 約1500、Sigma-Aldrich, Cat. # 31394)の存在下または非存在下で、37および125 rpmオービタル振盪で、pH 5.5の25 mMまたは50 mM酢酸ナトリウム緩衝液中の200 g / LスクロースとともにG T F 酵素を含有する1~10% (v / v) 粗製タンパク質抽出物を温置することによって、グルコシルトランスクレオダーゼ活性アッセイを行った。反応混合物の1アリコートを1時間、2時間および3時間の時点で採取し、90で5分間加熱してG T Fを不活性化させた。13,000 × gで5分間の遠心によって不溶性物質を除去し、続いて0.2 μm RC(再生セルロース)膜に通してろ過した。85で2本のAMINEX HPX-87Cカラムシリーズ(Bio-Rad, Hercules, CA)を使用して、HPLCによって、得られたろ液を分析して、スクロース濃度を定量した。各時点でのスクロース濃度を反応時間に対してプロットし、直線プロットの傾きから反応初速度を決定した。G T F活性1単位は、アッセイ条件下で1分間に1マイクロモルのスクロースを消費するために必要とされる酵素の量として定義した。

【0180】

アルファ-(1,3)-グルカノヒドロラーゼ(ムタナーゼ)の粗製抽出物の調製GENBANK(登録商標)においてGI:212533325として特定されるペニシリウム・マルネッフェイ(Penicillium marneffei)ATCC(登録商標)18224(商標)ムタナーゼをコードする遺伝子をGenScript(Piscataway, NJ)によって合成した。選択のためのアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)アセトアミダーゼを用いて、CBHIプロモーターおよびターミネーターの調節下で、トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)中の関心のある遺伝子を発現させるために設計されたベクターであるプラ

10

20

30

40

50

スミド p T r e x 3 に S a c I I および A s c I 制限部位に、タンパク質配列 (M U T 3 3 2 5 ; 配列番号 4 7) をコードするスクレオチド配列 (配列番号 4 6) をサブクローニングした。得られたプラスミドを T . リーゼイ (T . r e e s e i) に遺伝子銃注入によって形質転換した。遺伝子銃形質転換の詳細な方法は、参照により本明細書中に組み込まれる P C T 特許出願公開国際公開第 2 0 0 9 / 1 2 6 7 7 3 A 1 号パンフレットに記載されている。安定なクローン T R M 0 5 - 3 からの胞子がある 1 c m² 寒天プラグを使用して、產生培地 (下記) に接種した。28 および 220 rpm で 4 ~ 5 日間、振盪フラスコ中で培養物を増殖させた。分泌されたタンパク質を回収するために、4000 g で 10 分間の遠心によって細胞塊を最初に除去し、0.2 μm 滅菌フィルターに通して上清をろ過した。S D S - P A G E によってムタナーゼ M U T 3 3 2 5 (配列番号 4 7) の発現を確認した。

10

【 0 1 8 1 】

產生培地の成分を以下に列挙する。

【 0 1 8 2 】

【表 4 】

定められた NREL-T に富むラクトース

式	量	単位
硫酸アンモニウム	5	g
PIPPS	33	g
BD BACTO カサミノ酸	9	g
KH ₂ PO ₄	4.5	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.32	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	g
T.リーゼイ(T.reesei)微量元素	2.5	mL
NaOH ペレット	4.25	g
50%NaOH により pH を 5.5 に調整		
目標とする体積	920	mL
各アリコートに添加 : FOAMBLAST	5	滴
オートクレーブにかけ、次いで 20%ラクトースろ過滅菌	80	mL

20

30

【 0 1 8 3 】

【表 5 】

T.リーゼイ(T.reesei)微量元素

式	量	単位
クエン酸.H ₂ O	191.41	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	200	g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	16	g
CuSO ₄ .5H ₂ O	3.2	g
MnSO ₄ .H ₂ O	1.4	g
H ₃ BO ₃ (ホウ酸)	0.8	g
目標とする体積	1	L

40

【 0 1 8 4 】

M U T 3 3 2 5 発現株 T R M 0 5 - 3 の 1 . 0 m L 凍結胞子懸濁液を 2 L のバッフル付きフラスコ中で 0 . 5 L の最少培地に接種することによって、発酵種培養物を調製した (最

50

少培地は、5 g / L 硫酸アンモニウム、4.5 g / L 一塩基性リン酸カリウム、1.0 g / L 硫酸マグネシウム七水和物、14.4 g / L クエン酸無水物、1 g / L 塩化カルシウム二水和物、0.4375 g / L クエン酸を含む25 g / L グルコースおよび微量元素、0.5 g / L 硫酸第一鉄七水和物、0.04 g / L 硫酸亜鉛七水和物、0.008 g / L 硫酸銅五水和物、0.0035 g / L 硫酸マンガンー水和物および0.002 g / L ホウ酸から構成された。pHは5.5であった)。32 および170 rpmで48時間、培養物を増殖させ、その後、14 L 発酵槽中の8 L の產生培地に移した。產生培地は、75 g / L グルコース、4.5 g / L 一塩基性リン酸カリウム、0.6 g / L 塩化カルシウム無水物、1.0 g / L 硫酸マグネシウム七水和物、7.0 g / L 硫酸アンモニウム、0.5 g / L クエン酸無水物、0.5 g / L 硫酸第一鉄七水和物、0.04 g / L 硫酸亜鉛七水和物、0.00175 g / L 硫酸銅五水和物、0.0035 g / L 硫酸マンガンー水和物、0.002 g / L ホウ酸および0.3 mL / L FOAMBLAST 882 から構成された。

【0185】

グルコース上、34 、500 rpmで24時間、最初にバッチ増殖で発酵を行った。24時間の最後に、温度を28 に低下させ、攪拌速度を1000 rpmに上昇させた。次に、0.030 g グルコース - ソホロース 固形物 / g バイオマス / hr の特定のフィード速度で発酵槽にグルコースおよびソホロース(62% w/w)の混合物を入れた。発酵実施の終了時に、遠心によってバイオマスを除去し、10 kD 分子量カットオフ限外ろ過カラムトリッジ(UFP-10-E-35; GE Health care, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)を用いた限外ろ過によってMUT3325ムタナーゼ(配列番号47)を含有する上清を約10倍濃縮した。濃縮タンパク質を -80 で保存した。

【0186】

アルファ - グルカノヒドロラーゼ(ムタナーゼ)活性の決定

ストレプトコッカス・ソブリヌス(*Streptococcus sobrinus*) ATCC(登録商標)33478(商標)により產生された分泌酵素を用いて、ムタナーゼ活性を決定するために必要とされる不溶性ムタンポリマーを調製した。具体的に、*S. sobrinus* ATCC(登録商標)33478(商標)のグリセロール保存物の1ループをBHI寒天プレート(ブレインハートインキュージョン寒天、Teknova, Hollister, CA)上に画線し、37 で2日間プレートを温置した。ループを用いて数個のコロニーを拾い、Teknovaからのオリジナル培地ボトル中2×100mL BHI液体培地に接種し、培養物を37 で温置し、24時間にわたり静置した。得られた細胞を遠心によって除去し、得られた上清を0.2 μm 滅菌フィルターに通してろ過し；2×101mLのろ液を回収した。ろ液に2×11.2mLの200 g / L スクロースを添加した(最終スクロース20 g / L)。反応物を37 で攪拌せずに67時間温置した。得られた多糖ポリマーを5000×gで10分間の遠心によって回収した。上清を慎重にデカントした。不溶性ポリマーを40 mLの滅菌水で4回洗浄した。得られたムタンポリマーを48時間、凍結乾燥した。ムタンポリマー(390 mg)を39 mLの滅菌水中で懸濁して、10 mg / mL 懸濁液を得た。超音波処理によってムタン懸濁液をホモジエナイズした(大きい塊が消失するまで40%振幅。全部で約10分)。ホモジエナイズした懸濁液を分注し、4 で保存した。

【0187】

pH 5.5 の 25 mM KOAc 緩衝液中で 37 で適切な量の酵素を 0.5 mg / mL ムタンポリマー(上記のように調製)とともに温置することによって、ムタナーゼアッセイを開始した。様々な時間点で反応混合物のアリコートを採取し、等体積の 100 mM グリシン緩衝液(pH 10)で不活性化した。14,000 × g で 5 分間の遠心によって各不活性化試料中の不溶性物質を除去した。p - ヒドロキシ安息香酸ヒドラジド溶液(PAHBAH)アッセイ(Lever M., Anal. Biochem., (1972) 47: 273 - 279)によって、各時間点で生成したオリゴ糖および多糖ポリマーの還元

10

20

30

40

50

末端を定量し、タイムコースの最初の3または4つの時間点の直線プロットの傾きから、初速度を決定した。100 μLのPAHBAH希釈標準溶液に10 μLの反応試料上清を添加し、95℃で5分間加熱することによって、PAHBAHアッセイを行った。1部の試薬A(0.05 g/mL p-ヒドロキシ安息香酸ヒドラジドおよび5体積%の濃塩酸)および4部の試薬B(0.05 g/mL NaOH、0.2 g/mL酒石酸カリウムナトリウム)を混合することによって希釈標準溶液を調製した。410 nmでの吸収を記録し、適切なバックグラウンド吸収を差し引き、標準としてグルコースの様々な濃度で作成した標準曲線を使用することによって、還元末端の濃度を計算した。

【0188】

HPLCによる反応プロファイルの分析

反応物から定期的に試料を採取し、屈折率検出器を備えるAgilent(登録商標)1260 HPLCを用いて分析した。0.6 mL/分の流速および85℃の脱イオン水を有するAmnex(登録商標)HP-87Cカラム(BioRad, Hercules, CA)を使用して、gtf反応におけるスクロース、グルコース、ロイクロースおよびフルクトースレベルを定量した。0.6 mL/分の流速および85℃の脱イオン水を有するAmnex(登録商標)HP-42Aカラム(BioRad)を使用して、gtf反応における可溶性オリゴ糖副産物(DP2~DP7)を定量した。

【0189】

固定化酵素を含む試料に対して、屈折率検出器を備えるDionex(登録商標)UltiMate(商標)3000 HPLC(Thermo Scientific)を使用した(実施例4)。0.3 mL/分の流速および85℃の脱イオン水を有するPhenomenex(登録商標)Rezex(商標)カルシウム单糖カラムを使用して糖を分析した。

【0190】

NMRによるオリゴ糖結合の分析

5 mm低温三重共鳴パルスフィールド勾配(PFG)プローブを用いて、¹Hに対して500 MHzで作動するAgilent DD2分光計上でNMRデータを得た。「present」実験において残留水シグナルに対する共鳴上にオブザーブ送信機周波数(observation transmitter frequency)を慎重に置き、次いで全位相サイクル(32の倍数)および10 msの混合時間でNOESY実験の最初のスライスを使用することによって、水抑制を得た。6410 Hzのスペクトル幅、5.1 sの捕捉時間、65536個のデータ点、4 s プレサチュレーションおよび5.85 μsの90°パルスで、1次元¹Hスペクトルを得た。試料温度を25℃に維持した。メチル共鳴を0 ppmに設定して、450 μLのD₂Oおよび12.4 mM DSS(4,4'-ジメチル-4'-シラペンタン-1-スルホン酸ナトリウム塩)内部参照を含有する60 μLのD₂Oとともに、5 mm NMR管に50 μLを添加することによって、試料を調製した。異なるアノマー結合に対する化学シフト割り当ては、Goffinら(2009, Bull Korean Chem. Soc. 30: 2535-2541)から得た。ピーク割り当ては、アルファ(1,3)結合に対して5.35 ppm、ロイクロースに対して5.1 ppm、およびアルファ(1,6)結合に対して4.95であった。還元末端(β-E)は、アルファREに対して5.2、およびベータREに対して4.65を割り当てた。

【0191】

実施例1

スクロースの重合による糖シロップの生成

この実施例は、グルカン合成反応におけるgtf酵素を用いたスクロースの重合によって可溶性糖の混合物を生成させた一般的方法を開示する。具体的には、グルカン合成反応のろ液を調製し、次いでこれを濃縮してシロップにした。

【0192】

清潔な5ガロンのポリエチレンバケツにスクロース(300 g)を添加した。このバケツに水(18.1 L)およびFermasure(商標)(10 mL)を添加し、5 vol 1% NaOHおよび5 vol 1% H₂SO₄を添加することによって、pHを7.0に調整

10

20

30

40

50

した。最終体積は約 20 L であり、HPLC により測定した場合のスクロースの初濃度は 152.5 g / L であった。一般的方法セクションに記載のとおり調製した 0.3 v o l % の粗製 *g t f* 酵素（配列番号 3）抽出物を添加することによって、グルカン重合反応を開始させた。この抽出物は、約 2.9 mg / mL のタンパク質を含有した。ガラスシャフトおよび PTFE ブレードを備えたオーバーヘッド型の機械式モーターを使用して、反応溶液に対する攪拌を行った。

【0193】

48 時間後、HPLC 分析によって、スクロースの 96 % が消費されたことが明らかになり、反応が完結したとみなした。325 メッシュスチールスクリーンおよび 40 ミクロンろ紙を用いてブナーフィルター漏斗でのろ過によって、反応物の不溶性ポリ - アルファ - 1,3 - グルカン生成物を除去した。次いで、ロータリーエバポレーター（浴槽温度 40 ~ 50 °C）を用いて母液（ろ液）を濃縮して、約 320 g / L の糖の総糖濃度とした。濃縮ろ液の組成を表 2 に示す。

【0194】

【表 6】

表 2
グルカン合成反応の濃縮ろ液の組成

	スクロース	ロイクロース	グルコース	フルクトース	DP2	DP3+	合計
g/L	13.5	130.6	25.5	103.8	18.3	28.3	320.1
wt%	4.2	40.8	8	32.4	5.7	8.9	100

【0195】

表 2 は、グルカン合成反応の濃縮ろ液がスクロース、フルクトース、グルコース、ロイクロースおよび DP2 ~ DP7 のオリゴ糖を含有することを示す。

【0196】

実施例 2

グルカン合成反応のろ液中の糖の加水分解における酵素の効果

この実施例は、グルカン合成反応の濃縮ろ液中のロイクロースおよび / またはオリゴ糖副産物の濃度を低下させるための、様々なグルコアミラーゼ (EC 3.2.1.3)、トランスクロシダーゼ (EC 2.4.1.24)、ベータ - グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21)、アルファ - アミラーゼ (EC 3.2.1.1) およびグルコシダーゼ (EC 3.2.1) 酵素の活性を測定する。全てアルファ - グルコシダーゼである DIAZYME RDF ULTRA、トランスクロシダーゼ (EC 2.4.1.24) およびグルコアミラーゼ (EC 3.2.1.3) などのある種の酵素は、これらの副産物の量を減少させることにおいて特に有効であり、その結果、処理済みろ液中で単糖（グルコースおよびフルクトース）の対応する増加が起こることが分かった。

【0197】

グルカン合成反応のろ液を最初に調製し、実施例 1 で概説される手順に従い濃縮してシロップにした。この濃縮ろ液の組成を表 3 に示す。NMR 分析から、シロップ中に存在するアルファ (1,3) とアルファ (1,6) 結合との比が 78 : 22 であったことが明らかになった。

【0198】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 3
グルカン合成反応の濃縮ろ液の組成

	スク ロース	ロイク ロース	グル コース	フルク トース	DP2	DP3+	合計
g/L	161	210	93	302	33	61	860
wt%	18.7	24.4	10.8	35.1	3.8	7.1	100.0

10

【0199】

表3のシロップを使用して、グルカン合成反応のロイクロースおよびオリゴ糖副産物に対する様々な酵素の加水分解活性を試験した。ロイクロースが通常とは異なる結合 [アルファ(1,5)-グルコシルフルクトース] を含有することおよびオリゴ糖が、主にアルファ(1,3)およびアルファ(1,6)グルコシル-グルコース結合を含むことから考えて、これらの副産物の両方を加水分解するためにどの酵素を使用し得るかは、これらの実験の当初は明らかではなかった。この分析のために様々な活性を有する酵素を選択した(表4)。

【0200】

20

30

40

50

【表 8】

表 4
ロイクロースおよびオリゴ糖加水分解に対して評価した酵素

酵素	起源	機能	活性またはタンパク質濃度
DIAZYME RDF ULTRA	DuPont IB ^a	1,4-アルファ-グルコシダーゼ	710 U/g
オリゴ-1,6-グルコシダーゼ	Megazyme	1,6-アルファ-グルコシダーゼ	320 U/mg
SPEZYME FRED	DuPont IB	アルファ-アミラーゼ	1~5%
SPEZYME RSL	DuPont IB	アルファ-アミラーゼ	1~5%
OPTIMAX L-1000	DuPont IB	ブランナーゼ	1~5%
TRANSGLUCOSIDASE L-2000	DuPont IB	トランスグルコシダーゼ	>1700 TGU/g
精製 TRANSGLUCOSIDASE L-2000	DuPont IB	トランスグルコシダーゼ	22.7 mg/mL
ACCELLERASE BG	DuPont IB	ベータ-グルコシダーゼ	3000 U/g
NOVO 188	Sigma-Aldrich	ベータ-グルコシダーゼ	> 250 U/g
SUMIZYME BFS-L	新日本化学工業株式会社	ベータ-グルコシダーゼ	100 U/g
SUMIZYME BGA	新日本化学工業株式会社	ベータ-グルコシダーゼ	2000 U/g
ACCELLERASE TRIO	DuPont IB	セルラーゼ	5~10%
ACCELLERASE 1500	DuPont IB	セルラーゼ/ベータ-グルコシダーゼ	5~10%/0.5~4%
OPTIDEX L-400	DuPont IB	グルコアミラーゼ	> 350 GAU/g
GC 147	DuPont IB	グルコアミラーゼ	400 GAU/g
GC 321	DuPont IB	グルコアミラーゼ	> 350 GAU/g

^a DuPont Industrial Biosciences

【0201】

上記酵素のそれぞれを用いて表3のシロップを処理するための条件を表5に示す（酵素負荷、時間、温度、pH、糖濃度）。各加水分解反応で使用する糖濃度になるようにシロップを水で希釈した。表5は、各酵素によるロイクロースおよびDP3+（少なくともDP3~DP7）オリゴ糖のパーセント加水分解をさらに提供する。（1-（最終シロップ中wt%DP3+オリゴ糖）/（最初のシロップ中のwt%DP3+オリゴ糖））として、パーセントDP3+加水分解を計算した。同様に、（1-（最終シロップ中のwt%ロイクロース）/（最初のシロップ中のwt%ロイクロース））として、パーセントロイクロース加水分解を計算した。

【0202】

10

20

30

40

50

【表9】

表5

様々な酵素による濃縮液中のロイクロースおよびオリゴ糖の加水分解

実施例	酵素	酵素負荷(vol %)	温度(℃)	時間(hr)	pH	糖濃度(g/L) ^a	DP3+ ^b 加水分解(%)	ロイクロース加水分解(%)
2.1	DIAZYME RDF ULTRA	0.5	60	88	4.0	300	36	13
2.2	オリゴ-1,6-グルコシダーゼ	5	40	72	5.5	400	43	<2
2.3	SPEZYME FRED	0.5	60	66	4.0	280	<2	<2
2.4	SPEZYME RSL	0.5	60	48	4	290	<2	<2
2.5	OPTIMAX L-1000	0.5	60	48	4	290	<2	<2
2.6	TG L-2000	0.25	60	70	4.0	260	54	>98
2.7	TG L-2000	2	60	48	4.5	300	96	>98
2.8	精製TG L-2000	0.5	60	48	4.5	260	56	>98
2.9	ACCELLERASE BG	0.5	60	70	4	300	11	<2
2.10	NOVO 188	0.25	60	70	4	300	49	36
2.11	NOVO 188	5	60	40	5.5	340	93	29
2.12	SUMIZYME BFS-L	0.5	60	48	4.5	260	55	46
2.13	SUMIZYME BGA	0.1 wt%	60	48	4.5	260	26	77
2.14	ACCELLERASE TRIO	0.5	60	48	4	290	28	6.6
2.15	ACCELLERASE 1500	0.5	60	66	4	280	26	4
2.16	GC 147	0.5	60	40	4	300	55	12
2.17	GC 321	5	60	72	5.5	400	74	64
2.18	OPTIDEX L-400	0.5	60	70	4	300	27	25

^a 糖濃度(スクロース、グルコース、フルクトース、ロイクロースおよびオリゴ糖の総濃度)はHPLCにより測定;報告値は、四捨五入して10g/L単位の概数にする。

^b DP3+は、DP3-DP7を含有するが、ある一定のgtf酵素を用いて生成される場合、アルファ-1,6結合とアルファ-1,3結合との比が大きいより大きな可溶性オリゴ糖も含有し得る。

【0203】

表5は、1,4-アルファ-グルコシダーゼおよび1,6-アルファ-グルコシダーゼが、ロイクロースの加水分解が幾分があるか(実施例2.1)または殆どない(実施例2.2)が、オリゴ糖から幾分かのグルコースを放出したことを示す。アルファ-アミラーゼの使用(実施例2.3および実施例2.4)は、関心のある化合物に対して殆ど活性を示さなかった。同様に、ブルラナーゼの使用(実施例2.5)は殆ど活性を示さなかった。

【0204】

セルラーゼ(実施例2.14および2.15)は、ロイクロースを加水分解する点において非常に不良であったが、オリゴ糖を幾分か加水分解した。

【0205】

オリゴ糖はベータ結合を含有しなかったにもかかわらず、驚くべきことに、ベータ-グルコシダーゼ酵素はまた、非常に低いレベル(アクセレラーゼBG、実施例2.9)から非

10

20

30

40

50

常に高いレベル（N O V O 1 8 8、実施例2.10および2.11）の範囲の加水分解変換も示した。これらの酵素の相対的効力は、非常に劇的に変動した。一部のケースにおいて、加水分解されたオリゴ糖の量は、加水分解されたロイクロースのパーセンテージを大きく上回る（実施例2.11）か、またはそれと近かった（実施例2.12）。他のケースにおいて、ロイクロースはベータ-グルコシダーゼによってよく加水分解されたが、一方で、オリゴ糖の加水分解は中程度であった（実施例2.13）。ベータ-グルコシダーゼを用いて観察された結果間の大きい相違点から、試験したベータ-グルコシダーゼ処方物、例えばグルコアミラーゼまたは別のタイプのアルファ-グルコシダーゼなどの中の他の酵素の存在が、観察された活性の原因であり得ることが示唆される。

【0206】

逆に、表5の結果は、トランスグルコシダーゼ（T G L - 2 0 0 0、実施例2.6）が、オリゴ糖およびロイクロースの両方を加水分解するという点で非常に高い活性を示したことを示す。トランスグルコシダーゼによるロイクロース加水分解は、ある一定の環境下で定量的であると思われ、高い酵素負荷でD P 3 + 物質の95%超がグルコースおよびD P 2 に加水分解された（実施例2.7）。精製タイプトランスグルコシダーゼの使用から同様の活性（実施例2.8）が明らかになり、これは、観察される活性がトランスグルコシダーゼ酵素によるものであり、バックグラウンド活性ではないことを示す。

【0207】

グルコアミラーゼ（実施例2.16～2.18）は、ロイクロースおよびオリゴ糖に対するある範囲の活性を示した。ロイクロースおよびオリゴ糖の両方の加水分解が30%未満であったのは、1つの試験グルコアミラーゼ（実施例2.18）のみであった。

【0208】

表5の結果は、D I A Z Y M E R D F U L T R A、グルコアミラーゼおよびトランスグルコシダーゼなどのアルファ-グルコシダーゼは、グルカン反応ろ液中に存在するロイクロース副産物を加水分解し得ることを示す。アルファ-グルコシダーゼのロイクロース加水分解能は、これらの酵素がアルファ-1, 5 グルコシル-フルクトース結合を加水分解し得ることを示す。この活性が基質としてロイクロースを用いて上記で示された一方で、この活性は、アルファ-1, 5 グルコシル-フルクトース結合を含むオリゴ糖にも拡大できると考えられる。

【0209】

表5における結果は、さらに、グルコアミラーゼおよびトランスグルコシダーゼなどのアルファ-グルコシダーゼが、グルカン反応ろ液中に存在するオリゴ糖副産物を加水分解し得ることを示す。これらのオリゴ糖は、殆どアルファ-1, 3 および / またはアルファ-1, 6 結合により連結されるグルコースモノマー単位から構成されるため（実施例3）、表5のデータは、アルファ-グルコシダーゼ酵素がアルファ-1, 3 グルコシル-グルコースおよび / またはアルファ-1, 6 グルコシル-グルコース結合を加水分解し得ることを示す。

【0210】

アルファ-グルコシダーゼ酵素はグルカン合成反応のロイクロースおよび / またはオリゴ糖副産物を加水分解する点で一般に有効であったため、これらの酵素は、单糖の量が増加し、糖副産物の量が減少したグルカン反応ろ液からの高純度シロップを生成させるために必要な処理時間を短縮するために、単独で、または組み合わせて使用することができる。有効な酵素の組み合わせの例は、ロイクロース加水分解のための、トランスグルコシダーゼ、例えばT G L - 2 0 0 0などおよびオリゴ糖副産物を効率的に加水分解するグルコアミラーゼ（例えばG C 3 2 1）酵素であり得る。

【0211】

したがって、アルファ-グルコシダーゼ酵素は、ある種の糖中の（i）アルファ-1, 5 グルコシル-フルクトース結合および（ii）アルファ-1, 3 およびアルファ-1, 6 グルコシル-グルコース結合を個別に加水分解することができる。

【0212】

10

20

30

40

50

実施例 3

酵素加水分解前後のグルカン反応ろ液成分の結合分布の比較

この実施例は、グルカン合成反応の濃縮ろ液中に存在するロイクロースおよびオリゴ糖副産物に対するトランスグルコシダーゼ（E C 2 . 4 . 1 . 2 4）およびベータ - グルコシダーゼ（E C 3 . 2 . 1 . 2 1）酵素の加水分解活性を測定する。トランスグルコシダーゼは、これらの副産物の量を減少させ、その結果、処理済みろ液中で单糖（グルコースおよびフルクトース）の対応する増加が起こることが分かった。

【 0 2 1 3 】

上記グルカン合成反応のろ液中に存在するオリゴ糖副産物は、N M R（一般的な方法）により測定した場合に、> 9 0 % グルコース - グルコース結合を含む。グルコース - グルコース結合のうち、約 7 8 % がアルファ - 1 , 3 結合に相当し、約 2 2 % がアルファ - 1 , 6 結合に相当する。

10

【 0 2 1 4 】

加水分解後に上記実施例 2 . 1 1 で生成された物質の結合プロファイルを決定するために、N M R を使用した。図 1 に示されるように、アルファ - 1 , 3 結合に対応するピークが 8 6 % 低下し、アルファ - 1 , 6 結合に対応するピークの低下は僅か 2 . 3 % であり、ロイクロースピークに対応するピークは 2 1 % 低下した。スクロースがこの酵素によりほぼ定量的に加水分解された一方で、N o v o 1 8 8 は、アルファ - 1 , 6 結合を加水分解できないと思われる。

20

【 0 2 1 5 】

T G L - 2 0 0 0 (配列番号 1) トランスグルコシダーゼを用いて生成された物質の結合プロファイルを決定するために、N M R を同様に使用した（図 2）。表 3 の物質からの 2 1 0 μ L の濃縮ろ液、3 0 0 μ L のD 2 O および内部参照として 1 2 . 4 mM D S S を含有する 9 0 μ L のD 2 O をN M R 管中で混合して、3 0 0 g / L の総糖濃度にし、6 0 に加熱した。6 0 での熱平衡後に時間ゼロのスペクトル（図 2 での出発物質）を得て、次いで 0 . 5 v o l % の酵素を添加した。試料を 6 0 でプローブ中で再平衡化し、調整し（s h i m m e d）、分析数分内に測定を行った。T G L - 2 0 0 0 酵素での処理の 1 0 時間後（図 2 での処理済み物質）、アルファ - 1 , 3 結合に対応するピークが 4 1 % 低下し、アルファ - 1 , 6 結合に対応するピークが 3 6 % 低下し、ロイクロースに対応するピークが > 9 5 % 低下した（図 2）。アルファ - 還元末端およびベータ - 還元末端ピークの両方の上昇が観察されたが、これはフルクトースおよびグルコースの増加に対応する（図 2）。

30

【 0 2 1 6 】

これらの結果から、トランスグルコシダーゼは、アルファ - 1 , 3 およびアルファ - 1 , 6 結合を含有するオリゴ糖をグルコースに変換することができ、ロイクロースをフルクトースおよびグルコースに変換し得ることが明らかになる。したがって、トランスグルコシダーゼは、ある種の糖において、(i) アルファ - 1 , 5 グルコシル - フルクトース結合および(i i) アルファ - 1 , 3 およびアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解することができる。

30

【 0 2 1 7 】

実施例 4

固定化酵素を用いたグルカン反応ろ液中のロイクロースおよびオリゴ糖の加水分解

この実施例は、グルカン合成反応から得られたろ液中に存在するロイクロースおよび他のオリゴ糖を加水分解するために固定化グルコアミラーゼ（E C 3 . 2 . 1 . 3）およびトランスグルコシダーゼ（E C 2 . 4 . 1 . 2 4）を使用することを記載する。具体的には、グルカン合成反応のろ液中のロイクロースおよびオリゴ糖D P 2 、D P 3 およびH S (高級糖類、D P 4 +) の加水分解における、固定化トランスグルコシダーゼ T G L - 2 0 0 0 (配列番号 1、Genencor / DuPont Industrial Biosciencesより入手) および固定化グルコアミラーゼ G C - 1 4 7 (Genencor / DuPont Industrial Biosciencesより入手) の効果を調

40

50

べた。

【 0 2 1 8 】

グルコアミラーゼおよびトランスグルコシダーゼ酵素の固定化は、参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第 5 5 4 1 0 9 7 号明細書に記載の方法に従い行った。

【 0 2 1 9 】

グルコアミラーゼまたはトランスグルコシダーゼを固定化するための典型的なプロセスにおいて、約 8 . 0 g / バッチで 2 バッチの多孔質粒状珪藻土 (E P M i n e r a l s , R e n o , N V) を蒸留水で水和し、次いで直径 1 . 5 c m および高さ 3 0 c m のガラスカラムリアクターに移した。水を約 6 ~ 7 m L / 分で上流に汲み上げて、3 本のカラム全てから微粒子を除去した。一般に、1 時間以内に、水流出液を微粒子不含にした。水をカラムから粒状珪藻土床の上部に排出させ、0 . 1 % w / v ポリエチレンイミン水溶液 (P E I , E P O M I N P - 1 0 5 0) で置き換えた。次いで 3 5 0 0 m L の P E I 溶液を上流に汲み上げ、2 時間にわたり床を通じて流出液を再利用した。次いで、粒状珪藻土床を 2 時間にわたり蒸留水で上向きに洗浄して室温で遊離 P E I を除去した。このようにして、粒状珪藻土 - P E I 担体を得た。

10

【 0 2 2 0 】

その間に、表 4 で定義された活性を有する 3 . 5 m L のグルコアミラーゼ G C - 1 4 7 を 3 1 5 m L の 0 . 0 2 M 酢酸緩衝液 (p H 4 . 5) に添加した。次いで、穏やかに混合しながら 1 . 5 7 5 g の 5 0 % w / w グルタルアルデヒド (P r o t e c t o l (登録商標) G A - 5 0) をグルコアミラーゼの水溶液にゆっくりと添加し、グルタルアルデヒドをグルコアミラーゼ水溶液と 2 0 ~ 2 5 ℃ の温度で 4 時間、穏やかに攪拌しながら反応させ、その結果、処理済みグルコアミラーゼを含有する処理済み酵素 - グルタルアルデヒド付加物が形成された。独立に、グルコアミラーゼの代わりに表 4 で定義された活性を有するトランスグルコシダーゼ T G L - 2 0 0 0 を使用して、これらの工程を繰り返し、それによって、処理済みトランスグルコシダーゼを含有する処理済み酵素 - グルタルアルデヒド付加物が形成された。

20

【 0 2 2 1 】

次いで、粒状珪藻土 - P E I 担体を含有する上記のように調製したそれ自体のカラム中で、処理済み酵素 - グルタルアルデヒド付加物のそれぞれを 4 時間 (2 0 ~ 2 5 ℃) にわたり循環させた。次に、過剰な処理済み付加物を担体から水で洗い流した。このようにして固定化グルコアミラーゼまたはトランスグルコシダーゼ入りのカラムを調製した。

30

【 0 2 2 2 】

表 3 で定義された組成を有するグルカンろ液を 1 8 0 g / L に希釈し、p H 4 . 5 に調整し、固定化酵素を含有するカラムに通過させた。カラム温度を 6 0 ℃ に調節した。カラム平衡化の 1 6 時間後、異なる流速で試料を定期的に採取した。H P L C によって加水分解反応生成物の糖組成を決定した (表 6) 。毎回、流速設定を変化させ、カラムを試料採取前に少なくとも 1 ~ 2 ベッド体積にわたり再平衡化させた。実施例 2 に記載の方法を用いてロイクロースおよびオリゴ糖の加水分解度を計算した。3 本のカラム配置：1) 固定化グルコアミラーゼ、2) 固定化トランスグルコシダーゼおよび 3) 固定化グルコアミラーゼ、続いて固定化トランスグルコシダーゼを試験した。

40

【 0 2 2 3 】

50

【表 10】

表6
オリゴ糖およびロイクロースを加水分解するための固定化グルコアミラーゼおよびトランスグルコシダーゼ酵素の適用

固定化酵素	平均接触時間 (hr)	DP3+ 加水分解(%)	ロイクロース 加水分解(%)
GC 147	0.7	16	17
GC 147	1.0	20	22
GC 147	1.3	25	29
GC 147	3.0	39	47
TG L-2000	0.7	28	>95
TG L-2000	1.0	32	>95
TG L-2000	1.3	37	>95
TG L-2000	3.0	47	>95
GC 147 + TG L- 2000	6.0	55	>95

10

【0224】

20

表6は、平均接触時間（名目カラム体積を平均流速で除したものとして定義される）が延長したため、ロイクロースおよびオリゴ糖の加水分解度が一般に向上したことを示す。試験した最大流速を使用した場合でも顕著な差は認められなかつたため、ロイクロースを加水分解するための固定化トランスグルコシダーゼの使用は、特に有効であった。各カラムが個々に合理的な変換を示し、一方で、グルコアミラーゼおよびトランスグルコシダーゼの組み合わせでオリゴ糖の加水分解が最大となった。

【0225】

したがって、固定化グルコアミラーゼまたはトランスグルコシダーゼまたは両タイプの固定化酵素の使用は、アルファ-1, 3 およびアルファ-1, 6 グルコシル-グルコース結合を含有するオリゴ糖ならびにロイクロースを加水分解するための有効な技術に相当する。これらの結果は実施例2の結果と一致する。他のアルファ-グルコシダーゼ酵素の固定化は同様の結果を与えるはずである。

30

【0226】

実施例5

クロマトグラフィーによるグルカン反応ろ液からのフルクトースの濃縮

この実施例は、グルカン反応ろ液中のフルクトースがクロマトグラフィーを通じてどのようにさらに濃縮され得るかを開示する。

【0227】

一般に、クロマトグラフィーにより糖分子を分離する場合、成分は分子サイズと反比例して溶出するため、最大分子が最初に溶出する。したがって、グルカン合成反応のろ液に関しては、オリゴ糖が最初に溶出し、続いて二糖、次に单糖が溶出する。ナトリウム陽イオン樹脂を用いた分離では、フルクトースおよびグルコースがうまく分離されず、ロイクロース、スクロースおよびDP 2 の全てが同時溶出する。陽イオンがカルシウムであるイオン交換樹脂の使用は、グルコースおよびフルクトースを分離するのに好ましい。

40

【0228】

グルカン合成反応のろ液を最初に調製し、実施例1で概説した手順に従い濃縮してシロップにした。この濃縮ろ液の組成を表7に示す。

【0229】

50

【表 1 1】

表 7
グルカン合成反応の濃縮ろ液の組成

	スクロース	ロイクロース	グルコース	フルクトース	DP2	DP3+	合計
g/L	126	202	93	295	40	65	821
wt%	15.4	24.6	11.3	36.0	4.8	7.9	100

【0 2 3 0】

10

表 7 のシロップをろ過し、イオン交換水で 25 g 乾燥固体 / 100 g 溶液に希釈し、カルシウム型の架橋強酸性イオン交換樹脂を含有するカラムに加えた。このカラムの物理学的パラメーターを表 8 に示す。希釈シロップ (15.8 L) をこのカラムに加え、これを 65 で維持し、その後、流速 30 L / hr で水を用いてカラムを溶出した。

【0 2 3 1】

【表 1 2】

表 8
カラムの物理学的パラメーター

樹脂タイプ	FINEX CS11GC
イオン型	Ca ²⁺
架橋、%ジビニルベンゼン	5.5
粒子径(mm)	0.34
ベッド長(m)	5.0
カラム直徑(m)	0.225

20

【0 2 3 2】

この分離において、おそらくロイクロースがカルシウム陽イオンと複合体を形成するがゆえに、ロイクロースはスクロースより長くカラムに残留し、実際にグルコースと同時に溶出した。フルクトースを含有する 2 分画を単離した。分画 5.1 は 47 ~ 120 分で、および分画 5.2 は 120 ~ 172 分で溶出した。クロマトグラフィー分離に加えられたフルクトースのうち、95.7 % のフルクトースが > 90 % 純度で単離された。HPLC により測定した場合の各分画 (5.1 および 5.2) での生成物分布を表 9 に示す。

30

【0 2 3 3】

【表 1 3】

表 9
相当量のフルクトースを含有するクロマトグラフィー分画の生成物分布

分画	スクロース	ロイクロース	グルコース	フルクトース	DP3+	その他	合計	%回収 フルクトース
5.1	31.9	34.8	20.8	3.9	5.4	4.8	100	3.9
5.2	0.0	1.0	0.8	97.7	0.0	0.6	100	95.7

40

【0 2 3 4】

この分離のためのフィード組成が 36.0 % フルクトースを含んだため、全部で 34.5 % のトータルストリーム (total stream) が > 90 wt % DS フルクトースとともにフルクトースシロップとして回収された。フィード中のスクロースが無視されるため、> 90 wt % DS フルクトースとともに、糖の 40.7 % がフルクトースシロップ

50

として回収された。

【0235】

したがって、クロマトグラフィーを通じてグルカン反応ろ液中のフルクトースをさらに濃縮することができる。以下の実施例6は、トランスグルコシダーゼで加水分解されたグルカンろ液を使用して、このプロセスを促進し得ることを明らかにする。

【0236】

実施例6

クロマトグラフィーによる加水分解グルカン反応ろ液からのフルクトースの濃縮

この実施例は、オリゴ糖およびロイクロースが加水分解されたグルカンろ液からのフルクトース単離の結果、非加水分解グルカンろ液からフルクトースを単離した場合と比較して、高純度フルクトースシロップの収率が上昇することを明らかにする。

10

【0237】

1 v o l % のトランスグルコシダーゼ T G L - 2 0 0 0 (配列番号1) によって 6 0 および pH 4 . 5 で 2 4 時間にわたり処理したグルカンろ液を (50 で真空) 濃縮することによってシロップを調製した。濃縮プロセス中に幾つかのオリゴ糖形成が観察されたが、これは、高濃度の单糖でトランスグルコシダーゼ酵素がオリゴ糖を生成させることができ知られているからであると予想された。シロップは、表Aに記載の最終生成物分布となつた。

【0238】

【表14】

20

表A
濃縮前に加水分解された濃縮グルカンろ液の組成

	スクロース	ロイクロース	グルコース	フルクトース	DP2	DP3+	合計
g/L	3	<10	294	409	73	81	約 870
wt%	0.3	1.1	33.7	47.0	8.4	9.3	100

【0239】

表Aに記載のシロップをろ過し、イオン交換水で 2 5 . 4 g D S / 1 0 0 g 溶液に希釈し、カルシウム型の架橋強酸性陽イオン交換樹脂を含有するカラムを加えた。このカラムの物理学的パラメーターを表Bに示す。次いで希釈シロップ (169 g) をカラムに加え、これを 6 5 で維持し、その後、流速 5 0 m L / 分で水を用いてカラムを溶出した。

30

【0240】

【表15】

表B
カラムの物理学的パラメーター

樹脂タイプ	FINEX CS11GC
イオン型	Ca ²⁺
架橋、%ジビニルベンゼン	5.5
粒子径(mm)	0.34
ベッド長(m)	1.69
カラム直徑(m)	0.093

40

【0241】

フルクトースを含有する 2 つの分画を単離した。7 3 分 ~ 1 0 3 分で分画 6 . 1 が溶出され、1 0 3 分 ~ 1 2 0 分で分画 6 . 2 が溶出された。クロマトグラフィー分離に加えられたフルクトースのうち、カラムに加えられたフルクトースの 9 3 . 0 % が > 9 0 % 純度で

50

分画 6 . 2 において単離された。H P L C により測定した場合の各分画 (6 . 1 および 6 . 2) における生成物分布を表 C に示す。

【 0 2 4 2 】

【 表 1 6 】

表 C
加水分解されたグルカンろ液からのフルクトースを含有するクロマトグラフィー分画の生成物分布

分画	スクロース	ロイクロース	グルコース	フルクトース	DP3+	その他	合計	%回収フルクトース
6.1	7.7	13.9	63.9	7.3	1.5	5.7	100	5.9
6.2	0.0	0.6	3.0	91.8	0.0	4.6	100	93.0

【 0 2 4 3 】

実施例 5 と比較してこの実施例で分離効率が低下したことは、カラムのスケールの相違および試料のより高いグルコース分画に起因し得る。そうであったとしても、この物質のクロマトグラフィー精製の結果、トランスグルコシダーゼによって加水分解されていないグルカンろ液からシロップをクロマトグラフィーによって調製した実施例 5 で達成された収率と比較して、高純度フルクトースシロップの収率が向上した。この分離に対するフィード組成は 47 % フルクトースを含んだため（表 A ）、総ストリームの 43.7 % が > 90 w t % D S フルクトースとともにフルクトースシロップとして回収された。この 43.7 % 回収率は、実施例 5 での 34.5 % 回収率よりも顕著に良好である。

【 0 2 4 4 】

したがって、トランスグルコシダーゼで加水分解されたグルカンろ液からのフルクトース単離の結果、非加水分解グルカンろ液からフルクトースを単離した場合と比較して、フルクトースの収率が向上する。

【 0 2 4 5 】

実施例 7

グルカン合成反応のろ液を発酵させることによるエタノールの生成

この実施例は、グルカンろ液のエタノールへの酵母発酵を開示する。

【 0 2 4 6 】

水道水中で酵母 (*S . c e r e v i s i a e*) クリーム (*T o n o n m i l l , B r a z i l*) を懸濁し (2 . 4 L 、 6 0 0 n m で 6 5 の光学密度) 、次いで L E G E N D X T R 遠心機 (*T h e r m o S c i e n t i f i c*) を用いて 4 5 0 0 g で 5 分間酵母クリームを遠心することによって、酵母クリームを洗浄した。上清をデカントした後、酵母細胞を再懸濁し、さらに 2 回遠心することによって濃縮した。3 回目の洗浄後、5 w t % 硫酸の添加によって pH を 2 に調整した。G E N E S Y S 2 0 4 0 0 1 分光光度計 (*T h e r m o S c i e n t i f i c*) を用いて光学密度を測定し、水道水の添加によって 6 0 0 n m で 1 0 0 に調整した。調整した酵母クリーム (1 . 5 L) を 7 . 5 L の B I O F L O 3 1 0 発酵槽容器 (*N e w B r u n s w i c k*) に添加した。3 0 の温度および 1 0 0 r p m での攪拌を維持するように発酵槽を設定した。発酵中に pH を測定したものの、酸または塩基溶液の添加による調節は行わなかった。

【 0 2 4 7 】

酵母抽出物 (1 0 g / L) 、ペプトン (2 0 g / L) およびグルカンろ液からの 2 0 0 g / L の糖を含有するフィード溶液を調製し、1 2 1 で 1 5 分間 P H O E N I X A V - 2 5 0 P L U S オートクレーブを用いて滅菌した。フィード溶液を 2 5 (室温) に冷ました後、発酵が開始した。およそ 5 時間にわたり 6 8 4 m L / h r の速度で滅菌フィード溶液 (3 . 5 L) を発酵槽に添加し、発酵を 2 2 時間にわたり進行させた。

【 0 2 4 8 】

発酵中に周期的に試料を採取し、GENESYS 20 4001分光光度計、PAL-3屈折計（Atago）を用いたBrrixを用いて光学密度について分析し、HPLC（一般的方法）によって糖およびエタノール濃度を分析した。これらの結果を表10にまとめた。

【0249】

【表17】

表10
最初のエタノール発酵に対するフィードおよび経時変化発酵プロファイル

時間(hr)	スクロース	ロイクロース	グルコース	フルクトース	DP2	DP3+	全糖	EtOH
フィード	9	70	19	76	7	19	200	0
0	0.2	0.0	0.0	0.1	-	-	-	7
1	<1	18	0.3	<1	-	-	-	15
2	<1	30	0.4	<1	-	-	-	21
3	<1	40	0.0	<1	-	-	-	25
4	<1	46	0.0	<1	-	-	-	28
5	<1	49	0.0	<1	-	-	-	29
6	<1	53	0.0	<1	-	-	-	32
8	<1	53	0.0	<1	-	-	-	33
22	<1	53	0.0	<1	5	18	76	33

フィード中および様々な発酵時間点(0~22 時間)でのエタノール(EtOH)および糖化合物の濃度(g/L)を列挙する。

【0250】

発酵が終了したら、4500gで5分間、LEGEND XTR遠心機を使用して遠心によって酵母細胞を分離した。上清をデカントした後、酵母を再懸濁し、さらに2回、遠心によって濃縮した。3回目の洗浄後、5wt%硫酸の添加によってpHを2に調整した。GENESYS 20 4001分光光度計を使用して光学密度を測定し、水道水の添加によって600nmで100に調整した。上記と同じ条件に従い、前の発酵からの再利用酵母細胞を用いて、それぞれ新鮮なフィードを用いた2回のさらなる発酵サイクルを行った。1回目および2回目の再利用酵母を用いて得られた発酵結果を表11および12にそれぞれ示す。

【0251】

10

20

30

40

50

【表 18】

表 11

酵母細胞の 1 回目の再利用を用いたフィードおよび経時変化発酵プロファイル

時間(hr)	スクロース	ロイクロース	グルコース	フルクトース	DP2	DP3+	全糖	EtOH
フィード	13	69	21	77	7	18	206	0
0	0	4	0	0	-	-	-	5
1	<1	19	0	<1	-	-	-	18
4	<1	35	0	<1	-	-	-	23
4	<1	40	0	<1	-	-	-	26
5	<1	45	0	<1	-	-	-	29
6	<1	53	0	<1	-	-	-	32
7	<1	50	0	<1	-	-	-	32
7	<1	51	0	<1	-	-	-	33
21	<1	42	0	<1	6	18	65	37

フィード中および様々な発酵時間点(0~21 時間)でのエタノール(EtOH)および糖化合物の濃度(g/L)を列挙する。

【0252】

【表 19】

表 12

酵母細胞の 2 回目の再利用を用いたフィードおよび経時変化発酵プロファイル

時間(hr)	スクロース	ロイクロース	グルコース	フルクトース	DP2	DP3+	全糖	EtOH
フィード	10	70	19	76	6	19	201	0
0	<1	0	0	<1	-	-	-	11
1	<1	32	0	<1	-	-	-	24
4	<1	40	0	<1	-	-	-	29
4	<1	45	0	<1	-	-	-	31
5	<1	46	0	<1	-	-	-	33
6	<1	45	0	<1	-	-	-	34
6	<1	16	0	<1	-	-	-	48
7	<1	7	0	<1	-	-	-	52
21	<1	5	0	<1	5	16	27	54

フィード中および様々な発酵時間点(0~21 時間)でのエタノール(EtOH)および糖化合物の濃度(g/L)を列挙する。

【0253】

1回目の発酵で消費されたロイクロースは僅かであったが、酵母細胞は2回目の再利用によって順応し、ロイクロースを消費し始めた。再利用酵母を用いた3回の発酵サイクル後、エタノール発酵力価は33 g / L (表10、22時間)から54 g / L (表12、21時間)に上昇したが、最後のサイクル後でさえも培地中にかなりの量のロイクロースが存在した。

【0254】

したがって、エタノールを生成させるための発酵プロセスにおいてグルカンろ液を使用することができる。

【0255】

10

20

30

40

50

実施例 8

加水分解されたグルカンろ液を発酵させることによるエタノールの生成

この実施例は、ロイクロースおよびオリゴ糖副産物成分が予め糖化されたグルカンろ液を発酵させた結果、エタノール収率が上昇することを明らかにする。

【0256】

実施例 7 で概説される手順に従い、しかし、予めトランスグルコシダーゼ (T G L - 2 0 0 0、配列番号 1) で処理されたグルカンろ液を用いて、発酵を行った。加水分解グルカンろ液を次のように調製した。グルカンろ液を 3 0 0 g 糖 / L に調整し、次いで 1 . 0 M 水酸化ナトリウムおよび 5 w t % 硫酸を用いて pH を 4 . 0 に調整した。この標品の最終体積は 6 . 7 5 L であった。次いで、PHOENIX AV - 2 5 0 PLUS オートクレーブを用いて 1 2 1 で 1 5 分間、ろ液溶液を滅菌し、次いで温度を 6 0 に調整した。表 4 に記載のような T G L - 2 0 0 0 酵素抽出物 (1 3 5 mL) を滅菌ろ液と混合し、溶液をインキュベーター振盪器 (IKA KS 4 0 0 0) 中で 6 0 および 1 0 0 r p m で 7 2 時間、温置した。このようにして加水分解グルカンろ液を調製した。
10

【0257】

水道水中で酵母 (S . cerevisiae) クリーム (Bom Retiro mill, Brazil) を懸濁し (2 . 4 L、6 0 0 nm で 6 5 の光学密度)、次いで LEGEND XTR 遠心機を用いて 4 5 0 0 g で酵母クリームを 5 分間遠心することによって、酵母クリームを洗浄した。上清をデカントした後、酵母を再懸濁し、さらに 2 回、遠心によって濃縮した。3 回目の洗浄後、5 w t % 硫酸の添加によって pH を 4 . 5 に調整し、GENESYS 20 4 0 0 1 分光光度計を使用して光学密度を測定し、水道水の添加によって 6 0 0 nm で 1 0 0 に調整した。調整した酵母クリーム (1 . 5 L) を 7 . 5 L の BIOFLO 3 1 0 発酵槽容器に添加した。3 0 の温度、1 0 0 r p m での攪拌を維持し、4 M 水酸化アンモニウム水溶液または 5 w t % 硫酸水溶液を用いて pH を 4 . 5 に維持するように発酵槽を設定した。
20

【0258】

酵母抽出物 (1 0 g / L)、ペプトン (2 0 g / L) および加水分解ろ液からの 2 0 0 g / L の糖を含有するフィード溶液を調製し、PHOENIX AV - 2 5 0 PLUS オートクレーブを用いて 1 2 1 で 1 5 分間、滅菌した。フィード溶液を 2 5 (室温) に冷ました後、発酵が開始した。およそ 5 時間にわたり 6 8 4 mL / h r の速度で滅菌済みフィード溶液 (3 . 5 L) を発酵槽に添加し、発酵を 2 2 時間にわたり進行させた。
30

【0259】

発酵中に周期的に試料を採取し、GENESYS 20 4 0 0 1 分光光度計、PAL - 3 屈折計を用いた Br ix を用いて光学密度について分析し、HPLC (一般的方法) によって糖およびエタノール濃度を分析した。これらの結果を表 1 3 にまとめる。

【0260】

40

50

40

50

【表 20】

表 13
加水分解グルカンろ液を用いた 1 回目のエタノール発酵に対するフィードおよび
経時変化発酵プロファイル

時間 (hr)	スク ロース	ロイク ロース	グル コース	フルク トース	DP2	DP3+	全糖	EtOH
フィード	7	4	65	97	11	3	186	0
0	0	0	0	0	-	-	-	7
1	<1	1	<1	<1	-	-	-	20
2	<1	3	<1	<1	-	-	-	32
3	<1	4	<1	<1	-	-	-	40
4	<1	4	<1	<1	-	-	-	49
5	<1	4	<1	<1	-	-	-	53
6	<1	5	<1	<1	-	-	-	55
8	<1	5	<1	<1	-	-	-	57
22	<1	5	<1	<1	8	3	16	54

フィード中および様々な発酵時間点(0~22 時間)でのエタノール(EtOH)および糖化合物の濃度(g/L)を列挙する。

10

20

【0261】

発酵が終了したら、4500 gで5分間、LEGEND XTR遠心機を使用して遠心によって酵母細胞を分離した。上清をデカントした後、酵母細胞を再懸濁し、さらに2回、遠心によって濃縮した。3回目の洗浄後、5 wt %硫酸の添加によってpHを2に調整した。GENESYS 20 4001分光光度計を使用して光学密度を測定し、水道水の添加によって600 nmで100に調整した。上記と同じ条件に従い、前の発酵からの再利用酵母細胞を用いて、それぞれ新鮮なフィードを用いた2回のさらなる発酵サイクルを行った。1回目および2回目の再利用酵母を用いて得られた発酵結果を表14および15にそれぞれ示す。

【0262】

30

【表 21】

表 14
加水分解グルカンろ液での1回目の再利用酵母細胞を用いたフィードおよび
経時変化発酵プロファイル

時間 (hr)	スク ロース	ロイク ロース	グル コース	フルク トース	DP2	DP3+	全糖	EtOH
フィード	7	4	69	104	7	4	194	0
0	<1	0	<1	<1	-	-	-	10
1	<1	7	<1	<1	-	-	-	25
4	<1	5	<1	<1	-	-	-	39
4	<1	4	<1	<1	-	-	-	45
5	<1	5	<1	<1	-	-	-	51
6	<1	5	<1	<1	-	-	-	57
6.2	<1	5	<1	<1	-	-	-	60
7	<1	5	<1	<1	-	-	-	59
21	<1	5	<1	<1	9	5	19	58

フィード中および様々な発酵時間点(0~21 時間)でのエタノール(EtOH)および糖化合物の濃度(g/L)を列挙する。

40

50

【0263】

【表22】

表15
加水分解グルカンろ液での2回目の再利用酵母細胞を用いたフィードおよび
経時変化発酵プロファイル

時間 (hr)	スク ロース	ロイク ロース	グル コース	フルク トース	DP2	DP3+	全糖	EtOH
フィー ド	7	4	70	105	7	5	197	0
0	0	0	0	0	-	-	-	10
1	<1	7	<1	<1	-	-	-	25
3.5	<1	5	<1	<1	-	-	-	39
4	<1	4	<1	<1	-	-	-	45
5	<1	5	<1	<1	-	-	-	51
6	<1	5	<1	<1	-	-	-	57
6.2	<1	5	<1	<1	-	-	-	60
7	<1	5	<1	<1	-	-	-	59
21	<1	5	<1	<1	9	5	19	58

フィード中および様々な発酵時間点(0~21 時間)でのエタノール(EtOH)および糖化合物の濃度(g/L)を列挙する。

10

20

30

【0264】

全ての発酵が基本的に発酵開始約6時間以内に完了し、エタノール力価が57~60.0 g/Lとなった。これらの発酵を実施例7の発酵と比較すると、発酵に供する前にグルカンろ液を加水分解することによって、非加水分解グルカンろ液を用いた発酵から得られたものよりも、エタノール生成がより速く、より多くなることが明らかになる。

【0265】

したがって、ロイクロースおよびオリゴ糖副産物成分が糖化されているグルカンろ液を発酵させることによって、より速い速度でエタノール生成が増加した。この糖化は例えばトランスクルコシダーゼを使用して行うことができる。

【0266】

実施例9

グルカンろ液溶液の同時糖化および発酵

この実施例は、グルカンろ液を含有するフィードの同時糖化および発酵の結果、発酵特性が向上することを開示する。

【0267】

水道水中で酵母(S. cerevisiae)クリーム(Bom R eti ro mill, Brazil)を懸濁し(2.4L、600nmで65の光学密度)、次いでLEGEND XTR遠心機を用いて4500gで酵母クリームを5分間遠心することによって酵母クリームを洗浄した。上清をデカントした後、酵母を再懸濁し、さらに2回、遠心によって濃縮した。3回目の洗浄後、5wt%硫酸の添加によってpHを4.5に調整し、GENESYS 20 4001分光光度計を使用して光学密度を測定し、水道水の添加によって600nmで100に調整した。調整した酵母クリーム(1.5L)を7.5LのBIOFLO 310発酵槽容器に添加した。30℃の温度、100rpmでの攪拌を維持し、4M水酸化アンモニウム水溶液または5wt%硫酸水溶液を用いてpHを4.5に維持するように発酵槽を設定した。

40

【0268】

酵母抽出物(10g/L)、ペプトン(20g/L)およびグルカンろ液からの200g/Lの糖を含有するフィード溶液を調製し、PHOENIX AV-250 PLUSオ-

50

トクレープを用いて 121 度で 15 分間滅菌した。フィード溶液を 25 (室温) に冷ました後、発酵が開始した。表 4 (1% v/v) に記載のような TG L - 2000 トランスグルコシダーゼ酵素抽出物を滅菌済みフィード溶液に添加し、その後直ちに溶液を発酵槽に添加した。およそ 5 時間にわたり 684 mL/h で TG L - 2000 酵素を含有するフィード溶液 (3.5 L) を発酵槽に添加し、発酵を 48 時間にわたり進行させた。

【0269】

発酵中に周期的に試料を採取し、GENESYS 20 4001 分光光度計、PAL-3 屈折計 (Atago) を用いた Brimax を用いて光学密度について分析し、HPLC (一般的な方法) によって糖およびエタノール濃度を分析した。これらの結果を表 16 にまとめた。

【0270】

【表 23】

表 16
グルカンろ液の同時糖化およびエタノール発酵に対するフィードおよび
経時変化発酵プロファイル

時間 (hr)	スクロース	ロイクロース	グルコース	フルクトース	DP2	DP3+	全糖	EtOH
フィード	7	82	12	79	6	20	206	0
0	0	0	0	0	0	0	0	2
1	<1	13	<1	3	-	-	-	11
2	<1	21	<1	4	-	-	-	30
3	<1	21	<1	3	-	-	-	38
4	<1	20	<1	3	11	16	50	43
5	<1	14	<1	2	-	-	-	45
6	<1	<1	<1	2	-	-	-	59
22	<1	<1	<1	1	-	-	-	62
25	<1	<1	<1	<1	-	-	-	63
27	<1	<1	<1	<1	-	-	-	63
31	<1	<1	<1	<1	-	-	-	57
46	<1	<1	<1	<1	-	-	-	57
48	<1	<1	<1	<1	1	11	12	62

フィード中および様々な発酵時間点(0~48 時間)でのエタノール(EtOH)および糖化合物の濃度(g/L)を列挙する。

【0271】

この発酵は、発酵工程前にろ液を加水分解した発酵(実施例 8)と同様、名目上、6 時間で完了し、加水分解していないろ液(実施例 7)を用いた場合と比較して、エタノール力価が僅かに優れていた(62 g/L)。さらに、6 時間までに殆ど全てのロイクロースが消費された(表 16 と表 13 ~ 15 を比較)。発酵直前のグルカンろ液を含有するフィードへの TG L - 2000 などの糖化酵素の添加に加えて、糖化酵素が発酵に直接添加される場合、同様の結果が得られるはずである。

【0272】

したがって、グルカンろ液を含有するフィードの同時糖化および発酵の結果、(i) グルカンろ液成分(例えばロイクロース)の消費の増加、ならびに(ii) エタノール収率および生成速度の向上など、発酵特性が向上し得る。

【0273】

実施例 10

様々なアルファ - グルコシダーゼの調製

10

20

30

40

50

この実施例は、前述の実施例のいくつかで使用したこれらのアルファ - グルコシダーゼ（トランスグルコシダーゼ、グルコアミラーゼ、DIAZYME RDF ULTRA）に加えて、様々なアルファ - グルコシダーゼを調製することを開示する。以下で提供される実施例 11、12、15 および 16において、アルファ - 1, 5 グルコシル - フルクトース結合またはアルファ - 1, 3 および / またはアルファ - 1, 6 グルコシル - グルコース結合を含むオリゴ糖に対する加水分解活性についてこれらのさらなるアルファ - グルコシダーゼを試験した。

【0274】

アスペルギルス・クラバツス (*Aspergillus clavatus*) アルファ - グルコシダーゼ (*Aclglu1*) の発見

様々な産業応用において有用であり得る他の酵素の供給源候補として、アスペルギルス・クラバツス (*Aspergillus clavatus*) の株を選択した。アスペルギルス・クラバツス (*Aspergillus clavatus*) において同定された遺伝子の 1 つは、アルファ - グルコシダーゼをコードし、「*Aclglu1*」と呼ばれるこの遺伝子の配列は配列番号 4 で提供される。配列番号 4 によりコードされる対応するタンパク質は配列番号 5 で提供される。*Aclglu1* は、PFAM 検索 (pfam.sanger.ac.uk web link) に基づき、グリコシルヒドロラーゼファミリー 31 に属する。N 末端で、SignalP version 4.0 (Nordahl Petersen et al., 2011, Nature Methods, 8: 785-786) により予想した場合、タンパク質 (配列番号 5) は、19 アミノ酸長のシグナルペプチドを有する。シグナル配列の存在によって、*Aclglu1* が分泌型酵素であることが示唆される。予想される *Aclglu1* の成熟型のアミノ酸配列は配列番号 6 で示される。

【0275】

アスペルギルス・クラバツス (*Aspergillus clavatus*) アルファ - グルコシダーゼ *Aclglu1* の発現

合成 *Aclglu1* 遺伝子を pTrex3gM 発現ベクター (参照により本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第 2011/0136197 号明細書に記載) にクローニングし、得られたプラスミドを pJG294 と名付けた。DNA 配列決定によって *Aclglu1* 遺伝子の配列を確認した。

【0276】

遺伝子錠法 (Te'o VS et al., J Microbiol Methods, 51: 393-9, 2002) を用いて、プラスミド pJG294 を四重欠失トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 株 (国際公開第 05/001036 号パンフレットに記載) に形質転換した。配列番号 6 を含むと予想されたタンパク質が細胞外の培地に分泌され、ろ過した培養液を使用して、酵素発現を確認するために SDS-PAGE およびアルファ - グルコシダーゼ活性アッセイを行った。

【0277】

ネオサルトリア・フィシェリ (*Neosartorya fischeri*) アルファ - グルコシダーゼ *Nfiglu1* の発見

様々な産業応用において有用であり得る他の酵素の供給源候補として、ネオサルトリア・フィシェリ (*Neosartorya fischeri*) の株を選択した。ネオサルトリア・フィシェリ (*Neosartorya fischeri*) において同定された遺伝子の 1 つは、アルファ - グルコシダーゼをコードし、「*Nfiglu1*」と呼ばれるこの遺伝子の配列は配列番号 7 で提供される。配列番号 7 によりコードされる対応するタンパク質は、配列番号 8 で提供される。*Nfiglu1* は、PFAM 検索 (pfam.sanger.ac.uk web link) に基づき、グリコシルヒドロラーゼファミリー 31 に属する。N 末端で、タンパク質 (配列番号 8) は、SignalP version 4.0 (Nordahl Petersen et al., 2011, Nature Methods, 8: 785-786) により予想した場合、19 アミノ酸長のシグナルペ

10

20

30

40

50

チドを有する。シグナル配列の存在によって、N_f i g l u 1が分泌型酵素であることが示唆される。予想されるN_f i g l u 1の成熟型のアミノ酸配列は配列番号9で示される。

【0278】

ネオサルトリア・フィシェリ(*Neosartorya fischeri*)アルファ-グルコシダーゼN_f i g l u 1の発現

合成N_f i g l u 1遺伝子をpTrex3gM発現ベクター(米国特許出願公開第2011/0136197号明細書に記載)にクローニングし、得られたプラスミドをpJG295と名付けた。DNA配列決定によってN_f i g l u 1遺伝子の配列を確認した。

【0279】

遺伝子錠法(Te'o VS et al., J Microbiol Methods, 51:393-9, 2002)を用いて、プラスミドpJG295を四重欠失トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株(国際公開第05/001036号パンフレットに記載)に形質転換した。配列番号9を含むと予想されたタンパク質が細胞外の培地に分泌され、ろ過した培養液を使用して、酵素発現を確認するためにSDS-PAGEおよびアルファ-グルコシダーゼ活性アッセイを行った。

【0280】

ニューロスボラ・クラッサ(*Neurospora crassa*)アルファ-グルコシダーゼN_c r g l u 1の発見

様々な産業応用において有用であり得る他の酵素の供給源候補として、ニューロスボラ・クラッサ(*Neurospora crassa*)の株を選択した。ニューロスボラ・クラッサ(*Neurospora crassa*)において同定された遺伝子の1つは、アルファ-グルコシダーゼをコードし、「N_c r g l u 1」と呼ばれるこの遺伝子の配列は配列番号10で提供される。配列番号10によりコードされる対応するタンパク質は配列番号11で提供される。N_c r g l u 1は、PFAM検索(pfam.sanger.ac.uk web link)に基づき、グリコシリヒドロラーゼファミリー31に属する。N末端で、タンパク質(配列番号11)は、SignalP version 4.0(Nordahl Petersen et al., 2011, Nature Methods, 8:785-786)で予想した場合、22アミノ酸長のシグナルペプチドを有する。シグナル配列の存在によって、N_c r g l u 1が分泌型酵素であることが示唆される。予想されるN_c r g l u 1の成熟型のアミノ酸配列は配列番号12で示される。

【0281】

ニューロスボラ・クラッサ(*Neurospora crassa*)アルファ-グルコシダーゼN_c r g l u 1の発現

合成N_c r g l u 1遺伝子をpTrex3gM発現ベクター(米国特許出願公開第2011/0136197号明細書に記載)にクローニングし、得られたプラスミドをpJG296と名付けた。N_c r g l u 1遺伝子の配列をDNA配列決定によって確認した。

【0282】

遺伝子錠法(Te'o VS et al., J Microbiol Methods, 51:393-399, 2002)を用いて、プラスミドpJG296を四重欠失トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株(国際公開第05/001036号パンフレットに記載)に形質転換した。配列番号12を含むと予想されたタンパク質は細胞外の培地に分泌され、ろ過した培養液を使用して、酵素発現を確認するためにSDS-PAGEおよびアルファ-グルコシダーゼ活性アッセイを行った。

【0283】

ラサモソニア・コンポスティコラ(*Rasamsonia composticola*)アルファ-グルコシダーゼTauSec098の発見

様々な産業応用において有用であり得る他の酵素の供給源候補として、ラサモソニア・コンポスティコラ(*Rasamsonia composticola*)の株を選択した。ラサモソニア・コンポスティコラ(*Rasamsonia composticola*)

10

20

30

40

50

において同定された遺伝子の1つは、アルファ-グルコシダーゼをコードし、「TauSec098」と呼ばれるこの遺伝子の配列は配列番号13で提供される。配列番号13によりコードされる対応するタンパク質は配列番号14で提供される。TauSec098は、PFAM search(pfam.sanger.ac.uk web link)に基づき、グリコシリヒドロラーゼファミリー31に属し、N末端CBM20ドメインを含有する。N末端で、タンパク質(配列番号14)は、SignalP version 4.0(Nordahl Petersen et al., 2011, Nature Methods, 8: 785-786)に予想されるように22アミノ酸長のシグナルペプチドを有する。シグナル配列の存在から、TauSec098が分泌型酵素であることが示唆される。予想されるTauSec098の成熟型のアミノ酸配列は配列番号15で示される。

10

【0284】

ラサモソニア・コンポスティコラ(*Rasamsonia composticola*)アルファ-グルコシダーゼTauSec098の発現

Generay Biotech Co. (Shanghai, China)によって合成TauSec098遺伝子をトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)発現ベクターpGXT(pTTT由来プラスミド)にクローニングし、得られたプラスミドをpGX256-TauSec098と名付けた。TauSec098遺伝子の配列をDNA配列決定によって確認した。

20

【0285】

プロトプラスト形質転換(Te'oら et al., J. Microbiol. Methods 51: 393-399, 2002)を用いて、プラスミドpGX256-TauSec098を四重欠失トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株(国際公開第05/001036号パンフレットに記載)に形質転換した。唯一の窒素源としてアセトアミドを含有する培地(アセトアミド0.6g/L; 塩化セシウム1.68g/L; グルコース20g/L; リン酸二水素カリウム15g/L; 硫酸マグネシウム七水和物0.6g/L; 塩化カルシウム二水和物0.6g/L; 硫酸鉄(II)5mg/L; 硫酸亜鉛1.4mg/L; 塩化コバルト(II)1mg/L; 硫酸マンガン(II)1.6mg/L; 寒天20g/L; pH4.25)上で形質転換体を選択した。形質転換されたコロニー(約50~100個)が約1週間で出現した。アセトアミドプレート上で増殖後、形質転換体の胞子を回収し、新しいアセトアミド寒天プレート上に移した。アセトアミドプレート上で増殖5日後、1×10⁸個の胞子を250mL振盪フラスコ中の30mLグルコース/ソホロース限定培地に接種した。この振盪フラスコを28度5日間、振盪した。これらの培養物からの上清を使用して、発現(SDS PAGE)および成熟TauSec098酵素(配列番号15)の活性を確認した。

30

【0286】

ラサモソニア・コンポスティコラ(*Rasamsonia composticola*)アルファ-グルコシダーゼTauSec099の発見

様々な産業応用において有用であり得る他の酵素の供給源候補として、ラサモソニア・コンポスティコラ(*Rasamsonia composticola*)の株を選択した。

40

ラサモソニア・コンポスティコラ(*Rasamsonia composticola*)において同定された遺伝子の1つは、アルファ-グルコシダーゼをコードし、「TauSec099」と呼ばれるこの遺伝子の配列は配列番号16で提供される。配列番号16によりコードされる対応するタンパク質は配列番号17で提供される。TauSec099は、PFAM検索(pfam.sanger.ac.uk web link)に基づき、グリコシリヒドロラーゼファミリー31に属する。N末端で、SignalP version 4.0(Nordahl Petersen et al., 2011, Nature Methods, 8: 785-786)により予想した場合、このタンパク質(配列番号17)は17アミノ酸長のシグナルペプチドを有する。シグナル配列の存在から、TauSec099が分泌型酵素であることが示唆される。予想されるTauSec09

50

9の成熟型のアミノ酸配列は配列番号18で示される。

【0287】

ラサモソニア・コンポスティコラ (*Rasamsonia composticola*)

アルファ-グルコシダーゼTauSec099の発現

Generay Biotech Co. (Shanghai, China)によって合成TauSec099遺伝子がトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 発現ベクターpGXT (pTTT由来プラスミド) にクローニングされ、得られたプラスミドをpGX256-TauSec099と名付けた。TauSec099遺伝子の配列をDNA配列決定によって確認した。

【0288】

プロトプラスト形質転換 (Te'o et al., J. Microbiol. Methods 51: 393 - 399, 2002) を用いて、プラスミドpGX256-TauSec099を四重欠失トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 株 (国際公開第05/001036号パンフレットに記載) に形質転換した。唯一の窒素源としてアセトアミドを含有する培地 (アセトアミド0.6g/L; 塩化セシウム1.68g/L; グルコース20g/L; リン酸二水素カリウム15g/L; 硫酸マグネシウム七水和物0.6g/L; 塩化カルシウム二水和物0.6g/L; 硫酸鉄(II)5mg/L; 硫酸亜鉛1.4mg/L; 塩化コバルト(II)1mg/L; 硫酸マンガン(II)1.6mg/L; 寒天20g/L; pH4.25) 上で形質転換体を選択した。形質転換されたコロニー (約50~100個) が約1週間で出現した。アセトアミドプレート上の増殖後、形質転換体の胞子を回収し、新しいアセトアミド寒天プレート上に移した。アセトアミドプレート上の増殖5日後、1×10⁸個の胞子を250mL振盪フラスコ中の30mLグルコース/ソホロース限定培地に接種した。28度5日間、振盪フラスコを振盪した。これらの培養物からの上清を使用して、発現 (SDS PAGE) および成熟TauSec099酵素 (配列番号18) の活性を確認した。

【0289】

ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) アルファ-グルコシダーゼBloGlu1の配列

ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) 亜種ロンガム (*longum*) JDM301からアルファ-グルコシダーゼ遺伝子、「BloGlu1」を同定した。BloGlu1遺伝子に対する核酸配列 (配列番号19、GENBANK、受入番号NC014169.1、位置140600~142414の相補配列) および配列番号19によりコードされる仮説的なタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号20) がGENBANK受入番号YP_003660432.1で見出された。

【0290】

ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) アルファ-グルコシダーゼBloGlu1の発現

BloGlu1タンパク質全体 (配列番号20) をコードするDNA配列をB.サブチリス (*B. subtilis*) での発現に対して最適化し、次いで合成し (配列番号21をもたらす)、Generay Biotech Co. (Shanghai, China) によってp3JMプラスミドに挿入され、p3JM-BloGlu1が得られた。p3JM-BloGlu1プラスミドは、最適化BloGlu1配列 (配列番号21) の発現を推進するためのaprEプロモーターを含有する。

【0291】

B.サブチリス (*B. subtilis*) 細胞 (degUHy32, nprB, vpr, epr, scoC, wprA, mpr, ispA, bpr) を形質転換するために、プラスミドp3JM-BloGlu1を使用し、5ppmクロラムフェニコールを補給したルリア寒天プレート上に形質転換細胞を播種した。PCRおよび配列決定により確認した場合に正しい挿入があるコロニーを選択し、BloGlu1タンパク質 (配列番号20) を発現させるために、MBD培地 (さらなる5mM CaCl₂を補給し

10

20

30

40

50

たMOPSに基づく限定培地)が入った250mL振盪フラスコ中での発酵に供した。

【0292】

ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)アルファ-グルコシダーゼB1oGlu2の配列

アルファ-グルコシダーゼ、B1oGlu2をビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)から同定した。B1oGlu2のアミノ酸配列(配列番号22)がNCBIデータベース(GENBANK受入番号WP_007054665.1)で見出された。

【0293】

ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)アルファ-グルコシダーゼB1oGlu2の発現

B1oGlu2タンパク質をコードするDNA配列をB.サブチリス(*B. subtilis*)での発現に対して最適化し、次いで合成し(配列番号23をもたらす)、Generay Biotech Co.によってp3JMプラスミドに挿入され、p3JM-B1oGlu2が得られた。配列番号23は配列番号24のアミノ酸配列をコードする。p3JM-B1oGlu2プラスミドは、最適化B1oGlu2配列(配列番号23)の発現を推進するためのaprEプロモーターを含有する。

【0294】

B.サブチリス(*B. subtilis*)細胞(degUHy32、nprB、vpr、epr、scoc、wprA、mpr、ispA、bpr)を形質転換するために、プラスミドp3JM-B1oGlu2を使用し、5ppmクロラムフェニコールを補給したルリア寒天プレート上に形質転換細胞を播種した。PCRおよび配列決定により確認した場合に正しい挿入があるコロニーを選択し、B1oGlu2タンパク質(配列番号24)を発現させるために、MBD培地(さらなる5mM CaCl₂を補給したMOPSに基づく限定培地)が入った250mL振盪フラスコ中での発酵に供した。

【0295】

ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)アルファ-グルコシダーゼB1oGlu3の配列

ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)亜種ロンガム(*longum*)F8からアルファ-グルコシダーゼ遺伝子、「B1oGlu3」を同定した。B1oGlu3遺伝子に対する核酸配列(配列番号25、GENBANK受入番号NC_021008.1、位置2130627~2132441)および配列番号25によりコードされる仮説的なタンパク質のアミノ酸配列(配列番号26)がGENBANK受入番号YP_007768249.1で見出された。

【0296】

ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)アルファ-グルコシダーゼB1oGlu3の発現

B1oGlu3タンパク質全体(配列番号26)をコードするDNA配列をB.サブチリス(*B. subtilis*)での発現に対して最適化し、次いで合成し(配列番号27をもたらす)、Generay Biotech Co.によってp3JMプラスミドに挿入され、p3JM-B1oGlu3が得られた。p3JM-B1oGlu3プラスミドは、最適化B1oGlu3配列(配列番号27)の発現を推進するためのaprEプロモーターを含有する。

【0297】

B.サブチリス(*B. subtilis*)細胞(degUHy32、nprB、vpr、epr、scoc、wprA、mpr、ispA、bpr)を形質転換するために、プラスミドp3JM-B1oGlu3を使用し、5ppmクロラムフェニコールを補給したルリア寒天プレート上に形質転換細胞を播種した。PCRおよび配列決定により確認した場合に正しい挿入があるコロニーを選択し、B1oGlu3タンパク質(配列番号26)を発現させるために、MBD培地(さらなる5mM CaCl₂を補給し

10

20

30

40

50

たMOPSに基づく限定培地)が入った250mL振盪フラスコ中での発酵に供した。

【0298】

ビフィドバクテリウム・シュードロンガム(*Bifidobacterium pseudolongum*)アルファ-グルコシダーゼBpsGlu1の配列

ビフィドバクテリウム・シュードロンガム(*Bifidobacterium pseudolongum*)からアルファ-グルコシダーゼ、BpsGlu1を同定した。NCBIデータベース(GENBANK受入番号WP_022858408.1)においてBpsGlu1のアミノ酸配列(配列番号28)が見出された。

【0299】

ビフィドバクテリウム・シュードロンガム(*Bifidobacterium pseudolongum*)アルファ-グルコシダーゼBpsGlu1の発現

BpsGlu1タンパク質をコードするDNA配列を*B. subtilis*(*B. subtilis*)での発現に対して最適化し、次いで合成し(配列番号29をもたらす)、Generay Biotech Co.によってp3JMプラスミドに挿入され、p3JM-BpsGlu1が得られた。配列番号29は、配列番号30のアミノ酸配列をコードする。p3JM-BpsGlu1プラスミドは、最適化BpsGlu1配列(配列番号29)の発現を推進するためのaprEプロモーターを含有する。

【0300】

B. subtilis(*B. subtilis*)細胞(degUHy32、nprB、vpr、epr、scoc、wprA、mpr、ispA、bpr)を形質転換するために、プラスミドp3JM-BpsGlu1を使用し、5ppmクロラムフェニコールを補給したルリア寒天プレート上に形質転換細胞を播種した。PCRおよび配列決定により確認した場合に正しい挿入があるコロニーを選択し、BpsGlu1タンパク質(配列番号30)を発現させるために、MBD培地(さらなる5mM CaCl₂を補給したMOPSに基づく限定培地)が入った250mL振盪フラスコ中での発酵に供した。

10

20

【0301】

ビフィドバクテリウム・サーモフィルム(*Bifidobacterium thermophilum*)アルファ-グルコシダーゼBthGlu1の配列

ビフィドバクテリウム・サーモフィルム(*Bifidobacterium thermophilum*)RBL67からアルファ-グルコシダーゼ遺伝子、「BthGlu1」を同定した。BthGlu1遺伝子の核酸配列(配列番号31、GENBANK受入番号NC_020546.1、位置150690~152495)および配列番号31によりコードされる仮説的なタンパク質のアミノ酸配列(配列番号32)は、GENBANK受入番号YP_007592840.1で見出された。

30

【0302】

ビフィドバクテリウム・サーモフィルム(*Bifidobacterium thermophilum*)アルファ-グルコシダーゼBthGlu1の発現

BthGlu1タンパク質全体(配列番号32)をコードするDNA配列を*B. subtilis*(*B. subtilis*)での発現に対して最適化し、次いで合成し(配列番号33をもたらす)、Generay Biotech Co.によってp3JMプラスミドに挿入され、p3JM-BthGlu1が得られた。p3JM-BthGlu1プラスミドは、最適化BthGlu1配列(配列番号33)のプラスミドの発現を推進するためのaprEプロモーターを含有する。

40

【0303】

B. subtilis(*B. subtilis*)細胞(degUHy32、nprB、vpr、epr、scoc、wprA、mpr、ispA、bpr)を形質転換するために、プラスミドp3JM-BthGlu1を使用し、5ppmクロラムフェニコールを補給したルリア寒天プレート上に形質転換細胞を播種した。PCRおよび配列決定により確認した場合に正しい挿入があるコロニーを選択し、BthGlu1タンパク質(配列番号32)を発現させるために、MBD培地(さらなる5mM CaCl₂を補給し

50

たMOPSに基づく限定培地)が入った250mL振盪フラスコ中での発酵に供した。

【0304】

ビフィドバクテリウム・ブレブ(*Bifidobacterium breve*)アルファ-グルコシダーゼBb_rGlu₂の配列

ビフィドバクテリウム・ブレブ(*Bifidobacterium breve*)からアルファ-グルコシダーゼ、Bb_rGlu₂を同定した。Bb_rGlu₂のアミノ酸配列(配列番号34)がNCBIデータベース(GENBANK受入番号WP_003827971.1)で見出された。

【0305】

ビフィドバクテリウム・ブレブ(*Bifidobacterium breve*)アルファ-グルコシダーゼBb_rGlu₂の発現

Bb_rGlu₂タンパク質をコードするDNA配列をB.サブチリス(*B. subtilis*)での発現に対して最適化し、次いで合成し(配列番号35をもたらす)、Generay Biotech Co.によってp3JMプラスミドに挿入され、p3JM-Bb_rGlu₂が得られた。配列番号35は、配列番号36のアミノ酸配列をコードする。p3JM-Bb_rGlu₂プラスミドは、最適化Bb_rGlu₂配列(配列番号35)の発現を推進するためのaprEプロモーターを含有する。

【0306】

B.サブチリス(*B. subtilis*)細胞(degUHy32、nprB、vpr、epr、scoc、wprA、mpr、ispA、bpr)を形質転換するために、プラスミドp3JM-Bb_rGlu₂を使用し、5ppmクロラムフェニコールを補給したルリア寒天プレート上に形質転換細胞を播種した。PCRおよび配列決定により確認した場合に正しい挿入があるコロニーを選択し、配列番号36を発現させるために、MBD培地(さらなる5mM CaCl₂を補給したMOPSに基づく限定培地)が入った250mL振盪フラスコ中での発酵に供した。

【0307】

ビフィドバクテリウム・ブレブ(*Bifidobacterium breve*)アルファ-グルコシダーゼBb_rGlu₅の配列

ビフィドバクテリウム・ブレブ(*Bifidobacterium breve*)ACS-071-V-Sch8bからアルファ-グルコシダーゼ遺伝子「Bb_rGlu₅」を同定した。Bb_rGlu₅遺伝子(配列番号37、GENBANK受入番号NC_017218.1、位置2241075~2242895の配列の相補体)の核酸配列および配列番号37によってコードされる仮説的なタンパク質のアミノ酸配列(配列番号38)がGENBANK受入番号YP_005583701.1で見出された。

【0308】

ビフィドバクテリウム・ブレブ(*Bifidobacterium breve*)アルファ-グルコシダーゼBb_rGlu₅の発現

Bb_rGlu₅タンパク質全体(配列番号38)をコードするDNA配列をB.サブチリス(*B. subtilis*)での発現に対して最適化し、次いで合成し(配列番号39をもたらす)、Generay Biotech Co.によってp3JMプラスミドに挿入され、p3JM-Bb_rGlu₅が得られた。p3JM-Bb_rGlu₅プラスミドは、最適化Bb_rGlu₅配列(配列番号39)の発現を推進するためのaprEプロモーターを含有する。

【0309】

B.サブチリス(*B. subtilis*)細胞(degUHy32、nprB、vpr、epr、scoc、wprA、mpr、ispA、bpr)を形質転換するために、プラスミドp3JM-Bb_rGlu₅を使用し、5ppmクロラムフェニコールを補給したルリア寒天プレート上に形質転換細胞を播種した。PCRおよび配列決定により確認した場合に正しい挿入があるコロニーを選択し、Bb_rGlu₅タンパク質(配列番号38)を発現させるために、MBD培地(さらなる5mM CaCl₂を補給し

10

20

30

40

50

たMOPSに基づく限定培地)が入った250mL振盪フラスコ中の発酵に供した。

【0310】

発現培養からのアルファ-グルコシダーゼAc1G1u1およびNcrG1u1の精製
2つのクロマトグラフィー工程を使用して、Ac1G1u1(配列番号6)およびNcrG1u1(配列番号12)の両方のアルファ-グルコシダーゼを精製した。各精製に対して、振盪フラスコからの粗製プロスを濃縮し、その後、硫酸アンモニウムを添加し、2Mの最終濃度にした。20mM Tris pH 8.0、2M硫酸アンモニウムで予め平衡化した50mLフェニルHPカラム上に溶液を載せた。標的タンパク質(配列番号6または配列番号12)を1M硫酸アンモニウム、20mM Tris pH 8.0でカラムから溶出させた。個々の分画をプールし、濃縮し、VIVAFLOW 200限外ろ過装置(Sartorius Stedim)を用いて緩衝液を20mM Tris pH 8.0(緩衝液A)に交換した。得られた溶液を、緩衝液Aで予め平衡化した40mL Q HPカラムに適用した。標的タンパク質を緩衝液A中の0.3M NaClでカラムから溶出させた。次いで標的タンパク質を含有する分画をプールし、10K AMICON ULTRA-15装置を用いて濃縮し、使用するまで-20で40%グリセロール中で保存した。
10

【0311】

Nf1G1u1

2つの疎水性相互作用クロマトグラフィー工程を使用してNf1G1u1アルファ-グルコシダーゼ(配列番号9)を精製した。振盪フラスコからの粗製プロスを濃縮し、その後、硫酸アンモニウムを添加し、1Mの最終濃度にした。20mM Tris pH 8.0、1M硫酸アンモニウムで予め平衡化した50mLフェニルHPカラム上に溶液を載せた。標的タンパク質(配列番号9)はカラムを通過した。フロースルーフィルターを用いて分画をプールし、その後、硫酸アンモニウムを添加し、2Mの最終濃度にした。20mM Tris pH 8.0、2M硫酸アンモニウムで予め平衡化した同じフェニルHPカラム上に溶液を載せた。標的タンパク質を1M硫酸アンモニウム、20mM Tris pH 8.0でカラムから溶出させた。次いで標的タンパク質を含有する分画をプールし、10K AMICON ULTRA-15装置を用いて濃縮し、使用するまで-20で40%グリセロール中で保存した。

【0312】

TauSec098およびTauSec099

疎水性相互作用クロマトグラフィーを介してTauSec098(配列番号15)およびTauSec099(配列番号18)の両アルファ-グルコシダーゼを精製した。各精製に対して、7L発酵槽からの約180mLの濃縮粗製プロスに硫酸アンモニウムを添加し、1Mの最終濃度にした。次いでこの溶液を20mM酢酸ナトリウムpH 5.0、1M硫酸アンモニウム(緩衝液A)で予め平衡化した50mL HIPREPフェニル-FFセファロースカラム(GE Health care)上に載せた。3カラム体積(CV)で同じ緩衝液で洗浄した後、各3CVを用いて75%、50%および0%緩衝液Aで、続いて2CVのMILLI-Q H₂Oでカラムを段階的に溶出した。SDS-PAGEによって全分画を分析した。標的タンパク質(配列番号15または配列番号18)はフロースルーフィルターを用いて過剰な硫酸アンモニウムを除去するために緩衝液を交換した。90%純度を超えた最終生成物を使用するまで-80で40%グリセロール中で保存した。
30
40

【0313】

B1oG1u1、B1oG1u2およびB1oG1u3

B1oG1u1(配列番号20)、B1oG1u2(配列番号24)およびB1oG1u3(配列番号26)アルファ-グルコシダーゼを全て3工程で精製した。各精製に対して、1L DASGIP発酵槽からの粗製プロスを濃縮し、その後、硫酸アンモニウムを添加して60%飽和にした。溶液を4で1時間攪拌し、次いで8000×gで30分間遠心した。得られたペレットを20mM Tris pH 8.0(緩衝液A)中で再懸濁した。得られた溶液に硫酸アンモニウムを添加して、1Mの最終濃度にし;次いでこの標品を

10

20

30

40

50

20 mM Tris pH 8.0、1 M 硫酸アンモニウム（緩衝液B）で予め平衡化した40 mL Hi Prep（商標）フェニルFFカラム上に載せた。洗浄後、各3カラム体積で75%、50%および0%緩衝液BおよびH₂Oでカラムを段階的に溶出した。SDS-PAGE、活性アッセイを使用して全分画を分析した。標的タンパク質（配列番号20、配列番号24または配列番号26）を含有する分画をプールし、濃縮し、続いて20 mM リン酸ナトリウムpH 7.0、0.15 M NaClで予め平衡化したHi Load（商標）26/60 Superdex（商標）75カラム上に載せた。次いで標的タンパク質を含有するフロースルーフィルターを用いて濃縮し、使用するまで -20°で40%グリセロール中で保存した。

【0314】

10

BpsGlu1およびBthGlu1

BpsGlu1（配列番号30）およびBthGlu1（配列番号32）の両アルファ-グルコシダーゼを2工程で精製した。各精製に対して、1 L DASGIP発酵槽からの粗製プロスを濃縮し、その後、硫酸アンモニウムを添加して60%飽和にした。溶液を4で1時間攪拌し、次いで8000×gで30分間遠心した。得られたペレットを20 mM Tris pH 8.0（緩衝液A）中で再懸濁した。得られた溶液に硫酸アンモニウムを添加して、1Mの最終濃度にし；次いでこの標品を20 mM Tris pH 8.0、1 M 硫酸アンモニウム（緩衝液B）で予め平衡化した40 mL Hi Prep（商標）フェニルFFカラム上に載せた。洗浄後、それぞれ3カラム体積で、75%、50%および0%緩衝液BおよびH₂Oでカラムを段階的に溶出した。SDS-PAGEおよび活性アッセイを使用して全分画を分析した。標的タンパク質（配列番号30または配列番号32）は0%緩衝液B溶出工程からの溶出液中に存在し；この溶出液をプールし、10 K AMICON ULTRA-15装置を用いて濃縮した。95%純度より高かった最終生成物を使用するまで -20°で40%グリセロール中で保存した。

20

【0315】

20

BbrGlu2およびBbrGlu5

BbrGlu2（配列番号36）およびBbrGlu5（配列番号38）の両アルファ-グルコシダーゼを4工程で精製した。各精製に対して、1 L DASGIP発酵槽からの粗製プロスを濃縮し、その後、硫酸アンモニウムを添加して60%飽和にした。溶液を4で1時間攪拌し、次いで8000×gで30分間遠心した。得られたペレットを20 mM HEPES pH 7.0（緩衝液A）中で再懸濁した。得られた溶液に硫酸アンモニウムを添加して、1Mの最終濃度にし；次いでこの標品を20 mM HEPES pH 7.0、1 M 硫酸アンモニウムで予め平衡化したHi Prep（商標）フェニルFFカラム上に載せた。標的タンパク質（配列番号36または配列番号38）を0.5 M 硫酸アンモニウムでカラムから溶出させた。個々の分画をプールし、濃縮し、VIVAFLOW200限外ろ過装置（Sartorius Stedim）を用いて緩衝液を緩衝液Aに交換した。得られた溶液を緩衝液Aで予め平衡化したHi Prep（商標）Q FF16/10カラムに適用した。標的タンパク質を緩衝液A中の0~0.5 M NaClの直線状勾配でカラムから溶出させた。標的タンパク質を含有する分画をプールし、濃縮し、続いて20 mM HEPES pH 7.0、0.15 M NaClで予め平衡化したHi Load（商標）26/60 Superdex（商標）75カラム上に載せた。次いで標的タンパク質を含有する分画をプールし、10 K AMICON ULTRA-15装置を用いて濃縮し、使用するまで -20°で40%グリセロール中で保存した。

30

【0316】

40

このようにして、様々なさらなるアルファ-グルコシダーゼを発現させ、精製した。以下で提供する実施例11、12、15および16において、アルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合およびアルファ-1,3および/またはアルファ-1,6グルコシル-グルコース結合に対する加水分解活性について、これらのアルファ-グルコシダーゼを試験した。

【0317】

50

実施例 1 1

様々なグリコシド結合に対する加水分解活性に対するアルファ - グルコシダーゼの試験
この実施例は、アルファ - グルコシダーゼがこのクラスの酵素 (E C 3 . 2 . 1 . 2 0)
にこれまで関連付けられていたものを超える加水分解活性を有し得るか否かを試験することを開示する。実施例 1 0 からのアルファ - グルコシダーゼは、アルファ - 1 , 5 グルコシル - フルクトース結合およびアルファ - 1 , 3 およびアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合に対する加水分解活性を有することが示された。

【 0 3 1 8 】

アルファ - グルコシダーゼの基質特異性

アルファ - グルコシダーゼとともに基質を温置した場合の特定の基質 (イソマルトース、マルトース、パノース、ロイクロースまたはニゲロース) からのグルコースの放出に基づいて、実施例 1 0 で開示される各アルファ - グルコシダーゼの基質特異性をアッセイした。
。共役グルコースオキシダーゼ / ペルオキシダーゼ (G O X / H R P) 法 (1 9 8 0 , A n a l . B i o c h e m . 1 0 5 : 3 8 9 - 3 9 7) を用いてグルコース放出速度を測定した。グルコースと反応した共役 G O X / H R P 酵素から生成されたペルオキシドによる 2 , 2 ' - アジノ - ビス 3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸 (A B T S) の酸化の速度としてグルコース放出を定量した。

【 0 3 1 9 】

1 5 m L コニカルチューブ中で 9 m L 基質溶液 (水中 1 %, w / v) を 1 m L の 0 . 5 M p H 5 . 0 酢酸ナトリウム緩衝液および 4 0 μ L の 0 . 5 M 塩化カルシウムと混合することによって、個々の基質溶液を調製した。 2 . 7 4 m g / m L A B T S , 0 . 1 U / m L H R P および 1 U / m L G O X の最終濃度で、 A B T S 入りの共役酵素 (G O X / H R P) 溶液を 5 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5 . 0) 中で調製した。個々のアルファ - グルコシダーゼ試料およびグルコース標準物質の連続希釈液を M I L L I Q 水中で調製した。ニゲロースの場合、基質溶液の保存の限界ゆえに 1 0 p p m の用量のみでアルファ - グルコシダーゼ試料を試験した。 5 0 で 5 分間 6 0 0 r p m で予め温置した 9 0 μ L の基質溶液を含有する新しいマイクロタイタープレート (C o r n i n g 3 6 4 1) に各アルファ - グルコシダーゼ試料 (1 0 μ L) を移した。 T H E R M O M I X E R (E p p e n d o r f) 中で振盪 (6 0 0 r p m) しながら、 5 0 で 1 0 分間 (イソマルトース、マルトース、パノースおよびニゲロース基質の場合) または 6 0 分間 (ロイクロース基質の場合) 、反応を行った。次いで、 1 0 μ L の各反応混合物ならびにグルコース標準物質の 1 0 μ L の連続希釈液をそれぞれ新しいマイクロタイタープレート (C o r n i n g 3 6 4 1) に素早く移し、次いでこれに 9 0 μ L の A B T S / G O X / H R P 溶液を適切に添加した。 S O F T M A X P R O プレートリーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s) を用いて、 4 0 5 n m で 1 1 秒間隔で 5 分間、反応混合物を含有するマイクロタイタープレートを直ちに測定した。アウトプットは、各酵素濃度に対する反応速度、 V o であった。直線回帰を使用して、プロット V o 対酵素用量の傾斜を決定した。式 1 : 比活性 (単位 / m g) = 傾斜 (酵素) / 傾斜 (s t d) × 1 0 0 0 (1)
(式中、 1 単位 = 1 μ m o l グルコース / 分)

を用いて、グルコース標準曲線に基づき、各アルファ - グルコシダーゼの特異的な活性を計算した。ニゲロースの場合、酵素活性を示すために、 1 0 p p m の酵素用量での反応速度の値を直接使用した。

【 0 3 2 0 】

先行する方法を用いて、各アルファ - グルコシダーゼの特異性を各基質に対して測定した。各基質に対するオリゴ - 1 , 6 - グルコシダーゼ (M e g a z y m e より購入、表 4 参照) およびトランスクルコシダーゼ (T G L - 2 0 0 0 、表 4 参照) の活性も測定した。この分析の結果を表 1 7 に示す。

【 0 3 2 1 】

10

20

30

40

50

【表 24】

表 17
様々な基質に対する様々なアルファ-グルコシダーゼの活性

酵素	配列番号	次のものに対して測定した場合の酵素活性(U/mg):				
		イソマルトース	マルトース	バノース	ロイクロース	ニゲロース ^a
オリゴ-1,6-グルコシダーゼ		118.2	0.0	54.3	1.3	19.6
TG L-2000	1	194.0	235.6	127.7	68.9	254.0
AclGlu1	6	255.7	401.9	180.9	113.7	315.1
NfiGlu1	9	521.2	360.0	126.9	89.4	264.3
NcrGlu1	12	282.7	34.9	15.9	61.6	200.4
TauSec098	15	54.9	123.8	23.8	1.8	305.6
TauSec099	18	244.0	97.7	50.8	70.6	184.8
BloGlu1	20	71.1	66.9	23.1	2.5	165.0
BloGlu2	24	65.9	86.7	19.9	3.5	217.9
BloGlu3	26	120.1	175.5	31.4	9.0	272.6
BspGlu1	30	64.2	247.9	60.8	27.3	254.6
BthGlu1	32	108.3	93.3	21.1	68.4	128.5
BbrGlu2	36	106.6	167.5	26.9	6.1	258.8
BbrGlu5	38	925.8	0.0	279.7	2.8	22.1

^a 各酵素は、ニゲロースに対して 1 種類の投与量(10ppm)で使用した。

【0322】

興味深いことに、アルファ - グルコシダーゼは、アルファ - 1 , 4 グルコシル - グルコース結合 (マルトース) に対する加水分解活性を示すこと以外に、アルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合 (イソマルトース)、アルファ - 1 , 3 グルコシル - グルコース結合 (ニゲロース) およびアルファ - 1 , 5 グルコシル - フルクトース結合 (ロイクロース) に対する加水分解活性も示すことが分かった (表 17)。

【0323】

したがって、アルファ - グルコシダーゼは、E C 3 . 2 . 1 . 2 0 酵素にこれまで関連付けられていたものを超える加水分解活性を有する。具体的に、アルファ - グルコシダーゼは、アルファ - 1 , 5 グルコシル - フルクトース結合およびアルファ - 1 , 3 およびアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合に対する加水分解活性を有する。

【0324】

実施例 1 2

アルファ - グルコシダーゼを用いたグルカン反応ろ液中のロイクロースおよびオリゴ糖の加水分解

この実施例は、グルカン合成反応から得られたろ液中に存在するロイクロースおよび他のオリゴ糖を加水分解するためにアルファ - グルコシダーゼを使用することを記載する。具体的に、不溶性グルカン (ポリアルファ - 1 , 3 - グルカン) 合成反応のろ液中のロイクロースおよびオリゴ糖 D P 2 、D P 3 および H S (高級糖類、D P 4 +) の加水分解における実施例 1 0 で開示されるアルファ - グルコシダーゼの効果を試験した。

【0325】

アルファ - グルコシダーゼ活性に対して試験するためのオリゴ糖の単離および分析第一に、グルカン合成反応の濃縮ろ液を実施例 1 のように調製した。

10

20

30

40

50

【0326】

簡潔に述べると、クロマトグラフィー分離によって、オリゴ糖を濃縮ろ液から単離し、グリコシド結合プロファイルについて分析した。強酸陽イオン交換樹脂を使用するクロマトグラフィー分離を使用して、濃縮ろ液のオリゴ糖分画を単離した。この分離に使用したカラムの物理学的パラメーターは次のとおりであった：FINEX CS11GC、#227樹脂；Na⁺イオン型；5%ジビニルベンゼン（架橋）；0.34mm粒径；1.64mベッド長；0.093mカラム直径。

【0327】

より詳細には、表3に記載の濃縮糖溶液（すなわち濃縮ろ液）をろ過し、水道水を用いて25g乾燥固体/100g溶液に希釈した。この糖溶液をカラム樹脂に添加する前に、樹脂を6ベッド体積(BV)の塩化ナトリウム溶液(10wt%塩化ナトリウムで3BV、続いて5wt%塩化ナトリウムで3BV)で洗浄して、樹脂をナトリウム型に変換した。次いで糖溶液(0.6L)をカラムに加え、その後、50mL/分の流速で水を用いてカラムを溶出した。クロマトグラフィー分離の操作条件を次のとおりまとめる：0.6Lフイードサイズ、25g乾燥固体/100g溶液、65カラム温度、50mL/分流速。11~21分でオリゴ糖溶液が溶出された。伝導度の上昇により示される少量の塩が同時に溶出された。このようにして調製したオリゴ糖分画をHPLCによって分析して、その生成物分布を決定した。全体で、分画は、3単位以上のヘキソース単位を含有するオリゴ糖>89%および1.5%未満の識別可能な单糖および二糖を含有した。薄フィルム蒸発器(LCI Corporation, Charlotte, NC)、続いてROTAVAPOR(R-151; Buchi, New Castle, DE)を用いたロータリーエバポレーターを使用して、この分画を317g/Lの総乾燥重量に濃縮した。HPLCにより測定した場合の濃縮分画の生成物分布を表18に示す。

【0328】

【表25】

表18
濃縮オリゴ糖分画の生成物分布

	スクロース	ロイクロース	グルコース	フルクトース	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	合計
g/L	0.0	2.5	0.0	0.7	31.5	75.9	101.8	62.1	26.9	15.3	316.7
wt%	0.0	0.8	0.0	0.2	9.9	23.9	32.1	19.6	8.5	4.8	100

【0329】

グルカンオリゴマー加水分解におけるアルファ-グルコシダーゼの一次スクリーニング11種類の異なるアルファ-グルコシダーゼ（実施例10）の活性ならびに2種類のベンチマーク酵素、オリゴ-1,6-グルコシダーゼ（Megazymeより購入）およびトランスグルコシダーゼ（TGL-2000）の活性を上記で調製した精製オリゴ糖分画に対して個々に評価した（表18）。60でpH5.0のオリゴ糖基質（2.9%乾燥固体）および2mM塩化カルシウムを含有する溶液中で各アルファ-グルコシダーゼ（1mg/mLで調葉）を温置した。50μLの0.5M NaOHを添加することによって、温置24時間後に各反応を反応停止させた。

【0330】

停止させた反応物のオリゴ糖/单糖含量を次のように決定した。HPLC分析のために、各反応の試料を水中で5倍希釈した。85にてAMINEX HPX-42Aカラム（300mm×7.8mm）でAgilent 1200シリーズHPLCシステムを用いてHPLC分離を行った。試料（10μL）をHPLCカラムに適用し、0.6mL/分の流速で移動相としてMILLI-Q水の均一勾配で分離した。屈折率検出器を用いてオリゴ糖生成物を検出した。下記表19に示される数字は、DP1~DP7の合計の分画としての各DPnのピーク面積パーセンテージの平均（各試料の2つ組から）を反映する。

【0331】

10

20

30

40

50

【表 2 6】

表 19
アルファ-グルコシダーゼでの処理後の分析グルカンろ液オリゴ糖

酵素	配列番号	DP7%	DP6%	DP5%	DP4%	DP3%	DP2%	DP1%
オリゴ-1,6-グルコシダーゼ		0.0	0.6	8.7	27.9	21.9	12.2	28.7
TG L-2000	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	97.0
Nfiglu1	9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	98.1
Ncrglu1	12	0.0	0.0	0.0	2.8	1.6	7.0	88.6
TauSec098	15	0.0	0.0	0.0	15.3	0.0	4.5	80.2
TauSec099	18	0.0	0.0	0.0	15.7	0.0	0.5	83.7
BloGlu1	20	0.0	0.0	6.7	36.3	35.6	0.0	21.3
BloGlu2	24	0.0	0.7	8.6	31.2	34.9	14.0	10.7
BloGlu3	26	0.0	0.6	8.0	28.4	33.5	13.9	15.6
BspGlu1	30	0.0	0.5	5.2	15.4	16.2	8.2	54.5
BthGlu1	32	0.0	0.0	13.0	12.6	2.0	1.9	70.5
BbrGlu2	36	0.0	0.0	21.5	30.7	24.6	0.0	23.3
BbrGlu5	38	0.0	0.0	8.1	23.8	12.1	15.5	40.5
ブランク		0.0	0.0	16.2	38.6	30.4	0.0	14.8

10

20

【0 3 3 2】

表 19 で影を付したもので示されるように、反応のオリゴ糖含量は、一般的に、酵素がなかった対照反応（「ブランク」）と比較して、より小さいサイズの糖に向かってシフトした。これらの結果から、グルカン合成反応およびその分画内に含まれるオリゴ糖を加水分解するために、アルファ - グルコシダーゼを使用し得ることが示される。また、オリゴ糖の結合プロファイル（実施例 3 および 4 ）およびアルファ - 1, 4 結合に加えて様々なグリコシド結合に対するアルファ - グルコシダーゼの活性（実施例 11 ）を考慮すると、アルファ - 1, 5 グルコシル - フルクトース結合および / またはアルファ - 1, 3 およびアルファ - 1, 6 グルコシル - グルコース結合があるオリゴ糖を分解するために、アルファ - グルコシダーゼを使用することができると思われる。表 19 に示される結果はまた、細菌アルファ - グルコシダーゼと比較して、真菌アルファ - グルコシダーゼが可溶性オリゴ糖に対してより良好な加水分解活性を有することも示唆する。

30

【0 3 3 3】

グルカン合成反応のオリゴ糖生成物に対するアルファ - グルコシダーゼ加水分解活性の確認 1 または 2 種類のアルファ - グルコシダーゼおよびポリアルファ - 1, 3 - グルカン合成反応から得た濃縮ろ液を含む反応物を調製した（表 3 ）。 4 p p m の酵素を用いてアルファ - グルコシダーゼ反応を行うか、または混合物の場合、 1 : 1 の比で、 4 p p m の最終用量で各酵素を使用した。各反応において濃縮ろ液を 10 % 乾燥固体で載せた。各反応物は、 pH 5.0 で 2 mM 塩化カルシウムをさらに含み、 60 または 65 で行った。 2 3 時間温置後、 50 μL の 0.5 M NaOH を添加することによって、反応を停止させた。

40

【0 3 3 4】

停止させた反応物のオリゴ糖 / 単糖含量を次のように決定した。 HPLC 分析のために、各反応の試料を水中で 25 倍希釈した。 85 にて AMINEX HPX - 42A カラム（ 300 mm × 7.8 mm ）で Agilent 1200 シリーズ HPLC システムを用いて HPLC 分離を行った。試料（ 10 μL ）を HPLC カラムに適用し、 0.6 mL / 分の流速で移動相として MILLI-Q 水の均一勾配で分離した。屈折率検出器を用いてオリゴ糖生成物を検出した。下記表 20 に示される数字は、全体の分画としての各 DPn のピーク面積パーセンテージの平均（各試料の 2 つ組から）を反映する。表 20 に示され

50

る結果から、表19に示された結果に関して上記で論じられるように、一般的にある種のアルファ-グルコシダーゼの活性が確認される。

【 0 3 3 5 】

【表 2 7】

温度 ℃	酵素 配列番号	アリファ-グルコシダーゼでの処理後の分析グルカンろ過液						フルクト- ゾ%					
		DP7+%	DP6%	DP5%	DP4%	DP3%	DP2%						
60 ℃	TG L-2000	1	5.8	0.2	0.4	1.2	1.8	2.0	6.2	0.0	32.0	50.4	
	TauSec098	15	5.4	0.0	0.1	0.2	0.3	1.9	3.4	25.4	26.2	37.1	
	TauSec099	18	6.0	0.2	0.5	1.2	1.8	2.3	6.8	0.0	30.4	50.8	
	TauSec098+	15、 TauSec099	18	6.4	0.1	0.1	0.2	0.5	2.2	8.1	0.0	32.4	50.0
	TauSec098+	15、 TG L-2000	1	6.3	0.1	0.1	0.2	0.4	1.8	8.1	0.0	32.9	50.1
	ブランク		5.4	0.2	0.4	1.0	1.6	2.4	2.9	25.1	22.7	38.2	
	TG L-2000	1	6.3	0.1	0.4	1.1	1.7	2.2	6.7	0.0	31.6	49.8	
	TauSec098	15	5.8	0.1	0.2	0.2	0.3	1.6	3.3	24.5	27.2	36.7	
	TauSec099	18	6.3	0.2	0.5	1.1	1.7	2.1	6.1	0.0	32.3	49.7	
	TauSec098+ TauSec099	15、 18	6.7	0.0	0.1	0.2	0.4	1.7	7.8	0.0	34.0	49.2	
65 ℃	TauSec098+ TG L-2000	15、 1	6.8	0.1	0.2	0.2	0.4	1.8	7.6	0.0	33.9	49.1	
	ブランク		6.0	0.1	0.3	0.9	1.4	2.1	3.0	24.5	23.8	37.7	

【 0 3 3 6 】

このように、ポリアルファ-1,3-グルカン合成反応などのグルカン合成反応から得られる分画（例えはろ液）に存在するロイクロースおよび他のオリゴ糖を加水分解するために、アルファ-グルコシダーゼを使用することができる。

(0 3 3 7)

寒施例 1 3

g t f - S / M U T 3 3 2 5 反応からのオリゴマー／ロイクロース分画の単離
 9 . 5 L の最終総体積中で蒸留脱イオン水中でスクロース (4 . 5 0 k g) を溶解させ、
 8 0 で 5 分間で攪拌しながら、得られた溶液を加熱し、次いで 4 7 に冷却した。攪拌
 しながら、0 . 6 g / L の g t f - S 酵素 (G T F 0 4 5 9 、配列番号 4 2) および 1 0
 g / L のムタナーゼ (M U T 3 3 2 5 、配列番号 4 7) を含有する 1 5 . 0 m L の粗製抽出物を含有する 5 0 0 グラムの粗製抽出物を攪拌しながら添加した（酵素調製のため的一般的方法を参照）。攪拌しながら 3 7 w t % H C l の 1 : 1 0 (v / v) 希釀液をゆっくりと添加することによって、得られた混合物の pH を pH 5 . 5 ~ pH 6 . 0 に直ちに調整した。スクロース変換が H P L C 分析によって > 9 5 % になるまで、反応温度および pH をそれぞれ 4 7 および pH 5 . 5 ~ 6 . 0 に維持し、その後、反応混合物を pH 7 . 0 ~ 7 . 5 に直ちに調整し、9 0 に 2 0 分間加熱し、次いで粒子および沈殿物を除去するために即時ろ過するため、2 5 に冷却した。次の樹脂および条件：C a 2 + 型の F I N E X C S 1 1 G C S A C 、カラム i . d = 9 . 3 c m 、樹脂ベッド高 1 . 5 8 m 、T = 7 0 、流速 = 5 1 m L / 分、直線的流速 = 0 . 4 4 m / h 、フィードサイズ = 0 . 6 L = 1 7 1 g 、フィード R I - D S = 2 5 . 1 g / 1 0 0 g 、試料間隔 = 3 分を用いた I E X / S E C カラムクロマトグラフィーの前に、得られたろ液を 5 で保持した。3 0 分 ~ 6 7 分で回収されたカラム分画を合わせ、6 6 % 溶解固形物になるまで蒸発によって濃縮し、一般的方法に記載のとおり H P L C により分析した。表 2 1 は、このようにして調製された単離分画のオリゴ糖および单糖成分を示す。

【 0 3 3 8 】

【表 2 8 】

表 21
g t f - S / M U T 3 3 2 5 反応からのオリゴマー／ロイクロース分画の分析

DP7+ (%DS)	DP6 (%DS)	DP5 (%DS)	DP4 (%DS)	DP3 (%DS)	DP2 (%DS)	スクロース (%DS)	ロイクロース (%DS)	グルコース (%DS)	フルクトース (%DS)
0	1.1	2.9	7.2	16.2	12.7	13.5	30.7	7.9	7.9

【 0 3 3 9 】

この実施例において、少なくとも 1 つの可溶性アルファ - グルカン生成物を生成させるために、グルカン合成反応を使用した。この可溶性生成物は、両方ともグルコシルトランスフェラーゼ反応中に存在した、グルコシルトランスフェラーゼ (G T F 0 4 5 9 、配列番号 4 2) およびアルファ - グルカノヒドロラーゼ (M U T 3 3 2 5 、配列番号 4 7) の両方の協奏作用から得られた。この実施例はまた、グルカン合成反応からのクロマトグラフィー分画の調製も明らかにした。以下の実施例 1 5 および 1 6 でこの分画を使用して、それに対するアルファ - グルコシダーゼの活性を試験した。

【 0 3 4 0 】

実施例 1 4

G t f - C 反応からのオリゴマー／ロイクロース分画の単離

蒸留脱イオン水中でスクロース (4 . 5 0 k g) を溶解させて最終総体積を 9 . 5 L にし、得られた溶液を 8 0 で 5 分間、攪拌しながら加熱し、次いで 4 7 に冷却した。攪拌しながら、0 . 4 1 g / L の g t f - C 酵素 (G T F 0 0 8 8 B s T 1 、配列番号 4 5) を含有する 5 0 0 グラムの粗製抽出物を攪拌しながら添加した（酵素調製に対する一般的方法を参照）。攪拌しながら 3 7 w t % H C l の 1 : 1 0 (v / v) 希釀液をゆっくりと添加することによって、得られた混合物の pH を pH 5 . 5 ~ pH 6 . 0 に直ちに調整した。スクロース変換が H P L C 分析によって > 9 5 % になるまで、反応温度および pH をそれぞれ 4 7 および pH 5 . 5 ~ 6 . 0 に維持し、その後、反応混合物を直ちに pH 7 . 0 ~ 7 . 5 に調整し、9 0 に 2 0 分間加熱し、次いで粒子および沈殿物を除去するために即時ろ過するため、2 5 に冷却した。次の樹脂および条件：C a 2 + 型の F I N E

10

20

30

40

50

X C S 1 1 G C S A C、カラム i . d = 9 . 3 c m、樹脂ベッド高 1 . 5 8 m、T = 7 0 、流速 = 5 0 m L / 分、直線的流速 = 0 . 4 4 m / h、フィードサイズ = 0 . 6 L = 1 7 1 g、フィード R I - D S = 2 5 . 8 g / 1 0 0 g、試料間隔 = 3 分を用いた I E X / S E C カラムクロマトグラフィー前に、得られたろ液を 5 で保持した。3 4 分～7 2 分で回収したカラム分画を合わせ、蒸発により濃縮して 6 7 % 溶解固体にし、一般的方法に記載のように H P L C によって分析した。表 2 2 は、このように調製された単離分画のオリゴ糖および单糖成分を示す。

【0 3 4 1】

【表 2 9】

表 22
Gtf-C 反応からのオリゴマー/ロイクロース分画の分析

DP7+ (%DS)	DP6 (%DS)	DP5 (%DS)	DP4 (%DS)	DP3 (%DS)	DP2 (%DS)	スクロース (%DS)	ロイクロース (%DS)	グルコース (%DS)	フルクトース (%DS)
1.2	0.9	1.5	2.6	5.4	13.2	2.5	59.9	6.9	5.7

【0 3 4 2】

この実施例において、少なくとも 1 つの可溶性アルファ - グルカン生成物を生成させるために、グルカン合成反応を使用した。この実施例はまた、可溶性アルファ - グルカン生成物を生成させたグルカン合成反応からのクロマトグラフィー分画の調製も明らかにした。以下の実施例 1 5 および 1 6 においてこの分画を使用して、それに対するアルファ - グルコシダーゼの活性を試験した。

【0 3 4 3】

実施例 1 5

G t f - S / M U T 3 3 2 5 および G t f - C 反応からのオリゴマー / ロイクロース分画を用いたアルファ - グルコシダーゼの一次スクリーニング

この実施例は、可溶性アルファ - グルカン生成物を生成させたグルカン合成反応から得られるクロマトグラフィー分画中に存在するロイクロースおよび他のオリゴ糖を加水分解するためにアルファ - グルコシダーゼを使用することを記載する。具体的に、実施例 1 3 および 1 4 で調製された分画中のロイクロースおよびオリゴ糖の加水分解における、実施例 1 0 で開示されるアルファ - グルコシダーゼの効果について試験を行った。

【0 3 4 4】

基質物質として g t f - S / M U T 3 3 2 5 (実施例 1 3) および g t f - C (実施例 1 4) 反応からのオリゴマー / ロイクロース分画を用いて、全部で 1 2 種類のアルファ - グルコシダーゼおよび 2 種類のベンチマーク酵素 (オリゴ - 1 , 6 - グルコシダーゼおよび T G L - 2 0 0 0 トランスグルコシダーゼ) をスクリーニングした。全酵素 (アルファ - グルコシダーゼおよびベンチマーク酵素) を等しいタンパク質濃度で分けた。p H 5 . 5 で 4 7 のオリゴマー / ロイクロース基質 (1 0 % 乾燥固体) および 2 mM 塩化カルシウムを含有する溶液中で各アルファ - グルコシダーゼ (1 0 0 p p m で分ける) を温置した。5 0 μ L の 0 . 5 M N a O H を添加することによって、温置 2 1 時間後に各反応を停止させた。

【0 3 4 5】

停止させた反応のオリゴ糖 / 单糖含量を次のように決定した。各反応からの試料を遠心し、H P L C 分析 (一般的な方法) のためにそこからの上清を水中で 2 5 倍希釈した。表 2 3 で報告されるパーセンテージは、全体の分画としての各 D P n のピーク面積パーセンテージの平均 (各試料の 2 つ組から) を反映する。結果は、細菌アルファ - グルコシダーゼと比較した場合、真菌アルファ - グルコシダーゼがグルカンオリゴマーに対してより良好な加水分解活性を有したことを見出す。

【0 3 4 6】

10

20

30

40

50

【表30】

表23
Gtf-S/MUT3325およびGtf-C反応からのおりゴマー/ロイクロース分画を用いたアルブニアーグルコシダーゼの一次スクリーニングの結果分析

基質	酵素	配列番号	DP6+%	DP6%	DP5%	DP4%	DP3%	DP2%	ロイクロース%	グルコ-	グルコ-	フルクトー-
	オリゴ-1,6-グルコシダーゼ	8	0.1	0.2	0.4	1.1	6.8	50.7	19.6	2%	2%	2%
TGL-2000		1	0.7	0.1	0.2	0.5	1.1	5.7	3.8	48.6	39.3	
AclGlu1		6	0.8	0.1	0.2	0.4	1	4.2	0	51.8	41.6	
NfigGlu1		9	0.7	0.1	0.2	0.4	1	3.6	0	52.2	41.7	
NcrgGlu1		12	0.7	0	0.2	0.4	1	3.6	4	49.9	40.2	
BloGlu1		20	0.1	0.3	0.4	0.7	0.6	2.9	20.6	40.7	33.6	
BloGlu2		24	0.8	0.2	0.6	1	0.9	4	30.9	34	27.5	
BloGlu3		26	1.1	0.3	0.5	1	1	4	28.8	35.4	28.1	
BspGlu1		30	0.9	0.1	0.1	0.1	0.3	2.5	27.9	39.5	28.7	
BthGlu1		32	0.8	0.2	0.5	0.7	0.7	2.9	28.6	37.1	28.4	
BhrGlu2		36	1.1	0.1	0.6	1.1	1.2	4.7	36.8	30.7	22.7	
BbrGlu5		38	1.4	0.1	0.2	0.5	0.9	4	44.6	29.1	19.4	
TauSec098		15	3.1	0.2	0.4	0.7	1.7	4.9	59.3	17.9	11.8	
TauSec099		18	0.1	0	0.1	0.4	1	3.3	0	51.2	43.6	
ブランク		1.1	0.3	0.6	1.5	2.9	7.9	63.4	11.7	8.5		

【0347】

【表31】

Gtf-S/MUT3325 反応からオ リゴマー/ロイ クロース分画	オリゴ-1,6-グルコ シダーゼ	10.8	0.8	2.8	7.5	15.7	0	27.8	18.9	15.6
TG L-2000	1	1.4	0.8	2.7	7.3	13.2	2.3	0	43.8	28.6
Aclglu1	6	1.8	0.8	2.5	6.9	12.3	1.2	0	45.6	29
Nfiglu1	9	1.8	0.8	2.6	7	13.6	0.9	0	44.4	29.1
Ncrglu1	12	2.1	0.7	2.2	6.6	13.9	0	0	45.2	29.3
BloGlu1	20	3.5	0.7	2.4	6.5	11.7	2.1	14.8	35.6	22.6
BloGlu2	24	1.5	0.8	2.6	7	14.6	2.8	24.9	28	17.8
BloGlu3	26	2	0.8	2.5	6.9	14.1	2.9	22.4	29.9	18.6
BspGlu1	30	1.7	0.6	1.5	3	3.4	2	18.8	48.3	20.8
BthGlu1	32	1.4	0.7	2.5	6.2	12.2	2.1	16.3	36.7	21.9
BbrGlu2	36	1.5	0.8	2.6	7	14.7	3	25	28	17.6
BbrGlu5	38	2.7	0.7	2.5	5.9	17.2	0	23.9	26.6	20.5
TauSec098	15	2.9	0	0.1	0.3	1.1	3.6	37.1	41.8	13.1
TauSec099	18	1.4	0.8	2.8	7.6	16.2	0	0	40.8	30.4
ブランク		1.4	0.9	3.1	8.7	19.4	0	37.1	15.6	13.8

10

20

30

40

【0348】

表23で影を付したもので示されるように、反応のオリゴ糖含量は、一般的に、酵素がなかった対照反応（「ブランク」）と比較して、より小さいサイズの糖に向かってシフトした。これらの結果から、グルカン合成反応およびその分画、特に可溶性アルファ-グルカン生成物を生成させたグルカン合成反応のクロマトグラフィー分画内に含まれるオリゴ糖を加水分解するために、アルファ-グルコシダーゼを使用し得ることが示される。また、オリゴ糖の結合プロファイル（実施例13および14）およびアルファ-1,4結合に加えて様々なグルコシド結合に対するアルファ-グルコシダーゼの活性（実施例11）を考慮すると、アルファ-1,5グルコシル-フルクトース結合およびまたおそらくアルファ

50

- 1 , 3 およびアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合もあるオリゴ糖を分解するために、アルファ - グルコシダーゼを使用することができると思われる。表 2 3 に示される結果はまた、細菌アルファ - グルコシダーゼと比較して、真菌アルファ - グルコシダーゼが可溶性オリゴ糖に対してより良好な加水分解活性を有することも示唆する。

【 0 3 4 9 】

このように、アルファ - グルコシダーゼは、可溶性アルファ - グルカン生成物を合成するものなど、グルカン合成反応から得られる分画（例えばクロマトグラフィー分画）中に存在するロイクロースおよび他のオリゴ糖を加水分解するために使用することができる。

【 0 3 5 0 】

実施例 1 6

10

G t f - S / M U T 3 3 2 5 および G t f - C 反応からのオリゴマー / ロイクロース分画を用いたアルファ - グルコシダーゼの選択スクリーニング

この実施例は、実施例 1 5 に加えて、可溶性アルファ - グルカン生成物を生成させたグルカン合成反応から得られるクロマトグラフィー分画中に存在するロイクロースおよび他のオリゴ糖を加水分解するためのアルファ - グルコシダーゼの使用を記載する。

【 0 3 5 1 】

等しいタンパク質濃度で分けられた酵素を含有する反応を引き起こす糖組成物を分析することによって、g t f - S / M U T 3 3 2 5 および g t f - C 反応（実施例 1 5 ）からのオリゴマー / ロイクロース分画の加水分解に対して最も活性が高かったアルファ - グルコシダーゼの評価を行った。p H 5 . 5 で、2 mM 塩化カルシウムの存在下で、それぞれ 6 0 および 6 5 でアルファ - グルコシダーゼ（4 p p m で分ける；混合物の場合、2 つの酵素の比は 1 : 1 であり、総用量は 4 p p m であった）およびオリゴマー / ロイクロース基質（1 0 % d s ）の温置を行った。温置 2 3 時間後に 5 0 μ L の 0 . 5 M N a O H を添加することによって、反応を停止させた。

20

【 0 3 5 2 】

停止させた反応のオリゴ糖 / 単糖含量を次のように決定した。各反応からの試料を遠心し、H P L C 分析（一般的方法）のために、それからの上清を水中で 2 5 倍希釈した。表 2 4 （下記）で報告されるパーセンテージは、全体の分画としての各 D P n のピーク面積パーセンテージの平均（各試料の 2 つ組から）を反映する。結果から、T a u S e c 0 9 8 が D P 2 ~ D P 7 オリゴマーの加水分解に対して効果的であり、T a u S e c 0 9 9 は、6 5 で温置を行った場合、ロイクロース加水分解に対して T G L - 2 0 0 0 よりも優れていたことが示される。T a u S e c 0 9 8 と T a u S e c 0 9 9 （または T G L - 2 0 0 0 ）との混合物は、D P 1 生成のためのオリゴマーおよびロイクロースの加水分解に対して有効であった。

30

【 0 3 5 3 】

このように、アルファ - グルコシダーゼは、可溶性アルファ - グルカン生成物を合成するものなど、グルカン合成反応から得られる分画（例えばクロマトグラフィー分画）に存在するロイクロースおよび他のオリゴ糖を加水分解するために使用することができる。

【 0 3 5 4 】

40

50

【表32】

Gtf-S/MUT3325 および Gtf-C 反応からのオリゴマー/ロイクロース分画を用いたアルファ-グルコシダーゼの選択スクリーニングの糖組成分析											
温度	基質	酵素	配列番号	DP7+	DP6	DP5	DP4	DP3	DP2	ロイク	フル
				(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	ロース	コース
60 °C	Gtf-C 反応から のオリゴマー/ ロイクロース 分画	TG L-2000	1	2.5	0.4	0.5	0.9	1.9	5.3	22.9	18.4
		TauSec098	15	5.4	0.3	0.5	1.0	1.4	2.6	6.3	71.8
		TauSec099	18	2.9	0.3	0.5	1.0	1.9	4.7	23.3	21.5
		TauSec098+T auSec099	15, 18	2.7	0.3	0.5	0.9	1.4	3.3	19.9	34.9
		TauSec098+T G L-2000	15, 1	2.7	0.3	0.5	0.8	1.4	4.5	23.7	27.1
		ブランク		5.2	0.4	0.6	1.2	1.8	3.2	8.3	70.0
		TG L-2000	1	4.1	0.3	1.2	3.2	8.1	17.2	13.2	0.0
		TauSec098	15	3.4	0.2	0.0	0.4	1.1	3.5	12.3	32.3
		TauSec099	18	4.2	0.0	1.2	3.2	8.2	17.4	15.3	0.0
		TauSec098+T auSec099	15, 18	3.5	0.2	0.4	0.9	2.3	6.2	16.8	27.9
65 °C	Gtf- S/MUT3325 反応からの方 りゴマー/ロイ クロース分画	TauSec098+T G L-2000	15, 1	3.2	0.1	0.3	0.7	2.0	6.0	26.0	17.0
		ブランク		4.6	0.4	1.2	3.2	7.9	17.5	15.1	36.6
		TG L-2000	1	2.5	0.3	0.5	1.0	1.8	4.9	24.9	26.0
		TauSec098	15	2.8	0.4	0.5	1.0	1.4	2.6	6.6	73.6
		TauSec099	18	2.2	0.3	0.4	1.0	2.0	4.9	23.2	17.4
		TauSec098+T auSec099	15, 18	4.5	0.3	0.5	0.9	1.4	3.4	20.3	28.6
		TauSec098+T G L-2000	15, 1	5.1	0.3	0.5	0.9	1.2	2.9	21.1	34.4
		ブランク		7.0	0.4	0.7	1.3	1.8	3.2	7.9	68.4
											0.0
											9.4

【表 3 3】

	TG L-2000	1	2.9	0.2	1.1	3.1	8.1	18.0	11.7	16.5	19.3	19.0
TauSec098	15	2.6	0.0	0.1	0.3	0.9	3.3	12.0	33.1	36.6	11.1	
TauSec099	18	4.4	0.0	1.2	3.1	7.8	16.1	14.4	0.0	27.4	25.5	
TauSec098+T auSec099	15, 18	3.9	0.2	0.4	0.8	2.1	5.7	16.2	19.4	33.7	17.6	
TauSec098+T G L-2000	15, 1	3.7	0.2	0.3	0.7	1.8	5.0	24.9	20.5	29.4	13.6	
ブランク		3.1	0.6	1.1	2.5	6.3	13.6	13.0	31.1	17.0	11.8	

10

20

30

40

【0355】

以上、本発明を要約すると以下のとおりである。

1. 少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を含む糖においてアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解する方法であって、前記糖が二糖またはオリゴ糖であり、前記方法が、適切な条件下で前記糖をアルファ - グルコシダーゼ酵素と接触させることを含み、前記アルファ - グルコシダーゼ酵素が、前記糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解し、前記糖の量が、前記接触前に存在した前記糖の量と比較して減少している、方法。

50

- 2 . 前記アルファ - グルコシダーゼ酵素が固定化されている、前記 1 に記載の方法。
 3 . 加水分解前の前記糖の重合度が 3 ~ 7 である、前記 1 に記載の方法。
 4 . 前記接触工程後の前記糖の濃度が、前記接触前に存在した前記糖の濃度の 50 % 未満である、前記 1 に記載の方法。

5 . 前記適切な条件が、

(i) グルカン合成反応、または

(i i) 前記グルカン合成反応から得られる分画

を含み、前記糖が前記グルカン合成反応の副産物である、前記 1 に記載の方法。

6 . 前記グルカン合成反応が、少なくとも 1 つの不溶性アルファ - グルカン生成物を生成させる、前記 5 に記載の方法。 10

7 . 前記分画が前記グルカン合成反応のろ液である、前記 6 に記載の方法。

8 . 前記グルカン合成反応が、

(i) グルコシルトランスフェラーゼの生成物、または

(i i) 1 つ以上のアルファ - 1 , 3 - グリコシド結合または 1 つ以上のアルファ - 1 , 6 - グリコシド結合を有するグルカンポリマーを加水分解することが可能なグルコシルトランスフェラーゼおよびアルファ - グルカノヒドロラーゼの両方の協奏作用の生成物である、少なくとも 1 つの可溶性アルファ - グルカン生成物を生成させる、前記 5 に記載の方法。

9 . 前記分画が前記グルカン合成反応のクロマトグラフィー分画である、前記 8 に記載の方法。 20

10 . 前記アルファ - グルコシダーゼ酵素がトランスグルコシダーゼである、前記 1 に記載の方法。

11 . 糖をアルファ - グルコシダーゼ酵素と接触させることにより生成される組成物であって、前記糖が二糖またはオリゴ糖であり、かつ少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を含み、前記酵素が、前記糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解し、前記組成物が、前記接触前に存在した前記糖の量と比較して減少した量の前記糖を含む、組成物。

12 . 加水分解前の前記糖の重合度が 3 ~ 7 である、前記 11 に記載の組成物。

13 . 前記糖が (i) グルカン合成反応、または (i i) 前記グルカン合成反応から得られる分画にあり、前記糖が前記グルカン合成反応の副産物である、前記 11 に記載の組成物。 30

14 . グルカン合成反応の分画に存在するフルクトースを富化する方法であって、

(a) グルカン合成反応から得られる分画を適切な条件下でアルファ - グルコシダーゼ酵素と接触させることであって、前記アルファ - グルコシダーゼ酵素が、前記分画内に含まれる二糖またはオリゴ糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解する、接触させることと、

(b) 工程 (a) の前記分画のフルクトース濃度と比較してより高いフルクトース濃度を有する組成物を得るために、工程 (a) の前記加水分解分画からフルクトースを分離することと 40

を含む、方法。

15 . (a) グルカン合成反応から得られる分画を適切な条件下でアルファ - グルコシダーゼ酵素と接触させることであって、前記アルファ - グルコシダーゼ酵素が、前記分画内に含まれる二糖またはオリゴ糖の少なくとも 1 つのアルファ - 1 , 3 またはアルファ - 1 , 6 グルコシル - グルコース結合を加水分解する、接触させることと、

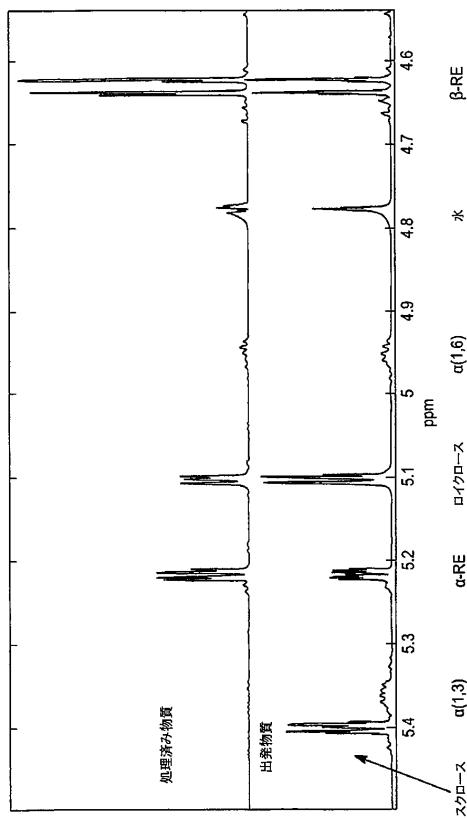
(b) 生成物を得るために微生物を用いて工程 (a) の前記分画を発酵させることであって、前記発酵が、工程 (a) の後または工程 (a) と同時に行われる、発酵させることと、 (c) 任意選択により (b) の前記生成物を単離することと

を含み、(b) の前記生成物の収率が、前記アルファ - グルコシダーゼ酵素と接触していない前記グルカン合成反応の分画を発酵させる生成物の収率と比較して上昇している、発 50

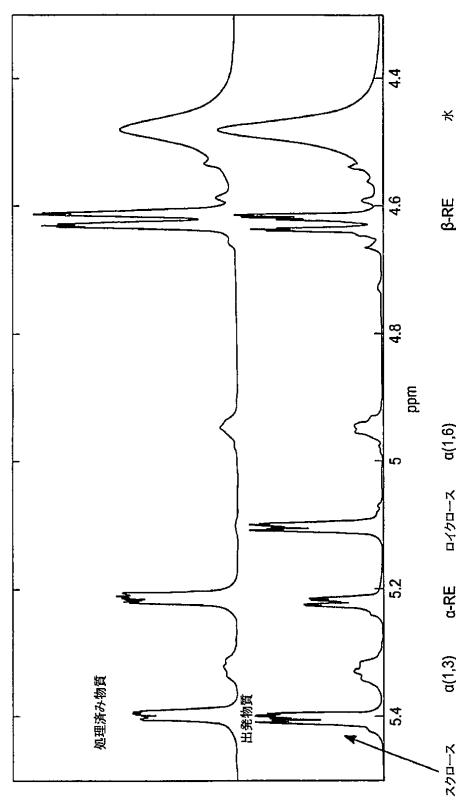
酵方法。

【図面】

【図1】



【図2】



10

20

30

40

【配列表】

0007011393000001.app

50

フロントページの続き

米国(US)

(31)優先権主張番号 61/945,241

(32)優先日 平成26年2月27日(2014.2.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/004,300

(32)優先日 平成26年5月29日(2014.5.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/004,305

(32)優先日 平成26年5月29日(2014.5.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/004,308

(32)優先日 平成26年5月29日(2014.5.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/004,290

(32)優先日 平成26年5月29日(2014.5.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/004,312

(32)優先日 平成26年5月29日(2014.5.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 PCT/CN2015/073269

(32)優先日 平成27年2月25日(2015.2.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関

中国(CN)

(31)優先権主張番号 62/004,314

(32)優先日 平成26年5月29日(2014.5.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 エルヴィン・コロンブス・アゴ

アメリカ合衆国アイオア州 52404 . シダー・ラピッズ . シックスストリート・サウスウェスト
2901 . アパートメント 24

(72)発明者 ジャヤラマ・ケー・シェティ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 94566 . ブレソントン . ブラクストンプレイス 4806

(72)発明者 スザン・マリー・ヘネシー

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19311 . アヴォンデール . トゥルーマンレーン 32

(72)発明者 ロバート・ディコジーモ

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19317 - 9720 . チャップズ・フォード . マスターズウェイ
1607

(72)発明者 リン・ファー

アメリカ合衆国デラウェア州 19707 . ホッケシン . ホッケシン・ドライブ 126

(72)発明者 ロドリゴ・ラミレス

ブラジル連邦共和国サンパウロ 13092 - 480 . カンピナス . ルア・アルフレド・リベイロ・
ノゲイラ 280 . カーサ 08

(72)発明者 チョンメイ・タン
中華人民共和国シャンハイ 201102. グダイロード. レーン 1100. ビルディング 100.
ルーム 602

(72)発明者 ジーヨン・ユー
中華人民共和国シャンハイ 200000. ホンコウ・ディストリクト. クアンジューロード. レー
ン 150. ビルディング 17. ルーム 501

合議体

審判長 上條 肇

審判官 中島 庸子

平林 由利子

(56)参考文献
特表 2012-523852 号公報
特開昭 56-164790 号公報
特開 2012-55307 号公報
国際公開第 2013/036968 号
Journal of Bacteriology, 2008 年、Vol. 190, No.
7, p. 2298-2305

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
IPC C12Q 1/00-3/00, C12N 9/00, C12P 1/00-41/00
Capplus / MEDLINE / BIOSIS / EMBASE / WPIDS (STN)
JST 7580 / JSTplus / JMEDplus (JDreamIII)