

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和3年12月23日(2021.12.23)

【公表番号】特表2021-503953(P2021-503953A)

【公表日】令和3年2月15日(2021.2.15)

【年通号数】公開・登録公報2021-007

【出願番号】特願2020-545861(P2020-545861)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/56	(2006.01)
C 1 2 P	19/00	(2006.01)
C 1 2 N	9/24	(2006.01)
A 2 3 L	33/125	(2016.01)
A 2 3 L	33/21	(2016.01)
C 1 2 P	19/04	(2006.01)
A 6 1 P	1/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/716	(2006.01)
A 6 1 K	47/36	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/56	
C 1 2 P	19/00	Z N A
C 1 2 N	9/24	
A 2 3 L	33/125	
A 2 3 L	33/21	
C 1 2 P	19/04	
A 6 1 P	1/00	
A 6 1 K	31/716	
A 6 1 K	47/36	

【手続補正書】

【提出日】令和3年11月12日(2021.11.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 0 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 0 9】

(参考文献)

## 【化1】

Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer, A., Noll, T., Eggert, T (2006). Systematic Screening of All Signal Peptides from *Bacillus subtilis*: A Powerful Strategy in Optimizing Heterologous Protein Secretion in Gram-positive Bacteria, *Journal of Molecular Biology*. Volume 362, Issue 3, Pages 393-402.

Fry, S. C., York, W. S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J. P., Kato, Y., Lorences, E. P., MacLachlan, G. A., McNeil, M., Mort, A. J., Reid, J. S. G., Seitz, H. U., Selvendran, R. R., Voragen, A. G. J. & White, A. R. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol. Plant*, 89, 1–3.

Gibson, G. R., Loo, J. V., Rastall, R.A., Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. 2004. *Nutrition Research Reviews*, 17: 259-275.

Hartemink, R., Van Laere, K. M. J., Mertens, A .K .C. and Rombouts, F. M. Fermentation of Xyloglucan by Intestinal Bacteria. *Anaerobe* (1996). 2, 223–230.

Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., Pegler, D.N . Dictionary of the fungi, 8th edn. 1995. CAB International, Wallingford, UK.

Hoy, M.K., Goldman, J.D. Fiber intake of the U.S. population: *What We Eat in America*, NHANES 2009-2010. Food Surveys Research Group Dietary Data Brief No. 12. September 2014.

Koeck, D.E., Mechelke, M., Zverlov, V.V., Liebl, W., Schwarz, W.H. (2016) *Herbivorax saccincola* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic, anaerobic, thermophilic bacterium isolated via in sacco enrichments from a lab scale biogas reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiolog*. 66: 4458-4463.

Kumar, C. S., Bhattacharya, S. (2008) Tamarind seed: properties, processing and utilization. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 48(1):1-20.

Larsbrink, J., Rogers, T. E., Hemsworth, G. R., McKee, L. S., Tazin, A. S., Spadiut, O., Klinter, S., Pudlo, N. A., Urs, K., Koropatkin, N.M., Creagh, A. L., Haynes, C. A., Kelly, A.G., Nilsson Cederholm, S., Davies, G. D., Martens, E. C. and Brumer, H. A discrete genetic locus confers xyloglucan metabolism in select human gut Bacteroidetes. 2014. *Nature* 499, vol. 506.

Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G.: *Biology of Prokaryotes*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

McCleary, B. V. (1980). New chromogenic substrates for the assay of alpha-amylase and (1-4)- $\beta$ -D-glucanase. Carbohydr. Res., 86, 97-104.

Mangan, D., Liadova, A., Ivory, R. & McCleary, B. V. (2016). Novel approaches to the automated assay of  $\beta$ -glucanase and lichenase activity. Carbohydr. Res. 435, 162-172.

Rao and Srivastava, "Tamarind" in Industrial Gums. R.L. Whistler and J.H. Bemiller, eds., 1973, pp. 402-407.

Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre1. EFSA Journal 2010; 8(3):1462

Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to non-digestible carbohydrates and a reduction of post-prandial glycaemic responses pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2014;12(1):3513.

Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to AlphaGOS® and a reduction of post-prandial glycaemic responses pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2014;12(10):3838.

Simonen, M. and Palva, I. Protein secretion in *Bacillus* species. 1993. Microbiological Reviews 57: 109-137.

Vincken, J.-P., Beldman, G., Messen, W.M.A., Voragen, A.G.J. (1996). Degradation of apple fruit xyloglucan by endoglucanase. Carbohydr. Polym., 29, 75-85.

Wong, D. D. W. S, Chan V. J., McCormack A. and Batt S.B. (2010). A novel xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase: biochemical properties and inhibition studies. Applied Microbiology and Biotechnology. 86(5), 1463-1471.

Wood, T.M.; Bhat, K.M. (1988): Methods for measuring cellulase activities. In: Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose, Bd. 160: Elsevier (Methods in Enzymology), p. 87–112.

Yin, Y.B., Mao, X.Z., Yang, J.C., Chen, X., Mao, F.L., Xu, Y., 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. Nucleic Acids Res 40, W445-W451.

本件出願は、以下の態様の発明を提供する。

(態様 1 )

キシログルカン源からキシログルカンオリゴ糖(XGOS)を产生する方法であって、50 よりも高い温度でキシログルカナーゼ活性を示す酵素による50 よりも高い温度でのキシログルカンの酵素的加水分解を含み、該酵素が5mMと同じ又はそれよりも高い最終生成物阻害定数(Ki)を示すことを特徴とする、前記方法。

(態様 2 )

前記キシログルカン源が、タマリンド、ペパーグラス、ナタネ、リンゴ、ビルベリー、

ブルーベリー、オリーブ、又はこれらの画分を含む他のキシログルカン源、例えば、タマリンドカーネルパウダー、脱脂タマリンドカーネルパウダー、タマリンド種子、並びに他の源の種子及び細胞壁である、態様1記載の方法。

(態様3)

前記酵素が、好ましくは、GHファミリー5、9、12、16、44、又は74から選択されるエンドグルカナーゼである、態様1又は2記載の方法。

(態様4)

前記酵素が、配列番号1～配列番号4から選択されるポリペプチドと少なくとも75%の配列同一性を有する、態様1～3のいずれか一項記載の方法。

(態様5)

前記酵素が宿主細胞で組換え産生され、かつ該宿主細胞が前記キシログルカン源に対する内在性キシログルカナーゼ活性を示さない、態様1～4のいずれか一項記載の方法。

(態様6)

・前記多糖のキシログルカナーゼ加水分解を促進する条件下で、配列番号1～配列番号4から選択されるポリペプチドと少なくとも75%の配列同一性を有する酵素で水溶液中のキシログルカン源を加水分解して、キシログルカン源多糖加水分解物の溶液を形成させる工程を含む、態様1～5のいずれか一項記載の方法。

(態様7)

・固形物の除去；  
・例えは、イオン交換クロマトグラフィーによる、タンパク質及び塩の除去；  
・例えは、限外濾過又はナノ濾過による、着色剤の除去；並びに  
・前記溶液からの前記キシログルカン源多糖加水分解物の除去  
:のうちの1以上の工程をさらに含む、態様1～6のいずれか一項記載の方法。

(態様8)

前記酵素が前記キシログルカン源の0.05% (w/w) 又はそれ未満の量で存在し、かつ/又は使用される該キシログルカン源の最終量が100g/l以上である、態様1～7のいずれか一項記載の方法。

(態様9)

DP7～DP9 XGOSの混合物を含むか、該混合物から本質的になるか、又は該混合物からなるキシログルカン加水分解物が産生される、態様1～8のいずれか一項記載の方法。

(態様10)

食品、動物飼料製品、又は他の製品を产生するための、態様1～9のいずれか一項記載の方法で產生されるDP7～DP9 XGOS混合物を含む加水分解物の使用。

(態様11)

態様1～9のいずれか一項記載の方法で產生されるDP7～DP9 XGOS混合物を含む製品。

(態様12)

配列番号2、3、又は4によるポリペプチドと少なくとも75%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含むか、該ポリペプチドから本質的になるか、又は該ポリペプチドからなるエンドグルカナーゼ活性を有し、ただし、該エンドグルカナーゼが配列番号1のポリペプチドではない、酵素。

(態様13)

態様12記載のエンドグルカナーゼをコードする核酸配列を含む核酸分子。

(態様14)

キシログルカン源からXGOSの混合物を产生するための、態様12記載の酵素の使用であつて、該混合物が、DP7～DP9 XGOSを含むか、DP7～DP9 XGOSから本質的になるか、又はDP7～DP9 XGOSからなる、前記使用。