

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年10月10日(10.10.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/194062 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 14/195 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/13 (2006.01) C12N 15/56 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12P 19/04 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/013549

(22) 国際出願日: 2019年3月28日(28.03.2019)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2018-073180 2018年4月5日(05.04.2018) JP
特願 2018-073181 2018年4月5日(05.04.2018) JP

(71) 出願人: 合同酒精株式会社 (GODO SHUSEI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1040061 東京都中央区銀座6-2-10 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 尾▲高▼ 伶 (ODAKA, Rei); 〒2710064 千葉県松戸市上本郷字仲原250番地 合同酒精株式会社 酵素医薬品研究所内 Chiba (JP). 馬場 康浩 (BABA, Yasuhiro); 〒2710064 千葉県松戸市上本郷字仲原250番地 合同酒精株

式会社 酵素医薬品研究所内 Chiba (JP). 小笠原 準季 (OGASAWARA, Junki); 〒2710064 千葉県松戸市上本郷字仲原250番地 合同酒精株式会社 酵素医薬品研究所内 Chiba (JP). 吉川 潤 (YOSHIKAWA, Jun); 〒2710064 千葉県松戸市上本郷字仲原250番地 合同酒精株式会社 酵素医薬品研究所内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 伊藤 温 (ITO, Atsushi); 〒1040045 東京都中央区築地4-1-1 東劇ビル4階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: ENZYME DERIVED FROM *PAENIBACILLUS PABULI* AND CAPABLE OF PRODUCING GALACTOOLIGOSACCHARIDE AND METHOD FOR PRODUCING GALACTOOLIGOSACCHARIDE

(54) 発明の名称: *Paenibacillus pabuli* 由来のガラクトオリゴ糖を製造可能な酵素、およびガラクトオリゴ糖を製造する方法

(57) Abstract: [Problem] To provide: a novel enzyme which is derived from a microorganism other than *Bacillus circulans* and is highly selective for galactotrisaccharide production and with which the galactooligosaccharide can be highly efficiently produced; and a novel method capable of producing the galactooligosaccharide. [Solution] A method for producing a galactooligosaccharide, the method including bringing an enzyme having an amino acid sequence selected from the group consisting of (a) to (f) and cells of a bacterium belonging to the genus *Paenibacillus* and/or a galactooligosaccharide-producing enzyme for the bacterium, into contact with lactose. (a) An amino acid sequence of sequence number 1. (b) An amino acid sequence of sequence number 2. (c) An amino acid sequence of an enzyme having galactooligosaccharide-producing activity, the amino acid sequence being the amino acid sequence of sequence number 1 in which one to ten amino acids have been replaced, removed, or inserted. (d) An amino acid sequence of an enzyme having galactooligosaccharide-producing activity, the amino acid sequence being the amino acid sequence of sequence number 2 in which one to ten amino acids have been replaced, removed, or inserted. (e) An amino acid sequence of an enzyme having galactooligosaccharide-producing activity, the amino acid sequence having a homology of 80% or higher but less than 100% to the amino acid sequence of sequence number 1. (f) An amino acid sequence of an enzyme having galactooligosaccharide-producing activity, the amino acid sequence having a homology of 80% or higher but less than 100% to the amino acid sequence of sequence number 2.



WO 2019/194062 A1

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約 : 【課題】 バチルス・サーキュランス以外の微生物に由来する、3糖ガラクトオリゴ糖の製造選択性が高く、かつ、高効率にガラクトオリゴ糖を製造できる新規の酵素と、ガラクトオリゴ糖を製造し得る新規の方法とを提供する。【解決手段】 以下の(a)~(f)からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する酵素と、Paenibacillus属に属する細菌の菌体および/または前記細菌のガラクトオリゴ糖生産酵素を乳糖に接触させることを含むガラクトオリゴ糖の製造方法。(a) 配列番号1に示すアミノ酸配列 (b) 配列番号2に示すアミノ酸配列 (c) 配列番号1に示すアミノ酸配列において1~10個のアミノ酸が置換、削除、挿入されたアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列 (d) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1~10個のアミノ酸が置換、削除、挿入されたアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列 (e) 配列番号1に示すアミノ酸配列に対する相同性が80%以上100%未満のアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列 (f) 配列番号2に示すアミノ酸配列に対する相同性が80%以上100%未満のアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列

明 細 書

発明の名称：

Paenibacillus pabuli由来のガラクトオリゴ糖を製造可能な酵素、およびガラクトオリゴ糖を製造する方法

技術分野

[0001] 本発明は、ガラクトオリゴ糖を製造可能な酵素に関する。また本発明は、この酵素をコードしているDNAおよびこの酵素を用いたガラクトオリゴ糖の製造方法に関する。また本発明は、ガラクトオリゴ糖を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] ガラクトオリゴ糖は、ヒト腸内細菌フローラに生息するビフィズス菌などの有用細菌の栄養源として重宝される。そのためガラクトオリゴ糖の製造方法として種々の方法が提案されている（例えば特許文献1～6）。この中で使用されている酵素はラクターゼであり、この中で使用されている微生物はラクターゼ産生微生物である。ラクターゼ（ β -ガラクトシダーゼ）は乳糖を β -ガラクトースとグルコースに加水分解する。ここで、ラクターゼによっては乳糖分子を分解して得られた β -ガラクトシル基を別の乳糖分子などに転移させる反応を起こし得、この反応によってガラクトオリゴ糖を生産し得る。

先行技術文献

特許文献

- [0003] 特許文献1：特許第2652049号
特許文献2：特許第2739335号
特許文献3：特許第5643756号
特許文献4：特開平5-236981号公報
特許文献5：特表2011-517553号公報
特許文献6：特表2013-501504号公報

非特許文献

- [0004] 非特許文献1: Z. Mozaffar, K. Nakanishi, R. Matsuno and T. Kamikubo, Purification and Properties of β -Galactosidases from *Bacillus circulans*, *Agric. biol. chem.*, 48, 3053-3061 (1986)
- 非特許文献2: Sotoya et al., Identification of genes involved in galactooligosaccharide utilization in *Bifidobacterium breve* strain YIT 4014T., *Microbiology*, 163, 1420-1428. (2017)
- 非特許文献3: Van Leeuwen, S. S., ¹H NMR analysis of the lactose/ β -galactosidase-derived galacto-oligosaccharide components of Vivinal(R) GOS up to DP5., *Carbohydrates. Res.*, 400, 59-73. (2014)
- 非特許文献4: T. Moriya, N. Nagahata, R. Odaka, H. Nakamura, J. Yoshikawa, K. Kurashima, T. Saito, Synthesis of an allergy inducing tetrasaccharide "4P-X"., *Carbohydrates. Res.*, 439, 44-49. (2017)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 現在、商業的に実用されているガラクトオリゴ糖製造のためのラクターゼは、主としてバチルス・サーキュランス (*Bacillus circulans*) 由来のラクターゼである。バチルス・サーキュランス由来のラクターゼは、ガラクトオリゴ糖の製造効率が比較的高いという利点がある。しかしながら、このラクターゼは4糖以上のガラクトオリゴ糖を製造し易いというデメリットがある。4糖以上のガラクトオリゴ糖は3糖のガラクトオリゴ糖に比べ収率が低くなる。
- [0006] 本願は、このような背景に基づき、バチルス・サーキュランス以外の微生物に由来し、3糖のガラクトオリゴ糖の製造選択性が高く、高効率にガラクトオリゴ糖を製造できる酵素およびそれを用いたガラクトオリゴ糖の製造方法を提供することを第一の目的とする。
- [0007] また、ガラクトオリゴ糖の製造方法には、ラクターゼ産生微生物を用いる方法とその微生物から精製したラクターゼを使用する方法とが存在する。ラ

クターゼ産生微生物を用いる製造方法には、精製ラクターゼを用いる場合と比較して、酵素精製の工程を省ける点、副反応生成物であるグルコースなどの単糖を微生物が資化することで除去可能である点などの利点がある。しかしその検討は依然として不十分である。

さらに、ガラクトオリゴ糖産生微生物としてバチルス属が良く知られているが、バチルス属の中には炭疽菌やセレウス菌など病原性を示す種も多く知られており、より安全なガラクトオリゴ糖産生菌が求められている。

[0008] 本願は、このような背景に基づき、ガラクトオリゴ糖の製造に適した微生物を同定し、この微生物を利用したガラクトオリゴ糖の製造方法を提供することを第二の目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは前記第一の目的について鋭意研究した結果、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明1によれば、以下の(a)～(f)からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する酵素が提供される。

(a) 配列番号1に示すアミノ酸配列

(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列

(c) 配列番号1に示すアミノ酸配列において1～10個のアミノ酸が置換、削除、挿入されたアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列

(d) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1～10個のアミノ酸が置換、削除、挿入されたアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列

(e) 配列番号1に示すアミノ酸配列に対する相同性が80%以上100%未満のアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列

(f) 配列番号2に示すアミノ酸配列に対する相同性が80%以上100%未満のアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素の

アミノ酸配列

[0011] また、本発明によれば、前記酵素をコードしているDNAも提供される。

[0012] 本発明によれば、以下の(A)～(G)からなる群より選択される塩基配列を有するDNAが提供される。

(A) 配列番号5に示す塩基配列

(B) 配列番号6に示す塩基配列

(C) 配列番号5に示す塩基配列に対する相同性が80%以上100%未満である塩基配列であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する塩基配列

(D) 配列番号6に示す塩基配列に対する相同性が80%以上100%未満である塩基配列であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する塩基配列

(E) 配列番号5に示す塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する塩基配列

(F) 配列番号6に示す塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する塩基配列

(G) 前記(A)～(F)のDNAのいずれかの塩基配列に対して保存的塩基置換されている塩基配列

[0013] ここで、ストリンジントな条件とは、60℃、1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度および温度で洗浄する条件であってもよい。

[0014] また、本発明によれば、前記DNAがコードしている、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素も提供される。

[0015] さらに本発明によれば、前記DNAを含む組換えベクターが提供される。前記DNAまたはこの組換えベクターを有する形質転換体も提供される。

[0016] さらに本発明によれば、前記形質転換体を培養する工程と、培養した形質転換体からガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素を回収する工程と、を含

むガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素の調製方法が提供される。

[0017] さらに本発明によれば、前記酵素を有効成分として含む、酵素含有組成物が提供される。

[0018] さらに本発明によれば、乳糖と、パエニバチルス・パブリ (*Paenibacillus pabuli*) が生産するガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素と、を接触させることを含むガラクトオリゴ糖の製造方法が提供される。

[0019] さらに本発明によれば、乳糖と、前記酵素と、を接触させることを含むガラクトオリゴ糖の製造方法が提供される。

[0020] また、本発明者らは前記第二の目的について鋭意研究した結果、これまでガラクトオリゴ糖を生産することが知られていなかった微生物を同定し、さらにこの微生物が属する属全体においてガラクトオリゴ糖を生産することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0021] すなわち、本発明2は、*Paenibacillus*属に属する細菌の菌体および／または前記細菌のガラクトオリゴ糖生産酵素を乳糖に接触させることを含むガラクトオリゴ糖の製造方法である。

[0022] *Paenibacillus*属に属する細菌は、*Paenibacillus themophilus*、*Paenibacillus popilliae*、*Paenibacillus thiaminolyticus*、*Paenibacillus pabuli*、*Paenibacillus alvei*、*Paenibacillus alginolyticus*、*Paenibacillus chibensis*、*Paenibacillus chitinolyticus*、*Paenibacillus chondroitinus*、*Paenibacillus glucanolyticus*、*Paenibacillus lautus*、*Paenibacillus macerans*、*Paenibacillus peoriae*、*Paenibacillus polymyxa*、*Paenibacillus validus*、*Paenibacillus apiarius*、*Paenibacillus jamilae*、*Paenibacillus kribbensis*、*Paenibacillus terrae*であってもよい。

[0023] *Paenibacillus*属に属する細菌は、*Paenibacillus themophilus*、*Paenibacillus popilliae*、*Paenibacillus thiaminolyticus*、*Paenibacillus pabuli*、*Paenibacillus alvei*、*Paenibacillus polymyxa*であってもよい。

発明の効果

[0024] 本発明1によれば、パエニバチルス・パブリ由来のガラクトオリゴ糖生産

活性を有する酵素を用いて、3糖のガラクトオリゴ糖の製造選択性が高く、高効率にガラクトオリゴ糖を製造することが可能となった。

[0025] 本発明2により、ガラクトオリゴ糖を製造し得る微生物を利用したガラクトオリゴ糖の製造方法を提供することが可能となった。

図面の簡単な説明

[0026] [図1] (A) 配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素のSDS-PAGEの結果である。左レーンはマーカーである。(B) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素のSDS-PAGEの結果である。左レーンはマーカーである。

[図2]比較例のラクターゼと実施例2のラクターゼによって生成するGOSの比較を示したチャートである。

[図3]比較例のラクターゼと実施例2のラクターゼによって生成するGOSにおける、アレルギー性4糖の存在確認を示したチャートである。

[図4]Paenibacillus属とBacillus属の16S rDNA部分塩基配列に基づく簡易分子系統樹である。

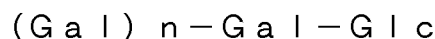
発明を実施するための形態

[0027] <<本発明1>>

以下、本発明1について詳述する。

[0028] 本発明においてオリゴ糖とは3糖から10糖の多糖化合物を意味する。

[0029] 本発明においてガラクトオリゴ糖（GOSとも表記する）とは、下記一般式で表せるオリゴ糖を主として意味する。



ここで、Galはガラクトース残基、Glcはグルコース残基を表し、nは1～8の整数、特に1～3の整数である。糖間の各結合の結合様式は特に制限されないが、典型的には $\beta-1,4$ -グリコシド結合である。糖間（特にGal-Gal間）の結合様式は $\beta-1,3$ -グリコシド結合であってもよい。

[0030] ラクターゼとは、乳糖を β -ガラクトースとグルコースに加水分解できる

酵素である。この分解の際、 β -ガラクトシル基を他の分子に転移させることができる。水に転移させれば β -ガラクトースを生じるが、乳糖 (Gal-Glc) に転移させれば3糖 (上記式のnが1) のガラクトオリゴ糖 (Gal-Gal-Glc) を生じる。

[0031] この β -ガラクトシル基の転移反応が3糖 (上記式のnが1) のガラクトオリゴ糖 (Gal-Gal-Glc) に対して起これば、4糖 (上記式のnが2) のガラクトオリゴ糖 ((Gal)₂-Gal-Glc) が生じる。同様に、4糖 (上記式のnが2) のガラクトオリゴ糖に対して起これば、5糖 (上記式のnが3) のガラクトオリゴ糖が生じる。

[0032] 3糖のガラクトオリゴ糖を製造する場合、2分子の乳糖から1分子のグルコース及び1分子の3糖のガラクトオリゴ糖が生じる。この時のガラクトオリゴ糖の理論収率は約74質量%である。

[0033] 4糖のガラクトオリゴ糖を製造する場合、3分子の乳糖から2分子のグルコース及び1分子の4糖のガラクトオリゴ糖が生じる。この時のガラクトオリゴ糖の理論収率は約65質量%である。

[0034] したがって乳糖からガラクトオリゴ糖を製造する場合、3糖のガラクトオリゴ糖のみを製造することが収率の点で最も効率的である。ここでガラクトオリゴ糖の収率 (質量%) とは、「ガラクトオリゴ糖の生成量」を「乳糖の消費量」で除した百分率を意味する。

[0035] 本発明において酵素のラクターゼ活性は、以下の挙げる2つの方法のいずれかによって定義される。

[0036] 乳糖溶液 (乳糖濃度10%) に測定対象の酵素を添加し、pH6.5、40°Cの条件下におけるグルコース生成量を測定して定量する。1分間に1 μ molのグルコースを生成する酵素活性が1LUと定義される。

[0037] α -ニトロフェニル- β -ガラクトピラノシド (ONPG) 溶液 (ONPG濃度1.65mM) に測定対象の酵素を添加し、pH6.5、40°Cの条件下における α -ニトロフェニル生成量を測定して定量する。1分間に1 μ molの α -ニトロフェニルを生成する酵素活性が10Uと定義される。

- [0038] この2つの方法の少なくとも一方で活性が測定可能であれば、その酵素はラクターゼであると判断してよい。より具体的には、0.2 LU/mL以上または0.50 U/mL以上であれば、ラクターゼと判断してよい。
- [0039] ただし、酵素がラクターゼ活性を有しても、ガラクトオリゴ糖生産活性（GOS生産活性とも表記する）を必ずしも有するわけではない。酵素のガラクトオリゴ糖生産活性は、以下に説明する方法によって評価される。
- [0040] 乳糖溶液（乳糖濃度60%）に測定対象の酵素を添加し、pH6.5、50℃の条件下において所定時間に亘って静置または振とうする。酵素がGOS生産活性を有している場合、この間に乳糖からGOSを生産する。所定時間経過後、反応溶液をHPLCによって解析する。
- [0041] HPLCで使用するカラムはTransgenomic社製CARBOSep CHO-620 6.5φ×300mm等が挙げられる。移動相は水、流速は0.4 mL/min、温度は85℃、検出はRIの条件にて分析する。
- [0042] 単糖および2糖ならびにGOS（3糖以上、主として3～5糖）のピーク面積の合計値に対して、GOSのHPLCピーク面積の合計値が占める割合が、基準値以上であればガラクトオリゴ糖生産活性ありと判断してよい。当該基準値は通常1%である。当然のことながら、この割合が大きいほどその酵素は高いガラクトオリゴ糖生産活性を有している。高いガラクトオリゴ糖生成活性を有する酵素を取得したい場合には高い基準値を設定してよい。よって当該基準値を1%、3%、5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%と設定してもよい。
- [0043] (BgaD)
- BgaDは現在、商業的に最も利用されているGOS製造用ラクターゼであり、*Bacillus circulans* 由来ラクターゼである。これまでの研究から、BgaDは、分子量の異なる4種類の酵素、即ち、分子量195 kDaのラクターゼ（BgaD-A、配列番号3、GenBank code:BAJ61032）、分子量160 kDaのラクターゼ（BgaD-B）、分子量135 kDaのラクターゼ

(B g a D - C)、及び分子量 86 k D a のラクターゼ (B g a D - D、配列番号 4) で構成されていることが知られている (特許文献 3)。この中で最小サイズの B g a D - D が、最も G O S 生産活性が高いことが知られており、天野エンザイム株式会社が販売する G O S 製造用ラクターゼ製剤「ピオラクタ」にも多く含まれている。

[0044] 下記する本発明の G O S 製造方法において、G O S 製造用ラクターゼとして B g a D - D を用いた場合の G O S 収率は、約 60 ~ 70 % である。

[0045] G O S 収率 (%) とは G O S 生成量 / ラクトース消費量の百分率である。G O S 生成量およびラクトース消費量は H P L C 解析によって求めることができる。

[0046] 下記する本発明の G O S 製造方法において、G O S 製造用ラクターゼとして B g a D - D を用いた場合の 3 糖 G O S の製造選択性は最大で約 60 % である。

[0047] 3 糖 G O S の製造選択性 (%) とは、G O S の全生成量に対する 3 糖 G O S の生成量の百分率を意味する。この数値が高ければ高いほど 3 糖 G O S を主に生成していることを意味する。G O S の全生成量および 3 糖 G O S の生成量は H P L C 解析によって求めることができる。3 糖 G O S の製造選択性は 60 % 以上であることが好ましく、70 % 以上であることがより好ましく、75 % 以上であることがさらに好ましく、80 % 以上であることが特に好ましい。

[0048] B g a D - D を使用して G O S を製造した場合、4 糖以上の G O S も多く製造される。

[0049] < G O S 生産活性を有する酵素およびそれをコードしている D N A >

本発明の第 1 の態様によれば、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する新規の酵素およびその酵素をコードしている D N A が提供される。

[0050] 本発明者らは、Bacillus circulans 由来 G O S 生産酵素である B g a D とは相同性の低い酵素であって、高い収率かつ高い G O S 製造選択性を奏する酵素を見出した。その酵素とは配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなる酵素

および配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる酵素およびそれらの相同体である。

[0051] 配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなる酵素および配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる酵素は、いずれも *Paenibacillus pabuli* が産生する酵素である。いずれのアミノ酸配列も本発明者らが初めて特定し、報告するものである。

[0052] (配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなる酵素)

配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなる酵素の分子量は約 114 kDa である (図 1A 参照)。BgaD-D に対する相同性は約 15% である。この酵素はラクターゼとして機能する酵素であり、乳糖を原料とした GOS 製造に使用可能であることが分かった。

[0053] 下記する本発明の GOS 製造方法において、GOS 製造用ラクターゼとして配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなる酵素を用いた場合の GOS 収率は、約 45~約 60% である。しかし、製造される GOS のうち 3 糖 GOS の製造選択性は約 75% 以上である。さらに当該酵素は酵素の性能を示す Km 値が BgaD-D よりも優れている。

[0054] (配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる酵素)

配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる酵素の分子量は約 50 kDa である (図 1B 参照)。BgaD-D に対する相同性は約 8% である。この酵素はラクターゼとして機能する酵素であり、乳糖を原料とした GOS 製造に使用可能であることが分かった。

[0055] 下記する本発明の GOS 製造方法において、GOS 製造用ラクターゼとして配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる酵素を用いた場合の GOS 収率は、約 60~約 70% である。また製造される GOS のうち 3 糖 GOS の製造選択性は約 80% 以上である。

[0056] 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる酵素は、 β -1, 3-グリコシド結合を形成するように、 β -ガラクトシル基 (β -ガラクトース残基) を糖 (例えば乳糖) に高度に選択的に転移させる。すなわち、配列番号 2 に示す

アミノ酸配列からなる酵素によって製造されるGOSの多くは、 β -ガラクトシル基間が β -1, 3-グリコシド結合している3糖GOSである。一般的な腸内細菌の中ではビフィズス菌のみが β -1, 3-グリコシド結合を分解することができる。そのためこのような糖を多く含むGOSを摂取した場合、腸内においてビフィズス菌が優先的にこのGOSを資化し、増殖することができると思定される。なお従来の多くのGOSでは、ガラクトシル基は乳糖に β -1, 4-グリコシド結合または β -1, 6-グリコシド結合を形成して結合している。

[0057] このように、配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素および配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素は、高いGOS収率を実現しながら、高い酵素化学的性質や高い3糖GOS選択性をも両立している。Paenibacillus pabuliに由来するこれら酵素の使用によって、収率の悪化を招く4糖以上のGOSの発生を従来よりも低減できる。

[0058] 当然のことながら、配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素のファミリー酵素および配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素のファミリー酵素も同様の効果を奏するものと推論される。

[0059] なお当然のことながら、その機能を害しない限り、上記酵素は付加領域を有していてもよい。このような付加領域としては、例えば、タグドメイン等の領域が挙げられる。これらが付加される位置はN末端、C末端の一方または双方のいずれでもよい。

[0060] したがって、本発明の第1の態様として、以下の酵素(1)~(5)が提供される。

- (1) 配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素
- (2) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素
- (3) 配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素のファミリー酵素（または相同体）
- (4) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素のファミリー酵素（または相同体）

(5) 前記(1)～(4)の酵素にペプチド等を付加した酵素であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素

[0061] ある酵素E1が別の酵素E2のファミリー（または相同体）であるとは、E1とE2のアミノ酸配列に基づく相同性（または同一性、類似性と表現してもよい）が80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上を有していることを意味する。上限値に特に制限はないが100%未満である。すなわち、少なくとも1以上のアミノ酸残基の置換、削除、挿入が存在する。アミノ酸配列相同性はBLASTアルゴリズムおよびBLAST2.0アルゴリズムを用いた公知のソフトウェアなどを用いて容易に算出することができる。

[0062] ある酵素E1が別の酵素E2のファミリー（または相同体）であるとは、特に、酵素E1のアミノ酸配列が、酵素E2のアミノ酸配列に対して1個以上10個以下のアミノ酸の置換、削除、挿入によって達成できることを意味する。置換とは、特定部位のアミノ酸が別のアミノ酸へ置き換えられたことを意味する。削除とは、特定部位のアミノ酸を欠失していることを意味する。挿入とは、存在しなかったアミノ酸がアミノ酸配列の内部に追加されていることを意味する。

[0063] これに加えて、ある酵素E1と別の酵素E2とがファミリー（または相同体）であるとは、酵素E1と酵素E2とが同一の機能を発揮できることを意味する。この機能における活性比に特に制限はない。例えば、より活性の高い酵素をE1とし、その活性を100%としたとき、より活性の低い酵素E2の活性は1%以上、5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上または90%以上である。

[0064] 配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素のファミリー酵素とは、配列番号1に示すアミノ酸配列に対して80%以上100%未満の相同性を有し、かつ、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素を意味する。特に、配列番

号 1 に示すアミノ酸配列において 1 ～ 10 個のアミノ酸が置換、削除、挿入されたアミノ酸配列からなり、かつ、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素を意味する。配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなる酵素のファミリー酵素は、配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対する相同性の下限値が、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上であってもよい。相同性の下限値がこれらの場合においても、上限値はいずれも100%未満である。

[0065] 同様に、配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる酵素のファミリー酵素とは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対して 80%以上 100%未満の相同性を有し、かつ、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素を意味する。特に、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 ～ 10 個のアミノ酸が置換、削除、挿入されたアミノ酸配列からなり、かつ、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素を意味する。配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる酵素のファミリー酵素は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対する相同性の下限値が、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上であってもよい。相同性の下限値がこれらの場合においても、上限値はいずれも100%未満である。

[0066] したがってより具体的には、本発明の第 1 の態様として、以下の酵素（1）～（7）が提供される。

（1）配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなる酵素

（2）配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる酵素

（3）配列番号 1 に示すアミノ酸配列において 1 ～ 10 個のアミノ酸が置換、削除、挿入されたアミノ酸配列からなる酵素であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素

（4）配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 ～ 10 個のアミノ酸が置換、削除、挿入されたアミノ酸配列からなる酵素であって、ガラクトオリゴ

糖生産活性を有する酵素

(5) 配列番号1に示すアミノ酸配列に対する相同性が80%以上100%未満のアミノ酸配列からなる酵素であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素

(6) 配列番号2に示すアミノ酸配列に対する相同性が80%以上100%未満のアミノ酸配列からなる酵素であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素

(7) 前記(1)～(6)の酵素にペプチド等を付加した酵素であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素

[0067] 別の表現をすれば、本発明の第1の態様として、以下のアミノ酸配列(a)～(f)を有する、またはアミノ酸配列(a)～(f)からなる酵素が提供される。

(a) 配列番号1に示すアミノ酸配列

(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列

(c) 配列番号1に示すアミノ酸配列において1～10個のアミノ酸が置換、削除、挿入されたアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列

(d) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1～10個のアミノ酸が置換、削除、挿入されたアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列

(e) 配列番号1に示すアミノ酸配列に対する相同性が80%以上100%未満のアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列

(f) 配列番号2に示すアミノ酸配列に対する相同性が80%以上100%未満のアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列

[0068] また本発明の第1の態様は、上記したような酵素をコードしているDNAも提供する。上述した酵素をコードしていれば、いかなる塩基配列からなる

DNAも本発明の範囲内である。特に、以下に詳しく説明する塩基配列からなるDNAが、そのようなDNAの典型例である。

[0069] 配列番号5に示す塩基配列からなるDNAは配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素をコードしている（3'末端の終始コドンを含む）。配列番号6に示す塩基配列からなるDNAは配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素をコードしている（3'末端の終始コドンを含む）。上述したように配列番号1および配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素はいずれも良好なガラクトオリゴ糖生産活性を有している。よってこれら塩基配列と同一性の高い塩基配列からなるDNAがコードする酵素は、高確率でガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素である。

[0070] また上記DNAに対して、保存的塩基置換されている塩基配列からなるDNAも本発明に含まれる。塩基配列の保存的塩基置換とは、塩基配列における塩基の置換のうち、コードする酵素のアミノ酸配列が変化しない置換を意味する。すなわち、2以上のDNAが、それぞれの塩基配列は相互に異なるが同一アミノ酸配列の酵素をコードしている関係にあることを意味する。

[0071] なお当然のことながら、自身またはコードしている酵素の機能を害しない限り、上記DNAは、付加領域を有していてもよい。このような付加領域としては、例えば、そのDNA自身の繰り返し構造や、終止コドンやオペレーター配列、タグペプチドに対応する領域等が挙げられる。これらが付加される位置は5'末端、3'末端の一方または双方のいずれでもよい。

[0072] したがって、本発明の第1の態様として、以下のDNA(1)～(6)が提供される。

(1) 配列番号5に示す塩基配列からなるDNA

(2) 配列番号6に示す塩基配列からなるDNA

(3) 配列番号5に示す塩基配列に高い同一性を有する塩基配列からなるDNAであって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有しているDNA

(4) 配列番号6に示す塩基配列に高い同一性を有する塩基配列からなる

DNAであって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有しているDNA

(5) 前記(1)～(4)のDNAのいずれかの塩基配列に対して保存的塩基置換されている塩基配列からなるDNA

(6) 前記(1)～(5)のDNAに前記(1)～(5)のDNA、終止コドンやオペレーター配列等を付加したDNAであって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有しているDNA

[0073] あるDNAの塩基配列に高い相同性（または同一性、類似性と表現してもよい）を有する塩基配列からなるDNAとは、あるDNAの塩基配列に対する相同性が80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上である塩基配列からなるDNAを意味する。上限値は特に制限はなく100%未満である。DNAの塩基配列相同性はBLASTアルゴリズムおよびBLAST2.0アルゴリズムを用いた公知のソフトウェアなどを用いて容易に算出することができる。

[0074] これとは別に／これに加えて、あるDNAの塩基配列に高い相同性を有する塩基配列からなるDNAとは、当該あるDNAの塩基配列に相補的な塩基配列からなるDNAに、ストリンジентな条件下でハイブリダイズする、またはハイブリダイズできるDNAを意味する。

[0075] ここで、『ストリンジентな条件』とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件を意味する。ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは、主に、温度、イオン強度、および変性剤の条件によって決定される。ストリンジентな条件としては、例えば、60℃、1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度および温度で洗浄する条件が挙げられる。60℃、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度および温度で洗浄する条件、68℃、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度および温度で洗浄する条件としてもよい。

[0076] したがってより具体的には、本発明の第1の態様として、以下のDNA（

1) ~ (8) が提供される。

(1) 配列番号 5 に示す塩基配列からなる DNA

(2) 配列番号 6 に示す塩基配列からなる DNA

(3) 配列番号 5 に示す塩基配列に対する相同性が 80%以上 100%未満である塩基配列からなる DNA であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する DNA

(4) 配列番号 6 に示す塩基配列に対する相同性が 80%以上 100%未満である塩基配列からなる DNA であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する DNA

(5) 配列番号 5 に示す塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなる DNA であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する DNA

(6) 配列番号 6 に示す塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなる DNA であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する DNA

(7) 前記 (1) ~ (6) の DNA のいずれかの塩基配列に対して保存的塩基置換されている塩基配列からなる DNA

(8) 前記 (1) ~ (7) の DNA に前記 (1) ~ (7) の DNA の繰り返し構造、終止コドンやオペレーター配列等を付加した DNA であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有している DNA

[0077] 別の表現をすれば、本発明の第 1 の態様として、以下の塩基配列 (A) ~ (G) を有する、または塩基配列 (A) ~ (G) からなる DNA が提供される。

(A) 配列番号 5 に示す塩基配列

(B) 配列番号 6 に示す塩基配列

(C) 配列番号 5 に示す塩基配列に対する相同性が 80%以上 100%未満である塩基配列であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する塩基配列

(D) 配列番号6に示す塩基配列に対する相同性が80%以上100%未満である塩基配列であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する塩基配列

(E) 配列番号5に示す塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する塩基配列

(F) 配列番号6に示す塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する塩基配列

(G) (A) ~ (F) のDNAのいずれかの塩基配列に対して保存的塩基置換されている塩基配列

[0078] なお、前記したようなDNAは、例えば、*Paenibacillus*属の細菌（特に*Paenibacillus pabuli*）からゲノムDNAを回収した後、これを鋳型とするPCRによって得ることができる。

[0079] 配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素やその相同体をコードしている構造遺伝子を増幅するためのプライマーのペアとしては、例えば、プライマー1およびプライマー2が挙げられる。

プライマー1：5' - GAACACAAGGTCATGAAAGCAGCAAAGGCAGAT - 3'

プライマー2：5' - CATCCTGTTAAGCTTTTACAATGCCCGAATGAC - 3'

[0080] 配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素やその相同体をコードしている構造遺伝子を増幅するためのプライマーのペアとしては、例えば、プライマー3およびプライマー4が挙げられる。

プライマー3：5' - GAACACAAGGTCATGACCATTTTTCAATTTCCG - 3'

プライマー4：5' - CATCCTGTTAAGCTTTTAACGGATTTCCAGCCAATTG - 3'

[0081] こうして、配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素やその相同体をコードしている構造遺伝子（例えば配列番号5に示す塩基配列からなるDNA）や配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素やその相同体をコードしている構造遺伝子（例えば配列番号6に示す塩基配列からなるDNA）を取得

することができる。

[0082] <ベクター>

本発明の第2の態様として、第1の態様のDNAを含む組換えベクターが提供される。この組換えベクターによって形質転換体の作製および酵素の大量発現が可能となる。

[0083] ベクターとしては特に制限はなく通常使用されるものが使用できる。例えば、プラスミド、バクテリオファージ、コスミド、ファージミドなどが挙げられる。

[0084] プラスミドとしては、例えば、pK4、pRK401、pRF31、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pBIC、pUB110、pTP5、YEp13、YEp24、YCp50などが挙げられる。

[0085] ファージとしてはλファージ（λgt10、λgt11、λZAP等）が挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

[0086] ベクターには、プロモーター、エンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD配列）、開始コドン、終止コドンなどを連結することができる。また、製造する酵素の精製を容易にするためのタグ配列を連結することもできる。タグとしては、Hisタグ、GSTタグ、MBPタグなどの公知のタグを利用できる。またベクターはセレクションのための抗生物質耐性遺伝子などを含んでもよい。

[0087] ベクターにDNAを挿入する手法に特に制限はなく通常使用されるものが使用できる。通常は以下の手法によって行われる。まず、精製されたDNAを適切な制限酵素で切断し、ベクターDNAの制限酵素部位またはマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する。

[0088] <形質転換体>

本発明の第3の態様によれば、第1の態様のDNAおよび／または第2の態様の組換えベクターを含む（または導入させた）形質転換体が提供される

- 。
- [0089] 形質転換体の宿主となる生物に特に制限はなく通常使用されるものが使用できる。原核生物、古細菌、真核生物のいずれも使用可能であり、例えば、真正細菌（大腸菌等）、酵母、植物細胞、動物細胞（COS細胞、CHO細胞等）、昆虫細胞が挙げられる。
- [0090] 宿主としては、特に、Bacillus属、Paenibacillus属、Brevibacillus属（例えばBrevibacillus chosinensis）、Escherichia属（例えばEscherichia coli）、Corynebacterium属、Saccharomyces属、Shizosaccharomyces属、Kluyveromyces属、Pichia属、Aspergillus属、Penicillium属、Trichoderma属の微生物が挙げられる。また、乳酸菌や酢酸菌といった食経験のある微生物が挙げられる。
- [0091] DNAおよび／または組換えベクターをこれら宿主に導入させる手法に特に制限はない。例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。相同組換え等を利用して宿主のゲノム中に挿入または付加してもよい。
- [0092] なお、DNAや組換えベクターが宿主に導入されたか否かの確認手法は任意の手法が使用可能である。例えば、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法等により行うことができる。
- [0093] 前記形質転換体を利用して従来周知な方法によって本発明の酵素やそれを含む組成物を調製することができる。例えば、以下に説明する方法によって調製することができる。
- [0094] 対象遺伝子を導入した前記形質転換体を液体培地で大量培養する。大量培養後、所定の誘導剤を形質転換体に投与して対象遺伝子の発現を誘導させてもよい。例えば、ベクターがLacオペロンを使用している場合にはIPTGを投与して対象遺伝子の発現を誘導させることができる。
- [0095] 大量発現後、培養上清、もしくは細胞を超音波や細胞壁溶解酵素などによって破碎することで得られる破碎液を回収する。この上清や破碎液には本発明の酵素が大量に含まれている。この上清や破碎液を酵素含有液体組成物と

してそのまま使用してもよいし、この液体組成物について精製処理を施して精製酵素として回収してもよい。

[0096] この精製処理は例えば塩析や膜分離、カラムクロマトグラフィーによって実行できる。これら操作は一種もしくは複数を組み合わせることもできる。カラムクロマトグラフィーの種類に制限はないが、これら酵素に特異的に作用する抗体などを含むカラムを使用してもよいし、予め酵素に付加させたHisタグなどのタグドメインと相互作用可能なカラムを使用してもよい。

[0097] このような方法によって、配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素もしくはその相同体または配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素もしくはその相同体を大量に調製することが可能である。これら酵素はガラクトオリゴ糖の製造に用いることができる。

[0098] <GOSの製造方法>

本発明の第4の態様によれば、上述の酵素などの*Paenibacillus pabuli*由来ラクターゼを用いたGOSの製造方法が提供される。

[0099] 本発明の第1の態様で詳述した酵素などの*Paenibacillus pabuli*由来ラクターゼはガラクトオリゴ糖生産活性を有しているため、これを用いて乳糖からGOSを製造することができる。GOS製造の手法や条件は制限されない。1例を挙げて以下に説明するが本発明はこれに制限されない。

[0100] 本発明のGOSの製造方法は、酵素と乳糖とを接触させる工程、この接触によってGOSを製造する工程を含む。任意に製造されたGOSを単離精製する工程を含んでもよい。

[0101] 本発明のGOS製造方法は、上述の酵素と乳糖とを接触させることを含む。乳糖と接触させる酵素は、その酵素を産生する微生物から精製した状態（精製酵素）であってもよい。あるいはその微生物自体と乳糖とを接触させてもよいし、微生物の破砕物や抽出物などの他の因子も混在する混合物と乳糖とを接触させてもよい。副反応を予防する点で精製酵素を乳糖に接触させることが好ましい。

[0102] 精製酵素とは、所定の精製処理を経ることで得られる酵素溶液または酵素

固形物を意味する。主にその酵素以外の酵素を実質的に含まないか、もしくは他の酵素が低減されていることを意味する。

[0103] 乳糖を含有する溶液に酵素等を混合するか、または酵素等を含む溶液に乳糖を混合することでガラクトオリゴ糖を製造するための反応系（溶媒、乳糖、本発明の酵素を含む混合物）が形成される。溶媒は任意であるが、通常は水または水を主成分とする水性溶媒である。

[0104] 反応系の乳糖の含有率は、特に制限はなく任意に設定し得る。反応系全量基準で例えば1～80質量%、2～70質量%または4～60質量%としてもよい。

ある実施態様においては、さらに4～50質量%、4～40質量%、4～30質量%、4～20質量%、4～10質量%としてもよい。このような比較的low基質濃度の領域においては、配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素やそのファミリー酵素が好ましく使用される。これらは K_m 値に優れており、low基質濃度においても十分な活性を有するからである。

別の実施態様では、5～60質量%、10～60質量%、20～60質量%、30～60質量%、40～60質量%としてもよい。このような比較的高基質濃度の領域においては、配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素やそのファミリー酵素が好ましく使用される。これらは良好なGOS生産活性と3糖GOS選択活性を両立しており、短時間に大量の3糖GOSを製造することができる。

[0105] 反応系の本発明の酵素の含有量は、特に制限はなく任意に設定し得る。反応系において例えば0.1～10LU/mLまたは0.1～100U/mLとしてもよい。

[0106] GOS生産活性は反応系によって異なる。本発明の酵素の含有量は次のように決定すればよい。

第一工程として、特定の反応系（乳糖の含有率、本発明の酵素の含有量、反応pH、反応温度、反応時間等）において、本発明の酵素の含有量に対するGOS生産量を確認する。

第二工程として、先の反応系に含まれる、本発明の酵素のラクターゼ活性（LU/mLまたはOU/mLの少なくとも一方）を測定する。

第三工程として、第二工程で測定したラクターゼ活性を指標にして、反応系に含まれる本発明の酵素量を調整する（本発明の酵素の含有量を増加または低減する）。

第四工程として、反応系に含まれる本発明の酵素の含有量を調整した値になるよう含ませる。

なお、上記の第一工程と第二工程は逆に行っても良い。

[0107] 反応系のpHは、特に制限はなく任意に設定し得る。例えば3～9、4～8または5～7としてもよい。当然のことながら、pHは一定でもよいし変動してもよい。

[0108] 反応系の温度は、特に制限はなく任意に設定し得る。例えば20～75℃、30～75℃、40～75℃、50～70℃または60～70℃としてもよい。当然のことながら、温度は一定でもよいし変動してもよい。反応系に含まれる乳糖が溶解する温度を選択することが好ましい。

[0109] 反応時間は、特に制限はなく任意に設定し得る。例えば、1～100時間、12～60時間または24～48時間としてもよい。

[0110] これら一連の製造方法は、回分式でも連続式のいずれでもよい。回分式では、反応器に所定量の酵素と原料乳糖とを投入し、所定時間GOSを生成させた後、GOSを含む混合物を反応器から回収する。連続式では、反応器に酵素および／または原料乳糖を連続的または断続的に投入する。そしてGOSを生成させつつ、GOSを含む混合物を反応器から回収する。

[0111] 本発明において、原料とする乳糖の状態は特に制限はない。任意の溶媒に溶解させた乳糖溶液でも良い。また凝乳した上清であるホエーならびにその濃縮物や脱脂粉乳などの乳糖を含んだ混合物を乳糖原料として使用してもよい。

[0112] 上述した工程の終了時点では、反応系には単糖、二糖、GOSが混在する。そのままGOS溶液として使用してもよいし、これからGOSを精製して

も良い。GOSを精製する手法は特に制限はなく任意のものを採用し得る。例えば、活性炭や金属イオンを配位した陽イオン交換樹脂、ゲル濾過用樹脂を使用するカラムクロマトグラフィーによってそれぞれの画分に分離することができる。

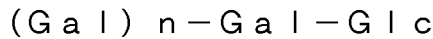
[0113] カラムクロマトグラフィーにおけるカラムのサイズ、溶媒の種類、溶媒の流量などの条件も任意に調整し得るものである。

[0114] ≪本発明2≫

以下、本発明2について詳述する。

[0115] 本発明においてオリゴ糖とは3糖から10糖の多糖化合物を意味する。

[0116] 本発明においてガラクトオリゴ糖（GOSとも表記する）とは、下記一般式で表せるオリゴ糖を主として意味する。



ここで、Galはガラクトース残基、Glcはグルコース残基を表し、nは1～8の整数、特に1～3の整数である。糖間の各結合の結合様式は特に制限されないが、典型的にはβ-1, 4-グリコシド結合である。

[0117] ラクターゼとは、乳糖をβ-ガラクトースとグルコースに加水分解できる酵素である。この分解の際、β-ガラクトシル基を他の分子に転移させることができる。水に転移させればβ-ガラクトースを生じるが、乳糖（Gal-Glc）に転移させれば3糖（上記式のnが1）のガラクトオリゴ糖（Gal-Gal-Glc）を生じる。

[0118] このβ-ガラクトシル基の転移反応が3糖（上記式のnが1）のガラクトオリゴ糖（Gal-Gal-Glc）に対して起これば、4糖（上記式のnが2）のガラクトオリゴ糖（(Gal)₂-Gal-Glc）が生じる。同様に、4糖（上記式のnが2）のガラクトオリゴ糖に対して起これば、5糖（上記式のnが3）のガラクトオリゴ糖が生じる。

[0119] 本発明のガラクトオリゴ糖の製造方法は、ラクターゼ産生微生物としてPaenibacillus属の細菌を使用する。Paenibacillus属の細菌が一般的にガラクトオリゴ糖を産生するとはこれまで報告されていなかった。

[0120] Paenibacillus属の細菌としては、例えば、以下の細菌が挙げられる。下記する細菌はいずれも、土壌などから単離できたり、公的機関に寄託されていたり、当業者であれば容易に入手可能である。

- ・ Paenibacillus themophilus (例えば、寄託番号DSM 24746)
- ・ Paenibacillus popilliae (例えば、寄託番号DSM 22700)
- ・ Paenibacillus thiaminolyticus (例えば、寄託番号NBRC 15656)
-)
- ・ Paenibacillus pabuli (例えば、寄託番号NBRC 13638)
- ・ Paenibacillus alvei (例えば、寄託番号NBRC 3343)
- ・ Paenibacillus alginolyticus (例えば、寄託番号NBRC 15375)
- ・ Paenibacillus chibensis (例えば、寄託番号NBRC 15958)
- ・ Paenibacillus chitinolyticus (例えば、寄託番号NBRC 15660)
-)
- ・ Paenibacillus chondroitinus (例えば、寄託番号NBRC 15376)
- ・ Paenibacillus glucanolyticus (例えば、寄託番号NBRC 15330)
-)
- ・ Paenibacillus lautus (例えば、寄託番号NBRC 15380)
- ・ Paenibacillus macerans (例えば、寄託番号NBRC 15307)
- ・ Paenibacillus peoriae (例えば、寄託番号NBRC 15541)
- ・ Paenibacillus polymyxa (例えば、寄託番号NBRC 15309および寄託番号JCM 2507)
- ・ Paenibacillus validus (例えば、寄託番号NBRC 15382)
- ・ Paenibacillus apiarius (例えば、寄託番号DSM 5581)
- ・ Paenibacillus jamilae (例えば、寄託番号DSM 13815)
- ・ Paenibacillus kribbensis (例えば、寄託番号JCM 11465)
- ・ Paenibacillus terrae (例えば、寄託番号JCM 11466)

[0121] 上述したPaenibacillus属の細菌は、乳糖を原料としてガラクトオリゴ糖を製造することができることが分かった。一般的に、ラクターゼ活性があつて

もガラクトオリゴ糖を生産するとは限らない。ガラクトオリゴ糖の生産性は、遺伝子配列から確認することができないため、ガラクトオリゴ糖の生産性を確認するには実際に試験を行って、ガラクトオリゴ糖の生産性を確認する必要がある。上述した多くのPaenibacillus属において、ガラクトオリゴ糖の生産性を確認できた。また、微生物がオリゴ糖を生産する理由は、糖をオリゴ糖に変えることによって糖を異種微生物に資化され難くすること、富栄養時にオリゴ糖を貯蔵物質として蓄え貧栄養時にこのオリゴ糖を資化すること、乳糖分解に伴う浸透圧変化を予防／低減することが考えられる。近傍種の微生物は同様の遺伝子によって同様の生存戦略を行い得るから、近傍種の微生物は同様のオリゴ糖を生産する能力があると考えられる。これらのことから、Paenibacillus属に属する微生物全般において、ガラクトオリゴ糖が生産されることが推測された。またこれらPaenibacillus属細菌の突然変異株や遺伝子組み換え技術により製造した組換え体等も用いることが可能である。

[0122] Paenibacillus属の細菌は一般に生育速度が速い。また多様な微生物に対して抗菌性を有する。よってガラクトオリゴ糖の製造に際し、これら細菌を大量に培養することは酵母などと比べて容易である。

[0123] 他方、Bacillus属の細菌とは異なり、人体に対する病原性を示すPaenibacillus属の細菌は知られておらず、操作中の安全性も高いものと考えられる。

[0124] これらPaenibacillus属の細菌およびBacillus属の細菌について解析した系統樹が図4である。図4からわかる通り、Paenibacillus属はBacillus属と明確に分岐した属である。

[0125] 本発明のガラクトオリゴ糖の製造方法では、これらPaenibacillus属の細菌の菌体および／または前記細菌のガラクトオリゴ糖生産酵素を乳糖に接触させてガラクトオリゴ糖を製造する。ガラクトオリゴ糖生産酵素は、精製された酵素を使用してもよい。また、この酵素を含有する混合物（酵素含有混合物）を使用してもよい。酵素含有混合物としては、菌体の破砕物や抽出物などの菌体の処理物が挙げられる。処理物は固形でも液状でもよい。細菌が該酵素を菌体外に分泌する場合には菌体を除去した培地も酵素含有混合物とし

て使用できる。

[0126] より具体的には、本発明のガラクトオリゴ糖の製造方法の典型的な実施形態では、

Paenibacillus属の細菌を培養する任意の工程（培養工程）、

Paenibacillus属の細菌の菌体および／またはそのガラクトオリゴ糖生産酵素と原料乳糖を接触させる工程（混合工程）、

原料乳糖からガラクトオリゴ糖を製造させ、ガラクトオリゴ糖混合物を得る工程（ガラクトオリゴ糖生成工程）、

前記GOS混合物からガラクトオリゴ糖を精製する任意の工程（ガラクトオリゴ糖精製工程）、

といった工程が実行される。

[0127] これら一連の製造方法は、回分式でも連続式のいずれでもよい。回分式では、反応器に所定量のPaenibacillus属の細菌と原料乳糖とを投入し、所定時間GOSを生成させた後、GOSを含む混合物を反応器から回収する。連続式では、反応器にPaenibacillus属の細菌やその酵素および／または原料乳糖を連続的または断続的に投入する。そしてGOSを生成させつつ、GOSを含む混合物を反応器から回収する。

[0128] 本発明において、原料とする乳糖の状態は特に制限はない。任意の溶媒に溶解させた乳糖溶液でも良い。また凝乳した上清であるホエーならびにその濃縮物や脱脂粉乳などの乳糖を含んだ混合物を乳糖原料として使用してもよい。

[0129] 接触させる際は操作の利便性のため乳糖もしくはPaenibacillus属の細菌および／またはそのガラクトオリゴ糖生産酵素は適切な溶媒によって流体とすることが好ましい。溶媒は任意であるが、典型的には水または水を主成分とする水性溶媒である。

[0130] 通常、Paenibacillus属の細菌は乳糖に接触させるより前に培養を行う。Paenibacillus属の細菌の培養条件に何ら制限はなく任意である。例えば、嫌氣的または好氣的条件下において液体培地中で約30℃、約3日間培養しても

よい。液体培地の種類に何ら制限はなく任意のものが使用可能である。例えば、ソイビーンカゼインダイジェスト（SCD）培地やブレインハートインヒュージョン（BHI）培地などが挙げられる。

[0131] 培養により得られたPaenibacillus属の細菌は、生死を問わず、培養物あるいはその処理物も有利に用いることができる。培養物を濃縮してもよい。遠心分離により液体培地と菌体を分離し、生理食塩水、蒸留水等で洗浄して湿菌体を得ることができる。その他、培養物の処理物としては、超音波処理物、溶菌酵素処理物、界面活性剤処理物、機械的磨砕処理物等が挙げられる。これらを適切な溶媒に懸濁させて、Paenibacillus属の細菌の菌体および／または酵素を含む流体とすることができる。

[0132] 乳糖とPaenibacillus属の細菌とを混合することでガラクトオリゴ糖を製造するための反応系（溶媒、乳糖、Paenibacillus属の細菌の菌体および／または酵素を含む混合物）が形成される。

[0133] 反応系のPaenibacillus属の細菌の菌体の含有量は、特に制限はなく適宜設定し得る。例えば湿菌体で10～200g/L、30～150g/L、50～100g/Lとしてもよい。破砕物、抽出物、培地などの酵素含有混合物を使用して酵素を含有させる場合、その含有量は、元の菌株が上記範囲になるような量に調整すればよい。

[0134] 反応系の乳糖の含有量は、特に制限はなく適宜設定し得る。例えば反応系全量基準で5～60質量%または30～60質量%としてもよい。乳糖の消費に伴い、適宜乳糖を補充してもよい。

[0135] 反応系の乳糖の含有量に対するPaenibacillus属の細菌の含有量の比率（kg/kg）は、特に制限はなく適宜設定し得る。例えば、乳糖量に対して湿菌体で1/30～1/1、1/20～1/2、1/10～1/5としてもよい。破砕物、抽出物、培地などの酵素含有混合物を使用して酵素を含有させる場合、その含有量は、元の菌株が上記範囲になるような量に調整すればよい。

[0136] 反応系の温度は、特に制限はなく適宜設定し得る。例えば10～75℃、

20～60℃または30～50℃としてもよい。当然のことながら、温度は一定でもよいし変動してもよい。

[0137] 反応系のpHは、特に制限はなく適宜設定し得る。例えば3～9、5～8、6～8、6～7、5または6～7としてもよい。当然のことながら、pHは一定でもよいし変動してもよい。

[0138] 反応系の反応時間は、特に制限はなく適宜設定し得る。例えば1～50時間、5～30時間または12～24時間としてもよい。

[0139] ガラクトオリゴ糖の製造を効率的に行うため、反応系は無機塩類などを含有してもよい。無機塩類などの含有量は例えば反応系全量基準で0.00001～10質量%、0.0001～1質量%である。無機塩類を含むような溶媒として、SCD培地とBHI培地などの液体培地を使用してもよい。

[0140] 上述した工程の終了時点では、反応系には単糖、二糖、GOSが混在する。そのまま菌体含有GOS溶液として使用しても良いし、菌体を除去してGOS溶液として使用しても良いし、これからGOSを精製しても良い。菌体含有GOS溶液から菌体を除去する方法は任意である。例えば遠心分離、フィルタリング、加熱などによる滅菌処理などが挙げられる。GOSを精製する手法は特に制限はなく任意のものを採用し得る。活性炭や金属イオンを配位した陽イオン交換樹脂、ゲル濾過用樹脂を使用するカラムクロマトグラフィーによってそれぞれの画分に分離することができる。

[0141] カラムクロマトグラフィーにおけるカラムのサイズ、溶媒の種類、溶媒の流量などの条件も任意に調整し得るものである。

実施例

[0142] 《本発明1》

以下に実施例を挙げて本発明1を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0143] (実施例1～2：配列番号1および配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素)

Paenibacillus pabuliからゲノムDNAを採取し、これを鋳型にPCRに

よって配列番号1および配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素をコードしているDNA（構造遺伝子）をそれぞれ増幅した。

[0144] 配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素をコードしている構造遺伝子（即ち、配列番号5に示す塩基配列からなるDNA）を増幅するために使用したプライマーのペアはプライマー1および2である。

プライマー1：5' - GAACACAAGGTCATGAAAGCAGCAAAGGCAGAT - 3'

プライマー2：5' - CATCCTGTTAAGCTTTTACAATGCCCGAATGAC - 3'

[0145] 配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素をコードしている構造遺伝子（即ち、配列番号6に示す塩基配列からなるDNA）を増幅するために使用したプライマーのペアはプライマー3および4である。

プライマー3：5' - GAACACAAGGTCATGACCATTTTTCAATTTCCG - 3'

プライマー4：5' - CATCCTGTTAAGCTTTTAACGGATTTCCAGCCAATTG - 3'

[0146] 増幅したそれぞれの構造遺伝子をB I C System (T a K a R a)を用いて、相同組換えによりプラスミドpBICに挿入した。それぞれのプラスミドを*Brevibacillus chosinensis*に導入させ、酵素を大量発現させた。

[0147] 各酵素の産生後、この形質転換体を超音波破碎して細胞破碎液を得た。この破碎液のSDS-PAGEの結果を図1に示す。図1Aは配列番号1に示すアミノ酸配列を有する酵素、図1Bは配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素のSDS-PAGEの結果である。調製した細胞破碎液は、必要に応じて限外ろ過し、酵素を濃縮した。配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素の濃縮破碎液を実施例1、配列番号2に示すアミノ酸配列からなる酵素の濃縮破碎液を実施例2とした。

[0148] 実施例1のラクターゼ活性は、乳糖分解活性が0.4 LU/mLであり、ONPG分解活性が11.70 U/mLであった。

実施例2のラクターゼ活性は、乳糖分解活性が51.7 LU/mLであり、ONPG分解活性が2400 U/mLであった。

[0149] (検証1：反応速度パラメーターの解析)

実施例1の酵素のONPGを基質とした時の反応速度パラメーターを以下

の方法により求めた。0.075～7.5 mMの基質濃度で40℃、10分反応させた時の比活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{min}$) を算出し、各基質濃度に対し比活性をプロットした。このとき、緩衝液には100 mMリン酸ナトリウム (pH 6.5) を用いた。上記方法により測定した基質飽和曲線から、ミカエリス・メンテンの式に則り、酵素と基質の親和性を表す K_m (ミカエリス・メンテン定数) と酵素1 mgあたり、1分間に何 μmol の基質を触媒するか、を示す V_{max} (最大反応速度) を算出した。これと $\beta\text{-gal II}$ の性能と比較したのが表1である。 $\beta\text{-gal II}$ はBacillus circulansの培養液から低分子のラクターゼのみを精製した酵素であり、ビオラクタ (天野エンザイム株式会社製) の主要酵素である (非特許文献1)。

[0150] [表1]

	K_m (mM)	V_{max} (units / mg protein)
実施例 1	0.36	55.0
$\beta\text{-gal II}$	10.0*	56.0*

*非特許文献1より引用

[0151] 表1から明らかな通り、実施例1の酵素はビオラクタに含まれる酵素と最大反応速度は同等であるが、基質ONPGに対する親和性を表す K_m が著しく低い。したがって、本発明の酵素を用いれば、ビオラクタよりも低基質濃度においても効率よくGOSを製造することが可能であると考えられる。

[0152] (比較例)

比較例として、配列番号4に示すアミノ酸配列からなる酵素 (Bacillus circulans由来ラクターゼBg a D-D) を使用した。本酵素を取得するため、Bacillus sp. ATCC 31382株 (旧名Bacillus circulans) からゲノムDNAを採取し、これを鋳型にPCRによって配列番号4に示すアミノ酸配列からなる酵素をコードしている構造遺伝子を増幅した。本遺伝子のN末端側に開始コドン、C末端側に終止コドンを付加し、Brevibacillus chosinensisに導入させ、酵素を大量発現させた。酵素の産生後、この形質転換体を超音波破碎

して細胞破碎液を得た。

[0153] (検証2：GOS製造能力の解析)

実施例1、実施例2および比較例の各サンプルのGOS生成能を評価した。実施例1の酵素では、1 mM硫酸マグネシウムおよび0.064 mM EDTAを含む0.1 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 6.5)に終濃度が系全量基準で30質量%となるよう乳糖を配合し、活性が1.5 LU/mLとなるように酵素を添加した。実施例2の酵素および比較例の各酵素では、0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)に終濃度が系全量基準で60質量%となるよう乳糖を配合し、活性が5.0 LU/mLとなるように酵素を添加した。

[0154] 反応温度を実施例1の酵素では30℃、実施例2および比較例の酵素では50℃として24時間、GOS製造反応を行わせた。所定時間経過後、20 wt%スルホサリチル酸溶液を反応液の1/20量添加して反応を停止させた。

[0155] 実施例1～2および比較例の各サンプルについてHPLCを行い、製造されたGOSの量を解析した。カラムはTransgenomic社製CARBOSep CHO-620 6.5φ×300mmを使用し、移動相は水、流速は0.4 mL/min、温度は85℃、検出はRIの条件にて分析を行った。各サンプルのHPLCの結果を表2に示す。

[0156] 表2中の「GOS」とはGOS含有割合を意味する。より具体的にはGOS(5糖、4糖、3糖)、2糖(未反応ラクトースや転移2糖)、単糖(グルコース、ガラクトース)の合計HPLC面積に対する、GOSのHPLC面積の百分率である。

「収率」とはGOSの生成効率を意味する。より具体的にはGOS生成量/ラクトース消費量の百分率である(HPLCからGOS生成量およびラクトース消費量が算出される)。

なお、6糖以上の糖は実施例1～2及び比較例で確認することはできなかった。

[0157] [表2]

	5糖 (%)	4糖 (%)	3糖 (%)	2糖 (%)	グルコース+ ガラクトース (%)	GOS (%)	収率 (%)	3糖GOSの 製造選択性 (%)
実施例1	0.8	6.1	21.6	41.5	30.1	28.5	48.7	75.8
実施例2	0.4	7.0	33.7	36.4	22.5	41.1	64.6	82.0
比較例	6.0	11.0	23.0	38.5	21.4	40.0	65.0	57.5

[0158] 表2から明らかな通り、実施例1～2の酵素は比較例の酵素よりも3糖GOSの選択性が高い。本発明の酵素はこの点において良好な機能を有していることが明らかとなった。

特に実施例2の酵素はGOSの収率が比較例の酵素と同程度であり、高いGOS製造収率と3糖選択性を両立することができる。

[0159] (検証3：GOSの糖構成)

ヒト母乳中のGOSは、結合様式の違いから4'-GL (Gal β 1-4Gal β 1-4Glc)、3'-GL (Gal β 1-3Gal β 1-4Glc) および6'-GL (Gal β 1-6Gal β 1-4Glc) の3種類の構造が存在し、市販されているGOS製造用ラクターゼの多くは、4'-GLおよび6'-GLをメインとして生成することが知られている。一方、ビフィズス菌の多くは恒常的に3'-GLを菌体内に取り込むトランスポーターを発現している(非特許文献2)。即ち、3'-GLを含むGOSのメリットは、ビフィズス菌が増殖し易い。

[0160] これを踏まえ、比較例のBgaD-Dおよび実施例2のラクターゼによるGOSをHPAEC-PAD (Thermo Fisher Scientific; ICS-3000+, Dionex CarboPac PA1カラム)により分析した(図2)。尚、糖組成の分析条件は下記の通りである。

[0161] ・分析条件：HPAEC-PAD (high performance anion exchange chromatography - pulsed amperometric detection)では、装置にイオンクロマトグラフ ICS-3000 (Thermo Scientific社製)、カラムにCarboPac PA1 (ϕ 4 mm x 250 mm, Thermo Scientific社製)を用いた。移動相は100 mM 水酸化ナトリウム溶液 (A)、100 mM 水酸化ナトリウム含有600 mM 酢酸ナトリウム溶液 (B)、水 (C)、50 mM 酢酸ナトリウム溶液 (D)を用い、グラジエントにて糖を分離した。条件を表3に示す。反応液の糖濃度を0.5 mg/mLとなるように

調製し、分析用サンプルとした。これを流速1.0 mL/min、注入量25 μ L、カラム温度 20°C、検出器PADにて分析した。

[0162] [表3]

Time (min)	%A	%B	%C	%D
0.0	10	0	85	5
25.0	40	0	10	50
60.0	75	25	0	0
60.1	0	100	0	0
65.0	0	100	0	0
65.1	10	0	85	5
72.0	10	0	85	5

[0163] その結果、実施例2のラクターゼが生成する主要なGOSは、4'-GLが主要糖である比較例のラクターゼによって生成するGOSとは異なり、そのピーク位置から3'-GLである可能性が高いことがわかった（表4）。また、実施例2のラクターゼによって生成されるGOSのうち、3糖を分離して構造解析を行ったところ、¹H-NMRスペクトルおよび¹³C-NMRスペクトルが3'-GLのパターンと一致した（非特許文献3）。このことから、本酵素によって生成される主要GOSは3'-GLであると考えられた。

[0164] [表4]

	6'-GL	4'-GL	3'-GL
	19.3 min	28.1 min	29.8 min
比較例	2.78	9.14	N.D.
実施例2	2.65	N.D.	16.6

[0165] 次に、アレルギー性が高い、通称4P-Xと称される4糖（[Gal β 1-4（Gal β 1-4Gal β 1-6）Glc]）の含有確認試験を、比較例のラクターゼにより生成されたGOSと実施例2の酵素により生成されたGOSとに関して実施した。具体的には、これら酵素によって生成されるGOSのうち4糖をBio-Gel P2 Gel（Bio-Rad）を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより分離し、これをHPAEC-PADを用いて分析した。このとき、当社で合成した4P-Xを多く含む標品と比較した（非特許文献4）。その結果、実施例2の酵素により生成されたGOSのみ、4P-Xの位置にピークは確認されなかった（図3）。このことから、実施例2の酵素によって生成されるGOSは4P-Xを含まないことがわかった。

[0166] 《本発明 2》

以下に実施例を挙げて本発明 2 を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0167] (GOS 転移能を有する微生物のスクリーニング)

任意の土壌を乳糖 1% を含む SCD 培地に加え、30℃、250 s p m で 7 日間振とう培養した。この培養液 0.1 mL を同組成の培地 10 mL に移植し、30℃、250 s p m で 7 日間振とう培養した。次いで、培養液を同組成の寒天培地に塗布し、30℃、5 日間程度培養を行った。

また、任意の土壌を乳糖 0.1% を含む SCD 寒天培地に塗布し、30℃、7 日間程度、同様に培養を行った。

[0168] 得られた各コロニーについて、48 ウェルプレートに入れた乳糖 2% を含む SCD 培地 0.5 mL に一白金耳接種し、30℃、500 r p m (振幅 2 mm) で 4 日間振とう培養することでそれぞれの菌株の培養液を回収した。

[0169] 各菌株の培養液について、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) を用いて溶解した乳糖溶液を、乳糖の終濃度が 25~30 質量% となるよう加えた。その後、30℃、500 r p m で 24 時間転移反応を行った。

[0170] 反応終了後、反応液を遠心分離し、上清液を回収した。これを純水で適宜希釈したものを分析用試料とした。HPLC 分析法 (カラムは Transgenomic 社製 CARBOSep CHO-620 6.5φ×300 mm、移動相は水、流速は 0.5 mL/min、温度は 85℃、検出は RI) によって各試料の GOS 量を測定した。試料に GOS が存在することは、その試料の菌株が GOS 転移能を有することを意味する。こうして GOS 転移能を有する菌株を選別した。

[0171] その結果得られた菌株の一部が、*Paenibacillus popilliae*、*Paenibacillus themophilus*、*Paenibacillus pabuli*、*Paenibacillus alvei*、*Paenibacillus thiaminolyticus*、であった。すなわち *Paenibacillus* 属に属する細菌は乳糖から GOS を製造する能力を有することが示唆された。

[0172] 各菌株について、24φ×200 mm 試験管に入れた乳糖 2% を含む SC

D培地と乳糖2%を含むBHI培地、それぞれの培地10mLに一白金耳接種し、30℃、250rpmで4日間振とう培養した。対照として、*Bacillus*属に属する細菌（寄託番号ATCC 31382株：旧名*Bacillus circulans*）を利用して同一条件にて培養した。

培養終了後、培養液0.5mLを48ウェルプレートに移した。これに0.2M酢酸緩衝液（pH6.0）に乳糖濃度が30質量%となるよう乳糖を溶解させた乳糖溶液0.5mLを加え、30℃、500rpmで24時間転移反応を行った。

反応終了後、反応液中のGOSや乳糖の含有量をHPLCによって各成分のピーク面積を解析して、各菌株のGOS製造能力を評価した。その結果を表5に示す。

[0173] [表5]

strain	相同性検索 (BLAST)		GOS生産性			
	相同率 (%)	該当菌株	SCD培地		BHI培地	
			GOS (%)	収率 (%)	GOS (%)	収率 (%)
<i>P. popilliae</i> L3185	100	Sh-14	28.2	64.8	28.5	61.3
<i>P. themophilus</i> G1986	99.7	JCA-1904	17.7	61.7	19.1	61.8
<i>P. themophilus</i> L3450	99.6	JCA-1904	22.4	71.8	20.2	73.5
<i>P. pabuli</i> U5889	99.7	SW12	23.5	68.9	25.2	68.9
<i>P. pabuli</i> S5390	99.6	SW12	22.1	67.4	18.6	64.8
<i>P. alvei</i> T5623	99.7	N184	26.4	71.2	22.1	72.5
<i>P. thiaminolyticus</i> N3839	99.6	NBRC 15656	29.6	66.4	28.6	65.6
<i>Bacillus</i> sp. ATCC 31382	-	-	17.5	55.2	18.0	60.6

[0174] 表5中の「GOS」とはGOS含有割合を意味する。より具体的にはGOS（3糖以上、主として5糖、4糖、3糖）、ラクトース、グルコース、ガラクトースの合計HPLC面積に対する、GOSのHPLC面積の百分率である。

表5中の「収率」とはGOSの生成効率を意味する。より具体的にはGOS生成量／ラクトース消費量の百分率である（HPLCからGOS生成量およびラクトース消費量が算出される）。

表5中の「相同性検索 (BLAST)」の欄における相同率は、各strain

の16S rDNA塩基配列をDNA Data Bank of Japanのサイトなどを利用してBLAST検索を行った時に最も相同性が高かった種（該当菌株）との相同性を意味する。相同性99.5%以上を示した場合にその種と同定した。

[0175] 表5中の各strain及び該当菌株、同定された種の基準株、GOS転移能を有するPaenibacillus属、代表的なBacillus属を用い、アウトグループとしてAneurinibacillus aneurinilyticus DSM 5562を指定し、これらの16S rDNA塩基配列をDNA Data Bank of Japanのサイトなどを利用してアライメントし、系統樹を作成した。系統樹の作成は、遺伝情報処理ソフトウェアであるGENETYX（ゼネティックス社製）を用いた。Paenibacillus属とBacillus属の16S rDNA部分塩基配列に基づく簡易分子系統樹を図4に示す。

[0176] 表5からわかる通り、これらPaenibacillus属の細菌は高い生成割合と収率でGOSを製造することができることがわかった。またこれらのPaenibacillus属の細菌は、対照であるBacillus属の細菌よりも良好な効率でGOSを製造できることが分かった。

[0177] この知見から、Paenibacillus属の他の細菌についても同様の条件下でGOSの製造能力を評価した。使用した菌株とその結果を表6に示す。

[0178]

[表6]

Paenibacillus 属		GOS生産性			
		SCD培地		BHI培地	
		GOS	(収率 %)	GOS	(収率 %)
<i>P. alginolyticus</i>	NBRC 15375 ^T	++		+	
<i>P. alvei</i>	NBRC 3343 ^T	+		++	
<i>P. chibensis</i>	NBRC 15958 ^T	++		++	
<i>P. chitinolyticus</i>	NBRC 15660 ^T	-		+	
<i>P. chondroitinus</i>	NBRC 15376 ^T	++		++	
<i>P. glucanolyticus</i>	NBRC 15330 ^T	-		+	
<i>P. lautus</i>	NBRC 15380 ^T	-		+	
<i>P. macerans</i>	NBRC 15307 ^T	-		++	
<i>P. pabuli</i>	NBRC 13638 ^T	+		+	
<i>P. peoriae</i>	NBRC 15541 ^T	+		++	
<i>P. polymyxa</i>	NBRC 15309 ^T	++		++	
<i>P. thiaminolyticus</i>	NBRC 15656 ^T	+		13.6	(64.1)
<i>P. validus</i>	NBRC 15382 ^T	-		+	
<i>P. apiarius</i>	DSM 5581 ^T	+		++	
<i>P. jamilae</i>	DSM 13815 ^T	+		++	
<i>P. polymyxa</i>	JCM 2507 ^T	++		10.7	(61.6)
<i>P. kribbensis</i>	JCM 11465 ^T	16.6	(60.2)	14.0	(60.4)
<i>P. terrae</i>	JCM 11466 ^T	+		++	
<i>Bacillus</i> sp.	ATCC 31382	7.5	(57.0)	11.0	(60.6)

[0179] 表6中の「GOS」の欄における数値はGOS生成割合を意味し、「++」はGOS生成割合が1%以上であったこと、「+」はGOS生成割合が1%未満であったこと、「-」は実施していないことを意味する。表6中の「収率」は表5のものと同じ意味である。

[0180] 表6の結果から明らかな通り、Paenibacillus属の細菌はGOSを製造する能力があることが分かった。またBacillus circulansは2種類の培地でGOS製造能力に大きな差異は生じなかったが、Paenibacillus属の細菌は2種類の培地でGOS製造能力に大きな差異が生じる場合があることがわかった。

この結果はPaenibacillus属の細菌は、培地などの条件を変えることでGOSの製造能力が大きく左右されることを示唆している。このことから、Paenibacillus属の各細菌に対して最適な条件を設定することで、従来よりも良好なGOS製造量および／またはGOS収率を得られる可能性があることが示唆された。Paenibacillus属がGOS製造に使用可能であることや、その収率が従来よりも良好なものとなり得ることは自明なことではなく、驚くべきことである。

請求の範囲

[請求項1] 以下の（a）～（f）からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する酵素。

（a）配列番号1に示すアミノ酸配列

（b）配列番号2に示すアミノ酸配列

（c）配列番号1に示すアミノ酸配列において1～10個のアミノ酸が置換、削除、挿入されたアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列

（d）配列番号2に示すアミノ酸配列において1～10個のアミノ酸が置換、削除、挿入されたアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列

（e）配列番号1に示すアミノ酸配列に対する相同性が80%以上100%未満のアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列

（f）配列番号2に示すアミノ酸配列に対する相同性が80%以上100%未満のアミノ酸配列であって、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素のアミノ酸配列

[請求項2] 請求項1に記載の酵素をコードしているDNA。

[請求項3] 以下の（A）～（G）からなる群より選択される塩基配列を有するDNA。

（A）配列番号5に示す塩基配列

（B）配列番号6に示す塩基配列

（C）配列番号5に示す塩基配列に対する相同性が80%以上100%未満である塩基配列であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する塩基配列

（D）配列番号6に示す塩基配列に対する相同性が80%以上100%未満である塩基配列であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する塩基配列

(E) 配列番号5に示す塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する塩基配列

(F) 配列番号6に示す塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、コードしている酵素がガラクトオリゴ糖生産活性を有する塩基配列

(G) 前記(A)～(F)のDNAのいずれかの塩基配列に対して保存的塩基置換されている塩基配列

[請求項4] ストリンジエントな条件が、60℃、1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度および温度で洗浄する条件であることを特徴とする請求項3に記載のDNA。

[請求項5] 請求項3または4に記載のDNAがコードしている、ガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素。

[請求項6] 請求項2～4のいずれか1項に記載のDNAを含む組換えベクター。

[請求項7] 請求項2～4のいずれか1項に記載のDNAまたは請求項6に記載の組換えベクターを有する形質転換体。

[請求項8] 請求項7に記載の形質転換体を培養する工程と、培養した形質転換体からガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素を回収する工程と、を含むガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素の調製方法。

[請求項9] 請求項1または5に記載の酵素を有効成分として含む、酵素含有組成物。

[請求項10] 乳糖と、*Paenibacillus pabuli*が生産するガラクトオリゴ糖生産活性を有する酵素と、を接触させることを含むガラクトオリゴ糖の製造方法。

[請求項11] 乳糖と、請求項1または5に記載の酵素と、を接触させることを含むガラクトオリゴ糖の製造方法。

[請求項12] *Paenibacillus*属に属する細菌の菌体および／または前記細菌のガ

ラクトオリゴ糖生産酵素を乳糖に接触させることを含むガラクトオリゴ糖の製造方法。

[請求項13]

Paenibacillus属に属する細菌が、

Paenibacillus themophilus、

Paenibacillus popilliae、

Paenibacillus thiaminolyticus、

Paenibacillus pabuli、

Paenibacillus alvei、

Paenibacillus alginolyticus、

Paenibacillus chibensis、

Paenibacillus chitinolyticus、

Paenibacillus chondroitinus、

Paenibacillus glucanolyticus、

Paenibacillus lautus、

Paenibacillus macerans、

Paenibacillus peoriae、

Paenibacillus polymyxa、

Paenibacillus validus、

Paenibacillus apiarius、

Paenibacillus jamilae、

Paenibacillus kribbensis、

Paenibacillus terrae、

から成る群より選択される1以上の細菌であることを特徴とする、請求項12に記載の方法。

[請求項14]

Paenibacillus属に属する細菌が、

Paenibacillus themophilus、

Paenibacillus popilliae、

Paenibacillus thiaminolyticus、

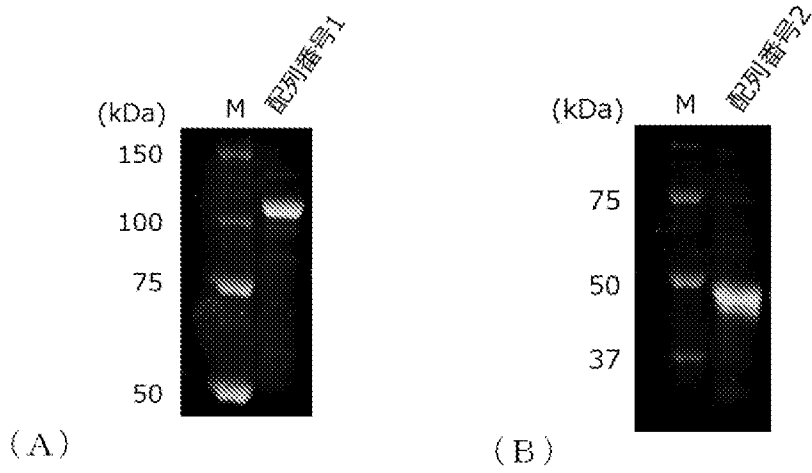
Paenibacillus pabuli、

Paenibacillus alvei、

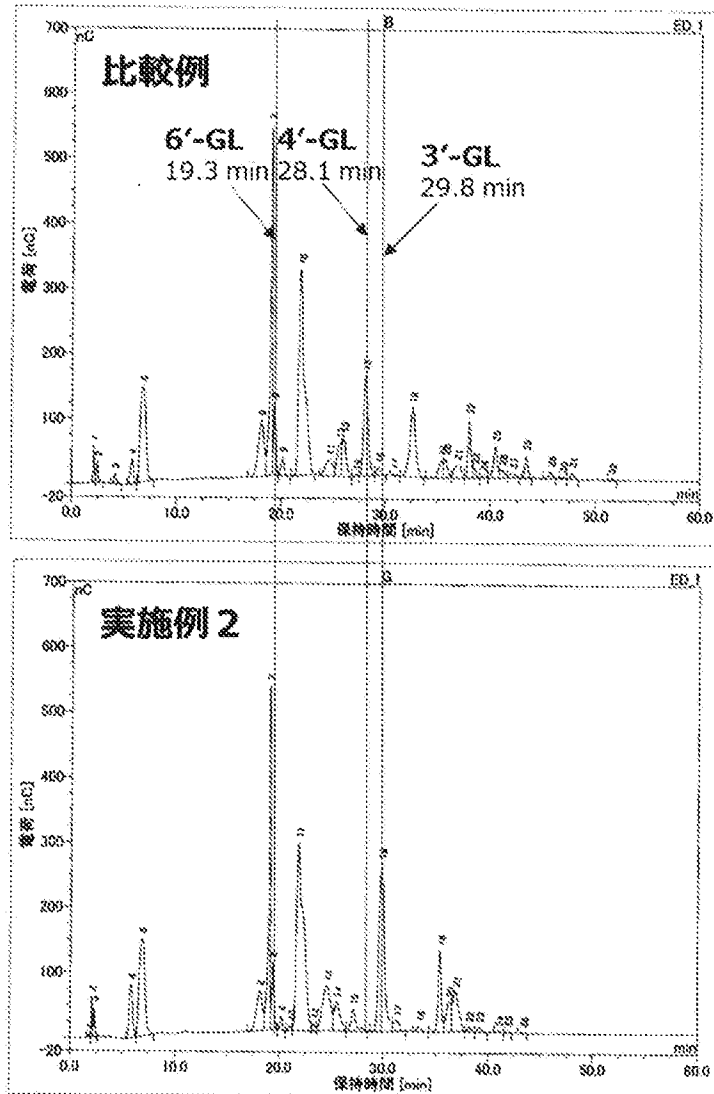
Paenibacillus polymyxa、

から成る群より選択される 1 以上の細菌であることを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

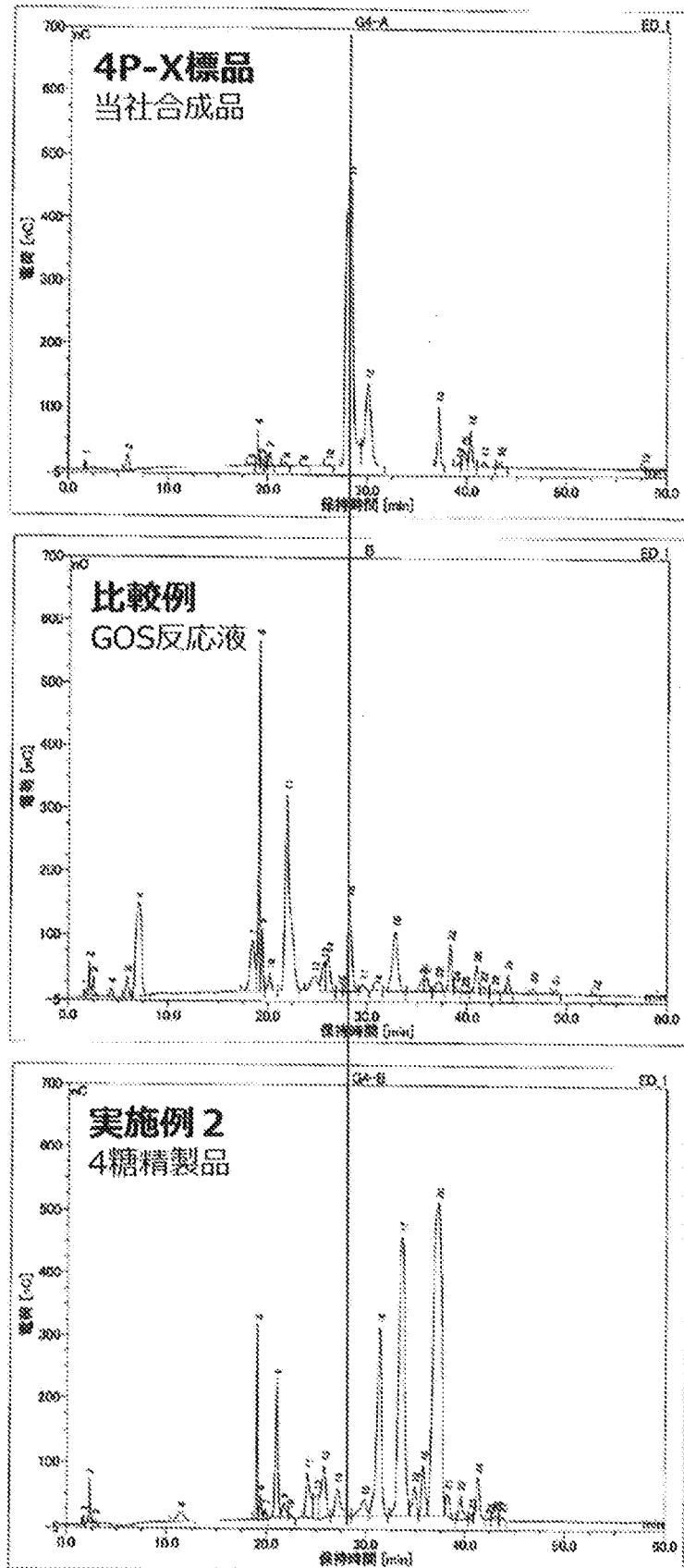
[図1]



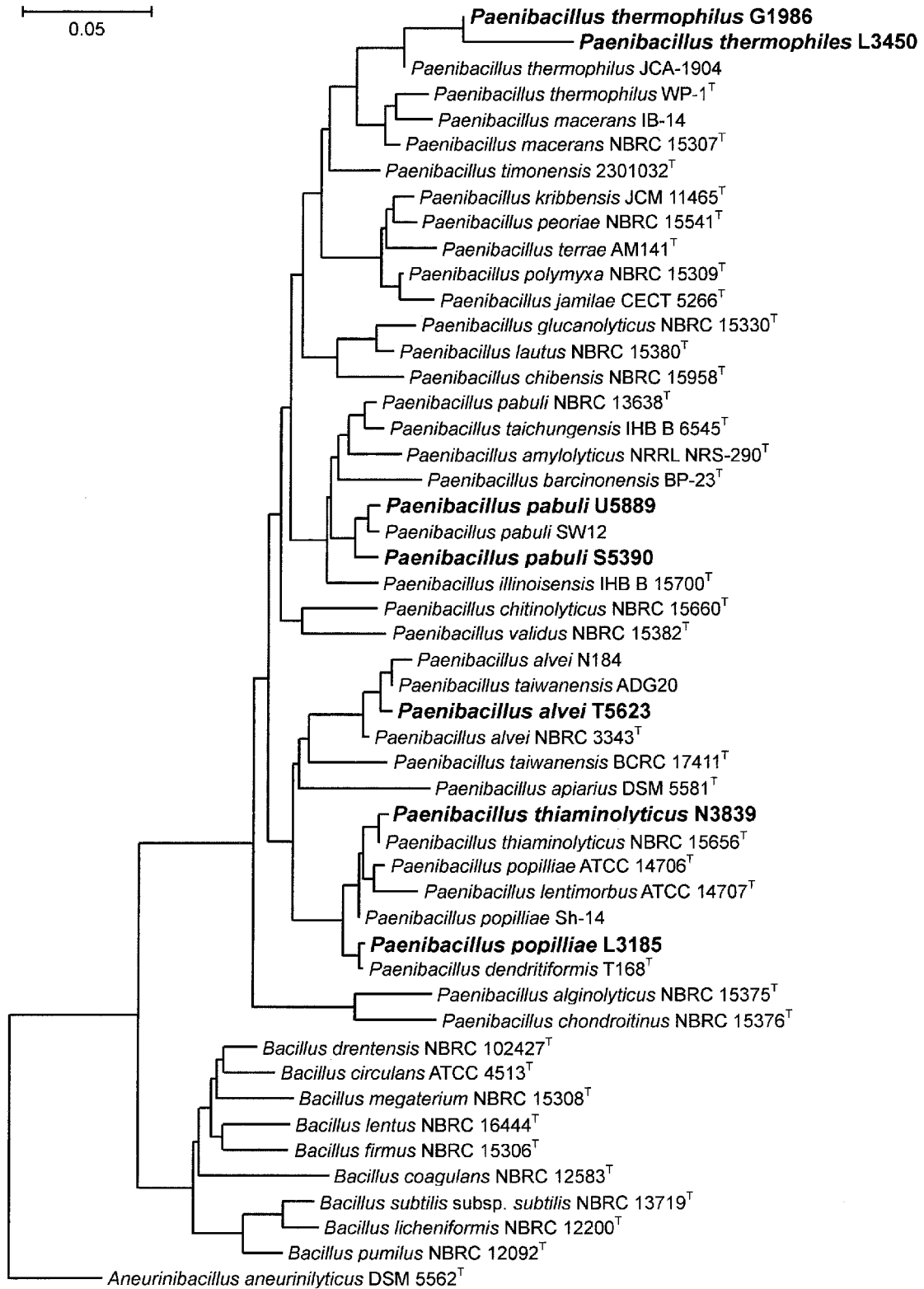
[図2]



[図3]



[圖4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/013549

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. C07K14/195(2006.01)i, C07H3/06(2006.01)i, C12N1/13(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/56(2006.01)i, C12P19/04(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. C07K14/195, C07H3/06, C12N1/13, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/56, C12P19/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019 Registered utility model specifications of Japan 1996-2019 Published registered utility model applications of Japan 1994-2019		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU, Yu et al., "Biochemical characterization of a novel β -galactosidase from Paenibacillus barengoltzii suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis", International Journal of Biological Macromolecules, 2017, vol. 104, pp. 1055-1063, see abstract, fig. 5	12
Y	BENESOVA, Eva et al., " β -D-Galactosidase from Paenibacillus thiaminolyticus catalyzing transfucosylation reactions", Glycobiology, 2010, vol. 20, pp. 442-451, see abstract	10, 12-14
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 12.04.2019	Date of mailing of the international search report 07.05.2019	
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/013549

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEE, Jae-Chan et al., "Paenibacillus woosongensis sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from forest soil", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, vol. 58, pp. 612-616, see abstract, table 1	10, 12-14
Y	RIVAS, Raul et al., "Paenibacillus xylanilyticus sp, nov., an airborne xylanolytic bacterium" International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, vol. 55, pp. 405-408, see abstract	10, 12-14
A	IVY, Reid A. et al., "Identification and Characterization of Psychrotolerant Sporeformers Associated with Fluid Milk Production and Processing" Applied and Environmental Microbiology, 2012, vol. 78, pp. 1853-1864	1-14
A	ISORNA, Pablo et al., "Crystal Structures of Paenibacillus polymyxa β -Glucosidase B Complexes Reveal the Molecular Basis of Substrate Specificity and Give New Insights into the Catalytic Machinery of Family I Glycosidases" J. Mol. Biol., 2007, vol. 371, pp. 1204-1218	1-14
A	SUMIDA, Tomomi et al., "Utilization of Ganglioside-Degrading Paenibacillus sp. Strain TS12 for Production of Glucosylceramide", Applied and Environmental Microbiology, 2002, vol. 68, pp. 5241-5248	1-14

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. C07K14/195(2006.01)i, C07H3/06(2006.01)i, C12N1/13(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/56(2006.01)i, C12P19/04(2006.01)i</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. C07K14/195, C07H3/06, C12N1/13, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/56, C12P19/04</p>														
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2019年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2019年	日本国実用新案登録公報	1996-2019年	日本国登録実用新案公報	1994-2019年			
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2019年													
日本国実用新案登録公報	1996-2019年													
日本国登録実用新案公報	1994-2019年													
<p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN)</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td rowspan="2">LIU, Yu et al., "Biochemical characterization of a novel β-galactosidase from <i>Paenibacillus barengoltzii</i> suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis", International Journal of Biological Macromolecules, 2017, Vol.104, pp.1055-1063, see ABSTRACT、Fig. 5</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>10, 12-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BENESOVA, Eva et al., "β-D-Galactosidase from <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> catalyzing transfucosylation reactions", Glycobiology, 2010, Vol.20, pp.442-451, see ABSTRACT</td> <td>10, 12-14</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	LIU, Yu et al., "Biochemical characterization of a novel β -galactosidase from <i>Paenibacillus barengoltzii</i> suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis", International Journal of Biological Macromolecules, 2017, Vol.104, pp.1055-1063, see ABSTRACT、Fig. 5	12	Y	10, 12-14	Y	BENESOVA, Eva et al., " β -D-Galactosidase from <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> catalyzing transfucosylation reactions", Glycobiology, 2010, Vol.20, pp.442-451, see ABSTRACT	10, 12-14
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
X	LIU, Yu et al., "Biochemical characterization of a novel β -galactosidase from <i>Paenibacillus barengoltzii</i> suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis", International Journal of Biological Macromolecules, 2017, Vol.104, pp.1055-1063, see ABSTRACT、Fig. 5	12												
Y		10, 12-14												
Y	BENESOVA, Eva et al., " β -D-Galactosidase from <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> catalyzing transfucosylation reactions", Glycobiology, 2010, Vol.20, pp.442-451, see ABSTRACT	10, 12-14												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>												
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">1 2 . 0 4 . 2 0 1 9</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center;">0 7 . 0 5 . 2 0 1 9</p>												
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align: center;">日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:60%;">特許庁審査官（権限のある職員）</td> <td style="width:10%;">4 B</td> <td style="width:30%;">1 5 8 5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">吉森 晃</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1</td> <td>内線</td> <td>3 4 4 8</td> </tr> </table>		特許庁審査官（権限のある職員）	4 B	1 5 8 5	吉森 晃			電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1	内線	3 4 4 8		
特許庁審査官（権限のある職員）	4 B	1 5 8 5												
吉森 晃														
電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1	内線	3 4 4 8												

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	LEE, Jae-Chan et al., “ <i>Paenibacillus woosongensis</i> sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from forest soil”, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, Vol.58, pp.612-616, see ABSTRACT, Table 1	10, 12-14
Y	RIVAS, Raul et al., “ <i>Paenibacillus xylanilyticus</i> sp. nov., an airborne xylanolytic bacterium”, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, Vol.55, pp.405-408, see ABSTRACT	10, 12-14
A	IVY, Reid A. et al., “Identification and Characterization of Psychrotolerant Sporeformers Associated with Fluid Milk Production and Processing”, Applied and Environmental Microbiology, 2012, Vol.78, pp.1853-1864	1-14
A	ISORNA, Pablo et al., “Crystal Structures of <i>Paenibacillus polymyxa</i> β -Glucosidase B Complexes Reveal the Molecular Basis of Substrate Specificity and Give New Insights into the Catalytic Machinery of Family I Glycosidases”, J. Mol. Biol., 2007, Vol.371, pp.1204-1218	1-14
A	SUMIDA, Tomomi et al., “Utilization of Ganglioside-Degrading <i>Paenibacillus</i> sp. Strain TS12 for Production of Glucosylceramide”, Applied and Environmental Microbiology, 2002, Vol. 68, pp.5241-5248	1-14