

(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
2024年12月12日(12.12.2024)



(10) 国際公開番号
WO 2024/252885 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/54 (2006.01) C12N 9/92 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12P 19/12 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/018152

(22) 国際出願日: 2024年5月16日(16.05.2024)

(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 2023-094225 2023年6月7日(07.06.2023) JP

(71) 出願人: 帝人株式会社(TEIJIN LIMITED) [JP/JP]; 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 Osaka (JP). 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION

KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 Hyogo (JP).

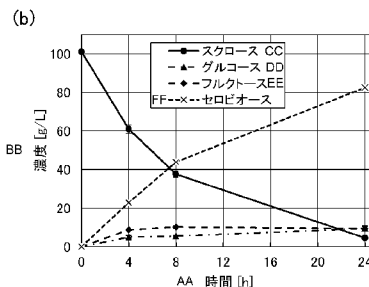
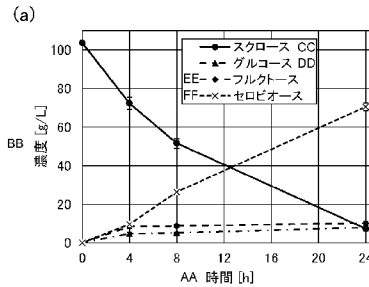
(72) 発明者: 豊原 清綱(Toyohara, Kiyotsuna); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 帝人株式会社内 Osaka (JP). ▲濱▼田 智也(Hamada, Tomoya); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 帝人株式会社内 Osaka (JP). 石丸 淳一(Ishimaru, Junichi); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 帝人株式会社内 Osaka (JP). 猪熊 健太郎(Inokuma, Kentaro); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 安枝 寿(Yasueda, Hisashi); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 蓮沼 誠久(Hasunuma, Tomohisa); 〒6578501

(54) Title: PRODUCTION METHOD FOR CELLOBIOSE

(54) 発明の名称: セロビオースの製造方法

[図3]

図3



AA Time
BB Concentration
CC Sucrose
DD Glucose
EE Fructose
FF Cellobiose

(57) Abstract: Provided is a low-cost, favorably efficient production method for cellobiose. The method includes a step for reacting sucrose in a reaction liquid that contains glucose isomerase and yeast that has been made to express sucrose phosphorylase and cellobiose phosphorylase on the surface thereof.

(57) 要約: 低コストで効率の良いセロビオースの製造方法を提供する。本方法は、スクロースホスホリラーゼ及びセロビオースホスホリラーゼを表層に発現させた酵母とグルコースイソメラーゼを含有する反応液にスクロースを共存させる工程を含む。

WO 2024/252885 A1

兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1 国立大
学法人神戸大学内 Hyogo (JP).

- (74) 代理人: 青木 篤, 外 (AOKI, Atsushi et al.);
〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目 2 3
番 1 号 虎ノ門ヒルズ森タワー 青和特
許法律事務所 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (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, CV, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

明 細 書

発明の名称：セロビオースの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、酵素表層発現酵母によりスクロースからセロビオースを製造する方法に関する。

背景技術

[0002] セロビオースの製造方法としては、従来より酵素分解法と酵素合成法とが知られている。酵素分解法としては、例えば、セルラーゼ製剤をセルロースと反応させることによりセロビオースを得る方法（特許文献1、特許文献2）が知られている。酵素合成法としては、例えば、デンプンを出発物質として、 α グルカンホスホリラーゼ及びセロビオースホスホリラーゼを作用させることでセロビオースを得る方法（非特許文献1）や、スクロースを出発物質として、スクロースホスホリラーゼ、グルコースイソメラーゼ、及びセロビオースホスホリラーゼを作用させることでセロビオースを得る方法（特許文献3、特許文献4）が知られている。

[0003] 酵素分解法では原料としてセルロースを使用する。セルロースは植物の細胞壁の主成分であるが、通常はヘミセルロース、リグニン等との混合物として存在する。そこで、斯かる植物細胞壁中のセルロースを原料として使用する場合には、まずアルカリ処理等の方法でヘミセルロース、リグニン等を除かねばならず、そのため原料の製造コストが高くなるという課題がある。

[0004] 酵素合成法では、デンプンからグルコース1リン酸への変換効率や、スクロースからセロビオースの変換効率が低い上に、酵素を使用した温和な条件（30℃程度）で反応させる必要があるため、反応速度が遅く、低コストでのセロビオース生産には適していないという課題がある。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開平2-295492号公報

特許文献2：特開平8－89274号公報

特許文献3：特開平3－130086号公報

特許文献4：特表2019－507603号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Suzuki et al., J. Appl. Glycosci., (2010), 57:113-119

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、スクロースから高い転換率及び低コストでセロビオースを製造できる方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、スクロースホスホリラーゼ（以下適宜「SP」と記載することがある）及びセロビオースホスホリラーゼ（以下適宜「CBP」と記載することがある）を発現させた酵母とグルコースイソメラーゼ（以下適宜「XI」と記載することがある）を含有する反応液にスクロースを共存させることにより、高い転換率で安価にセロビオースを製造可能となることを見出し、本発明を完成させた。

[0009] 即ち、本発明は以下の発明を包含する。

[項1] スクロースホスホリラーゼ及びセロビオースホスホリラーゼを発現する組換え酵母とグルコースイソメラーゼとを含有する反応液中にスクロースを共存させる反応工程を含む、セロビオースの製造方法。

[項2] 組換え酵母が、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、ピキア (Pichia) 属、又はヤロウィア (Yarrowia) 属の酵母である、項1に記載の製造方法。

[項3] スクロースホスホリラーゼが、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属、ロイコノストック (Leuconostoc) 属、又はストレプトコッカス (Streptococcus) 属の細菌に由来する、項1又は2に記載の製造方法。

[項4] スクロースホスホリラーゼが、組換え酵母から分泌発現される分泌

型スクロースホスホリラーゼと、組換え酵母の細胞壁に係留された状態で発現される係留型スクロースホスホリラーゼとを含む、項 1～3 の何れか一項に記載の製造方法。

[項 5] セロビオースホスホリラーゼが、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、ルミノコッカス (*Ruminococcus*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、又はサーモトガ (*Thermotoga*) 属の細菌に由来する、項 1～4 の何れか一項に記載の製造方法。

[項 6] 前記組換え酵母が、スクロースホスホリラーゼ及びセロビオースホスホリラーゼを単一の菌体で共に発現する組換え酵母である、項 1～5 の何れか一項に記載の製造方法。

[項 7] 前記組換え酵母が、スクロースホスホリラーゼを発現する組換え酵母と、セロビオースホスホリラーゼを発現する組換え酵母との組み合わせである、項 1～6 の何れか一項に記載の製造方法。

[項 8] 前記組換え酵母が、スクロースホスホリラーゼ遺伝子を担持する発現ベクターにより形質転換された酵母である、項 1～7 の何れか一項に記載の製造方法。

[項 9] 前記発現ベクターが、スクロースホスホリラーゼ遺伝子及び酵母の細胞壁ドメイン遺伝子を共に担持する第 1 の発現ベクターと、酵母の細胞壁ドメイン遺伝子を担持せずスクロースホスホリラーゼ遺伝子のみを担持する第 2 の発現ベクターとの組み合わせを含む、項 8 に記載の製造方法。

[項 10] グルコースイソメラーゼが、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属の細菌に由来する、項 1～9 の何れか一項に記載の製造方法。

[項 11] 反応液中にスクロースを共存させる前に、組換え酵母を 45℃～75℃で 15分～150分処理する工程を更に含む、項 1～10 の何れか一項に記載の製造方法。

[項 12] 前記反応工程の前に、炭素源としてグリセロールを用いて酵母細胞を培養する工程を含む、請求項 1～11 の何れか一項に記載の製造方法。

[項 13] 前記反応工程の後に、製造されたセロビオースを反応液から分離

する工程をさらに含む、項 1 ~ 1 2 の何れか一項に記載の製造方法。

[項 1 4] 前記反応工程の後に、前記組換え酵母を反応液から回収し、再度の反応工程に供することをさらに含む、項 1 ~ 1 3 の何れか一項に記載の製造方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、高い転換率及び低コストでスクロースからセロビオースを製造することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図 1 は、スクロースホスホリラーゼを発現する組換え酵母株のスクロースホスホリラーゼ活性測定の結果を示すグラフである。

[図2-1]図 2 は、スクロースホスホリラーゼを発現する組換え酵母株とセロビオースホスホリラーゼを発現する組換え酵母株を併用したスクロースからのセロビオース生産実験の反応液上清中のスクロース、グルコース、フルクトース、及びセロビオース濃度の経時変化を示すグラフである。図 2 (a) のグラフはクロストリジウム・ステルコラリウム (*Clostridium stercorarium*) 由来セロビオースホスホリラーゼ (C s C B P) を発現する株を用いた場合、図 2 (b) のグラフはセルロモナス・ウダ (*Cellulomonas uda*) 由来セロビオースホスホリラーゼ (C u C B P) を発現する株を用いた場合、図 2 (c) のグラフはサーモシフォ・アフリカヌス (*Thermosipho africanus*) 由来セロビオースホスホリラーゼ (T a C B P) を発現する株を用いた場合、図 2 (d) のグラフはサーモトガ・ネアポリタナ (*Thermotoga neapolitana*) 由来セロビオースホスホリラーゼ (T n C B P) を発現する株を用いた場合を示す。

[図2-2]同上。

[図3]図 3 は、スクロースホスホリラーゼとセロビオースホスホリラーゼを共発現する単一の組換え酵母株を用いたスクロースからのセロビオース生産実験の反応液上清中のスクロース、グルコース、フルクトース、及びセロビオース濃度の経時変化を示すグラフである。図 3 (a) のグラフはサッカロマ

イセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) を宿主とする組換え酵母を用いた場合を示し、図3 (b) のグラフはピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) を宿主とする組換え酵母を用いた場合を示す。

[図4] 図4は、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) を宿主とし、スクロースホスホリラーゼとセロビオースホスホリラーゼを共発現する単一の組換え酵母株を用いたスクロースからのセロビオース生産実験の反応液上清中のスクロース、グルコース、フルクトース、及びセロビオース濃度の経時変化を示すグラフである。図4 (a) のグラフはグルコースを炭素源として培養した P p - S P 2 C B P 株を用いた場合の結果を示し、図4 (b) のグラフはグリセロールを炭素源として培養した P p - S P 2 C B P 株を用いた場合の結果を示す。

[図5] 図5は、スクロースホスホリラーゼとセロビオースホスホリラーゼを共発現する単一の組換え酵母株を用いたスクロースからの繰り返しセロビオース生産実験の反応液上清中のスクロース、グルコース、フルクトース、及びセロビオース濃度の経時変化を示すグラフである。図5 (a) のグラフはサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) を宿主とする組換え酵母を、グルコースを炭素源として培養した場合の結果を示し、図5 (b) のグラフはピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) を宿主とする組換え酵母を、グリセロールを炭素源として培養した場合の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を具体的な実施の形態に即して詳細に説明する。但し、本発明は以下の実施の形態に束縛されるものではなく、本発明の趣旨を逸脱しない範囲において、任意の形態で実施することが可能である。なお、本明細書に記載した特許文献及び非特許文献は、その全体が援用により本願に組み込まれる。

[0013] なお、本明細書において、アミノ酸配列の「同一性」 (identity) とは、一致するアミノ酸残基の割合を意味し、「相同性」 (similarity) とは、一致又は類似するアミノ酸残基の割合を意味する。アミノ酸配列の相同性及び

同一性は、例えばBLAST法（NCBIのPBLASTのデフォルト条件）により決定することができる。また、例えば「80%以上の相同性」と表現するときには、「80%以上の同一性」の場合を含んでいることは明らかである。

[0014] また、本明細書において、「類似するアミノ酸残基」とは、同様の化学的特質（例えば、電荷又は疎水性）を持つ側鎖を有するアミノ酸残基を意味する。類似するアミノ酸残基としては、例えば以下の組合せが挙げられる。

（1）脂肪族側鎖を有するアミノ酸残基：グリシン（Gly又はG）、アラニン（Ala又はA）、バリン（Val又はV）、ロイシン（Leu又はL）、及びイソロイシン（Ile又はI）残基。

（2）脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸残基：セリン（Ser又はS）及びトレオニン（Thr又はT）残基。

（3）アミド含有側鎖を有するアミノ酸残基：アスパラギン（Asn又はN）及びグルタミン（Gln又はQ）残基。

（4）芳香族側鎖を有するアミノ酸残基：フェニルアラニン（Phe又はF）、チロシン（Tyr又はY）、及びトリプトファン（Trp又はW）残基。

（5）塩基性側鎖を有するアミノ酸残基：リジン（LysまたK）、アルギニン（Arg又はR）及びヒスチジン（His又はH）残基。

（6）酸性側鎖を有するアミノ酸残基：アスパラギン酸（Asp又はD）及びグルタミン酸（Glu又はE）残基。

（7）硫黄含有側鎖を有するアミノ酸残基：システイン（Cys又はC）、及びメチオニン（Met又はM）残基。

さらに、（1）とメチオニン（Met又はM）の組み合わせ、及び、（4）とヒスチジン（His又はH）残基の組み合わせも、類似するアミノ酸残基として扱われる。

[0015] 本発明の一側面は、セロピオースの製造方法に関する。斯かる製造方法は、スクロースホスホリラーゼ（SP）及びセロピオースホスホリラーゼ（C

B P) を発現する組換え酵母と、グルコースイソメラーゼ (X I) とを含有する反応液中に、スクロースを共存させる工程を含む。

[0016] 酵母の種は、スクロースホスホリラーゼ (S P) 及びセロビオースホスホリラーゼ (C B P) を発現可能なものであれば、特に限定されない。例としては、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、又はヤロウィア (*Yarrowia*) 属の酵母が挙げられる。中でも、スクロースがインベルターゼの作用により分解されることを防ぐために、細胞表層にインベルターゼ活性を持たない酵母を用いることが好ましく、例としては、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) が挙げられる。サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のように細胞表層に強いインベルターゼ活性を持つ酵母については、遺伝子のノックアウトなどによりインベルターゼ活性を喪失させた株を用いることが好ましい。なお、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) は、コマガタエラ・パストリス (*Komagataella pastoris*) 及びコマガタエラ・ファフィ (*Komagataella phaffii*) に分類及び改名されているため、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) は、コマガタエラ・パストリス (*Komagataella pastoris*) 及びコマガタエラ・ファフィ (*Komagataella phaffii*) の両方の同義語である。

[0017] スクロースホスホリラーゼ (S P) の由来 (種) は特に限定されない。例としては、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属、ロイコノストック (*Leuconostoc*) 属、又はストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属の細菌に由来するものが挙げられる。中でも、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属の細菌に由来するものが好ましく、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) に由来するものがとりわけ好ましい。ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) のスクロースホスホリラーゼ (S P) のアミノ酸配列を配列番号 34 に示し、これをコードする塩基配列の一例を配列番号 5 に示す。ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) に由来するスクロースホスホリラーゼ (S P) としては、前記の配列番号 34 と 80% 以上、又は 85% 以上、又は 88% 以上、又

は90%以上、又は93%以上、又は95%以上、又は97%以上、又は98%以上、又は99%以上の相同性（好ましくは同一性）を有するアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。

[0018] スクロースホスホリラーゼ（SP）を組換え酵母に発現させる場合、組換え酵母から分泌発現される分泌型酵素の形態と、組換え酵母の細胞壁に係留された状態で発現される係留型酵素の形態とが考えられるが、どちらの形態でもよい。ただし本発明では、組換え酵母から分泌発現される分泌型スクロースホスホリラーゼ（SP）と、組換え酵母の細胞壁に係留された状態で発現される係留型スクロースホスホリラーゼ（SP）とを、反応液内に共存させることが好ましい。これにより、スクロースホスホリラーゼ（SP）による変換効率を向上させることが可能となる。その理由は定かではないが、分泌型スクロースホスホリラーゼ（SP）と係留型スクロースホスホリラーゼ（SP）が二量体を形成することによるものと推測される。

[0019] セロビオースホスホリラーゼ（CBP）の由来（種）は特に限定されないが、クロストリジウム（Clostridium）属、ルミノコッカス（Ruminococcus）属、セルロモナス（Cellulomonas）属、又はサーモトガ（Thermotoga）属の細菌に由来するものが挙げられる。中でも、クロストリジウム（Clostridium）属の細菌に由来するものが好ましく、クロストリジウム・ステルコラリウム（Clostridium stercorarium）由来のものがとりわけ好ましい。クロストリジウム・ステルコラリウム（Clostridium stercorarium）のセロビオースホスホリラーゼ（CBP）のアミノ酸配列を配列番号35に示し、これをコードする塩基配列の一例を配列番号6に示す。クロストリジウム・ステルコラリウム（Clostridium stercorarium）に由来するセロビオースホスホリラーゼ（CBP）としては、前記の配列番号35と80%以上、又は85%以上、又は88%以上、又は90%以上、又は93%以上、又は95%以上、又は97%以上、又は98%以上、又は99%以上の相同性（好ましくは同一性）を有するアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。

[0020] セロビオースホスホリラーゼ（CBP）を組換え酵母に発現させる場合、

組換え酵母から分泌発現される分泌型酵素の形態と、組換え酵母の細胞壁に係留された状態で発現される係留型酵素の形態とが考えられるが、どちらの形態でもよい。ただし本発明では、組換え酵母の細胞壁に係留された状態で発現される係留型セロビオースホスホリラーゼ（CBP）の形態とすることが好ましい。

[0021] 組換え酵母としては、スクロースホスホリラーゼ（SP）及びセロビオースホスホリラーゼ（CBP）を単一の菌体で共発現する組換え酵母を用いてもよく、スクロースホスホリラーゼ（SP）を発現する組換え酵母と、セロビオースホスホリラーゼ（CBP）を発現する組換え酵母とを組み合わせ用いてもよい。また、スクロースホスホリラーゼ（SP）及び／又はセロビオースホスホリラーゼ（CBP）として、分泌型酵素と係留型酵素とを併用する場合には、分泌型酵素及び係留型酵素を単一の菌体で共発現する組換え酵母を用いてもよく、分泌型酵素を発現する組換え酵母と、係留型酵素を発現する組換え酵母とを組み合わせ用いてもよい。

[0022] スクロースホスホリラーゼ（SP）及び／又はセロビオースホスホリラーゼ（CBP）を発現する組換え酵母を調製する手法は特に制限されない。例としては、スクロースホスホリラーゼ（SP）遺伝子及び／又はセロビオースホスホリラーゼ（CBP）遺伝子を担持する1種又は2種以上の発現ベクターで、1種又は2種以上の酵母を形質転換する手法を挙げることができる。発現ベクターとしては、プラスミド、コスミド、ラムダファージ等が挙げられるが、プラスミドが好ましい。また、スクロースホスホリラーゼ（SP）遺伝子及び／又はセロビオースホスホリラーゼ（CBP）遺伝子を、更にプロモーター、ターミネーター等の調節配列を作動式に連結し、酵母細胞内で自律的に発現可能な発現カセットの形態として、発現ベクターに担持させることが好ましい。なお、斯かる発現ベクターの構築は、当業者に公知の遺伝子工学の標準的な手法を用いて、例えばMichael R. Green et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Fourth Edition, (2012), Cold Spring Harbor Laboratory等の文献を適宜参照することにより実施することが可能で

ある。

- [0023] 組換え酵母は、反応に先立って炭素源の存在下で前培養することが好ましい。組換え酵母の細胞を培養する際に用いる炭素源の種類は特に制限されず、酵母の種類に応じて適宜選択すればよい。例としてはグルコース、グリセロール等が挙げられる。中でも、本発明では炭素源として少なくともグリセロールを使用することが好ましい。これにより、スクロースからセロビオースへの転換率を向上できる。
- [0024] 組換え酵母は、反応に先立って前処理に供し、グルコースの取り込みを停止させることが好ましい。かかる前処理としては、一定の温度に一定時間に亘って晒す加熱処理が挙げられる。この場合の処理条件は、用いる酵母のグルコース取り込みを停止させることができさえすればよく、加熱温度としては例えば45℃以上、又は50℃以上、又は55℃以上とすることができ、また、例えば75℃以下、又は70℃以下、又は65℃以下とすることができ、また、加熱時間としては例えば15分以上、又は45分以上、又は70分以上とすることができ、また、例えば150分以内、又は120分以内、又は100分以内とすることができ、好ましい一例によれば、温度は約60℃、時間は約90分間とすることができ、かかる前処理の方法の一例としては、形質転換酵母の懸濁液を前記条件で振とうすることが挙げられる。
- [0025] 本発明では、スクロースホスホリラーゼ（SP）及びセロビオースホスホリラーゼ（CBP）を発現する組換え酵母を含む反応液中に、グルコースイソメラーゼ（XI）を共存させる。反応液中の組換え酵母の菌体量は、特に制限されるものではないが、例えば25g湿潤細胞/L以上、又は50g湿潤細胞/L以上、又は75g湿潤細胞/L以上、また、例えば200g湿潤細胞/L以下、又は150g湿潤細胞/L以下、又は100g湿潤細胞/L以下とすることができ、
- [0026] グルコースイソメラーゼ（別名キシロースイソメラーゼ、XI）としては、限定されるものではないが、例えば、ストレプトマイセス（*Streptomyces*

) 属の酵母に由来するものが挙げられる。中でも、ストレプトマイセス・グリセオフスキス (*Streptomyces griseofuscus*) に由来するものがとりわけ好ましい。なお、グルコースイソメラーゼとしては種々の市販品を入手できる場所、それらを用いることができる。

[0027] グルコースイソメラーゼ (X1) は、他の酵素と同様に酵母又はその他の微生物に発現させてもよいが、単離されたグルコースイソメラーゼ (X1) 酵素そのものを用いることが好ましい。単離されたグルコースイソメラーゼ (X1) 酵素としては、市販品あるいはこれら酵素を生産する微生物等の培養により得られたもののいずれでもよい。また精製品あるいは未精製品のいずれでもよい。この場合、スクロースホスホリラーゼ (SP) 及びセロビオースホスホリラーゼ (CBP) を発現する組換え酵母を含む反応液に、単離されたグルコースイソメラーゼ (X1) 酵素を加えて共存させることが好ましい。

[0028] グルコースイソメラーゼ (X1) の量は、特に制限されないが、通常はスクロース1モルに対し0.01単位以上、又は0.1単位以上、又は1.0単位以上とすることが好ましい。ここで1単位 (1U) とは、50℃において1wt/vol%のスクロースに、pH7.0において1分間に1 μ molのフルクトースを分解する酵素量を意味する。

[0029] 本発明では、スクロースホスホリラーゼ (SP) 及びセロビオースホスホリラーゼ (CBP) を発現する組換え酵母とグルコースイソメラーゼ (X1) とを含む反応液中に、スクロースを共存させて反応を実施する。スクロースは、天然に存在するものでもよく、化学合成されたものでもよい。スクロースの量は、特に制限されないが、生産性の点からはできるだけ高い濃度が好ましい。ただし、生成するセロビオースの溶解度は15から20%程度なので、溶解した状態を保ちたい場合には10から20%程度のスクロース濃度を用いるのが好ましい。

[0030] セロビオース合成反応時の条件は、制限されるものではないが、例えば以下の通りとすることができ。即ち、反応温度としては例えば35℃以上、

又は45℃以上、又は50℃以上、また、例えば60℃以下、又は70℃以下とすることができる。また、反応時間としては例えば60分以上、又は12時間以上、又は24時間以上とすることができ、また、例えば36時間以内、又は48時間以内とすることができる。反応時の圧力は特に制限されず、減圧下でも常圧下でも加圧下でもよいが、通常は常圧下で行うことができる。反応時の雰囲気も特に制限されず、使用する組換え酵母が生育できない雰囲気下でも酵素の活性が保持される限り、任意の雰囲気とすることができる。

[0031] 反応の終了後、必要に応じてセロビオースを反応液から分離・精製することにより、セロビオースを得ることができる。分離・精製の手法は特に制限されず、任意の手法を用いることができるが、例えばろ過分離、遠心分離、膜分離等が挙げられる。これらの方法により、用いた菌体とセロビオースを効率的に分離することができる。さらに、得られたセロビオースあるいはその溶液中の不純物を除くために、イオン交換樹脂で処理をしたり、再結晶をすることでより高度に精製してもよい。

[0032] なお、反応の終了後、必要に応じて組換え酵母を反応液から分離・回収し、セロビオース合成反応に再利用してもよい。本発明の組換え酵母は、こうして反応液から分離・回収して再利用した場合でも、酵素活性が維持され、繰り返し高いセロビオース合成効率が得られる場合がある。即ち、好ましい態様によれば、本発明のセロビオースの製造方法は、前記反応工程の後に、前記組換え酵母を反応液から回収し、再度の反応工程に供することをさらに含む。組換え酵母を反応液から分離・回収する手法は限定されないが、例えば遠心分離等が挙げられる。前記組換え酵母の分離・回収及び再利用の回数は特に限定されないが、一態様によれば、例えば2回以上、又は3回以上、又は4回以上、又は5回以上の反応に供することが出来る。前記組換え酵母の再利用時の活性は特に限定されないが、一態様によれば、前段の反応に於ける活性の60%以上、又は70%以上、又は80%以上、又は90%以上の活性が、次段の反応でも維持されることが好ましい。

実施例

[0033] 以下、本発明を実施例に則して更に詳細に説明するが、これらの実施例はあくまでも説明のために便宜的に示す例に過ぎず、本発明は如何なる意味でもこれらの実施例に限定されるものではない。

[0034] なお、本実施例に示すPCR法は、何れもKOD One™ PCR Master Mix（東洋紡）を用いて実施した。また、本実施例に示す全ての酵母への遺伝子導入は、酢酸リチウム法によって実施した。

[0035] 「実施例群 I：形質転換酵母（スクロースホスホリラーゼ表層提示酵母、セロビオースホスホリラーゼ表層提示酵母、及びスクロースホスホリラーゼ＋セロビオースホスホリラーゼ表層提示酵母）を利用したセロビオース生産」

[0036] A. 形質転換酵母の作製

酵母サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741 Δ SUC2株に、調製したプラスミドを使用して酢酸リチウム法によって、スクロースホスホリラーゼ (SP) 及びセロビオースホスホリラーゼ (CBP) の2種の酵素を発現する種々の組換え酵母株を構築した。以下具体的に記載する。

[0037] ・菌株及び培地

菌株としては、酵母サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741株 (MAT α his3 leu2 met15 ura3株) 及び酵母サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741 Δ SUC2株 (MAT α his3 leu2 met15 ura3 suc2株) を用いた。酵母サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741株をATCC (アメリカンタイプカルチャーコレクション) から、酵母サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741 Δ SUC2株をYeast deletion MAT-A complete set (Thermo Fisher Scientific) から、それぞれ入手した。

[0038] ・発現カセットを含むプラスミドの構築

下記発現カセットX1～X9をそれぞれ含むプラスミドを、以下の手順に

より調製した。

・ X 1 : S E D 1 プロモーター (配列番号 1) + S E D 1 分泌シグナル (配列番号 2) + B I S P (配列番号 5) + S E D 1 アンカーリング領域 (配列番号 3) + D I T 1 ターミネーター (配列番号 4)

・ X 2 : S E D 1 プロモーター (配列番号 1) + S E D 1 分泌シグナル (配列番号 2) + B I S P (配列番号 5) + D I T 1 ターミネーター (配列番号 4)

・ X 3 : S E D 1 プロモーター (配列番号 1) + S E D 1 分泌シグナル (配列番号 2) + C s C B P (配列番号 6) + S E D 1 アンカーリング領域 (配列番号 3) + D I T 1 ターミネーター (配列番号 4)

・ X 4 : S E D 1 プロモーター (配列番号 1) + S E D 1 分泌シグナル (配列番号 2) + C u C B P (配列番号 7) + S E D 1 アンカーリング領域 (配列番号 3) + D I T 1 ターミネーター (配列番号 4)

・ X 5 : S E D 1 プロモーター (配列番号 1) + S E D 1 分泌シグナル (配列番号 2) + T a C B P (配列番号 8) + S E D 1 アンカーリング領域 (配列番号 3) + D I T 1 ターミネーター (配列番号 4)

・ X 6 : S E D 1 プロモーター (配列番号 1) + S E D 1 分泌シグナル (配列番号 2) + T n C B P (配列番号 9) + S E D 1 アンカーリング領域 (配列番号 3) + D I T 1 ターミネーター (配列番号 4)

・ X 7 : S P I 1 プロモーター (配列番号 10) + S P I 1 分泌シグナル (配列番号 11) + B I S P (配列番号 5) + G C W 30 アンカーリング領域 (配列番号 12) + A O X 1 ターミネーター (配列番号 13)

・ X 8 : S P I 1 プロモーター (配列番号 10) + S P I 1 分泌シグナル (配列番号 11) + B I S P (配列番号 5) + A O X 1 ターミネーター (配列番号 13)

・ X 9 : S P I 1 プロモーター (配列番号 10) + S P I 1 分泌シグナル (配列番号 11) + C s C B P (配列番号 6) + G C W 30 アンカーリング領域 (配列番号 12) + A O X 1 ターミネーター (配列番号 13)

[0039] (調製例 1-1 : ビフィドバクテリウム・ロングム (Bifidobacterium longum) 由来スクロースホスホリラーゼ (BISP) 表層発現カセット X1 を含有するベクタープラスミドの調製)

ビフィドバクテリウム・ロングム (Bifidobacterium longum) 由来スクロースホスホリラーゼ (BISP) 遺伝子のコーディング領域を含む DNA 断片を遺伝子合成により調製した。次に、ベクタープラスミド pIEG-SSSD (サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来 SED1 プロモーター、サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来 SED1 の分泌シグナルペプチド配列、トリコデルマ・リーセイ由来エンドグルカナーゼ II (TrEGII) 遺伝子のコーディング領域、サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来 SED1 遺伝子のコーディング領域 (SED1 アンカーリング領域)、及びサッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来 DIT1 遺伝子のターミネーター領域がこの順に配置されている発現カセットを有する表層発現用ベクター : Applied Microbiology and Biotechnology, Vol.105, 2021, 5895-5904) を鋳型とし、プライマー対 SED1 a-F (配列番号 14) 及び SED1 s s-R (配列番号 15) を用いて PCR 法により増幅し、TrEGII 遺伝子のコーディング領域を除いたベクタープラスミド全長を含む DNA 断片を調製した。これらの断片を In-Fusion 法により連結した。得られた発現カセット X1 (SED1 プロモーター (配列番号 1) + SED1 分泌シグナル (配列番号 2) + BISP (配列番号 5) + SED1 アンカーリング領域 (配列番号 3) + DIT1 ターミネーター (配列番号 4)) を含むプラスミドを pIBISP-SSSD と命名した。

[0040] (調製例 1-2 : ビフィドバクテリウム・ロングム (Bifidobacterium longum) 由来スクロースホスホリラーゼ (BISP) 分泌発現カセット X2 を含有するベクタープラスミドの調製)

プラスミド pIBISP-SSSD を鋳型とし、プライマー対 DIT1 t-F (配列番号 16) 及び BISP-R (配列番号 17) を用いて PCR 法

により増幅し、S E D 1 アンカーリング領域を除いたプラスミド全長を含む DNA 断片を調製した。この断片の両端を *I n - F u s i o n* 法により連結し、閉環させた。次に、このプラスミドを鋳型とし、プライマー対 B I S P - F (配列番号 18) 及び D I T 1 t - R (配列番号 19) を用いて P C R 法により増幅し、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) 由来スクロースホスホリラーゼ (B I S P) 遺伝子のコーディング領域及びサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来 D I T 1 遺伝子のターミネーター領域を含む DNA 断片を調製した。また、ベクタープラスミド p I L 2 - B G - S S S (サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来 S E D 1 プロモーター、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来 S E D 1 の分泌シグナルペプチド配列、アスペルギルス・アクレアタス由来 β -グルコシダーゼ 1 (A a B G L 1) 遺伝子のコーディング領域、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来 S E D 1 遺伝子のコーディング領域 (S E D 1 アンカーリング領域)、及びサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来 α -アグルチニン遺伝子のターミネーター領域がこの順に配置されている発現カセットを有する表層発現用ベクター: *Metabolic Engineering, Vol. 57, 2020, 110-117*) を鋳型とし、プライマー対 p R S 4 0 3 - F (配列番号 20) 及び S E D 1 s s - R (配列番号 15) を用いて P C R 法により増幅し、アスペルギルス・アクレアタス由来 β -グルコシダーゼ 1 (A a B G L 1) 遺伝子のコーディング領域、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来 S E D 1 遺伝子のコーディング領域 (S E D 1 アンカーリング領域)、及びサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来 α -アグルチニン遺伝子のターミネーター領域を除いたベクタープラスミド全長を含む DNA 断片を調製した。これらの断片を *I n - F u s i o n* 法により連結した。得られた発現カセット X 2 (S E D 1 プロモーター (配列番号 1) + S E D 1 分泌シグナル (配列番号 2) + B I S P (配列番号 5) + D I T 1 ターミネーター (配列番号 4)) を含むプ

ラスミドを p I L 2 - B I S P - S S D と命名した。

[0041] (調製例 1 - 3 : クロストリジウム・ステルコラリウム (Clostridium stercorarium) 由来セロビオースホスホリラーゼ (C s C B P) 表層発現カセット X 3 を含有するベクタープラスミドの調製)

クロストリジウム・ステルコラリウム (Clostridium stercorarium) 由来セロビオースホスホリラーゼ (C s C B P) 遺伝子のコーディング領域を含む DNA 断片を遺伝子合成により調製した。次に、ベクタープラスミド p I E G - S S S D (サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来 S E D 1 プロモーター、サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来 S E D 1 の分泌シグナルペプチド配列、トリコデルマ・リーセイ由来エンドグルカナーゼ II (T r E G II) 遺伝子のコーディング領域、サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来 S E D 1 遺伝子のコーディング領域 (S E D 1 アンカーリング領域)、及びサッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来 D I T 1 遺伝子のターミネーター領域がこの順に配置されているカセットを有する表層発現用ベクター : Applied Microbiology and Biotechnology, Vol.105, 2021, 5895-5904) を鋳型とし、プライマー対 S E D 1 a - F (配列番号 1 4) 及び S E D 1 s s - R (配列番号 1 5) を用いて P C R 法により増幅し、T r E G II 遺伝子のコーディング領域を除いたベクタープラスミド全長を含む DNA 断片を調製した。これらの断片を I n - F u s i o n 法により連結した。次に、このプラスミドを鋳型とし、プライマー対 S E D 1 p - F (配列番号 2 1) 及び D I T 1 t - R (配列番号 1 9) を用いて P C R 法により増幅し、サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来 S E D 1 プロモーター、サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来 S E D 1 の分泌シグナルペプチド配列、クロストリジウム・ステルコラリウム (Clostridium stercorarium) 由来セロビオースホスホリラーゼ (C s C B P) のコーディング領域、サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来 S E D 1 遺伝子のコーディング領域 (S E D 1 ア

ンカーリング領域)、及びサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来DIT1 遺伝子のターミネーター領域を含むDNA断片を調製した。また、ベクタープラスミドpIU5-CBH_D (サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来SED1プロモーター、タラロマイセス・エメルソニ (*Talaromyces emersonii*) 由来セロビオヒドロラーゼ (TsCBH1) 遺伝子のコーディング領域、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来SED1 遺伝子のコーディング領域 (SED1 アンカーリング領域)、及びサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来 α -アグルチニン遺伝子のターミネーター領域がこの順に配置されているカセットを有する表層発現用ベクター: Biotechnology and Bioengineering, Vol.114, 2017, 1201-1207) を鋳型とし、プライマー対pRS403-F (配列番号20) 及びpRS403-R (配列番号22) を用いてPCR法により増幅し、発現カセット領域を除いたベクタープラスミド全長を含むDNA断片を調製した。これらの断片をIn-Fusion法により連結した。得られた発現カセットX3 (SED1プロモーター (配列番号1) + SED1 分泌シグナル (配列番号2) + CsCBP (配列番号6) + SED1 アンカーリング領域 (配列番号3) + DIT1ターミネーター (配列番号4)) を含むプラスミドをpIU5-CsCBP-SSSDと命名した。

[0042] (調製例1-4: セルロモナス・ウダ (*Cellulomonas uda*) 由来セロビオースホスホリラーゼ (CuCBP) 表層発現カセットX4を含有するベクタープラスミドの調製)

セルロモナス・ウダ (*Cellulomonas uda*) 由来セロビオースホスホリラーゼ (CuCBP) 遺伝子のコーディング領域を含むDNA断片を遺伝子合成により調製した。次に、ベクタープラスミドpIU5-CsCBP-SSSDを鋳型とし、プライマー対プライマー対SED1a-F (配列番号14) 及びSED1ss-R (配列番号15) を用いてPCR法により増幅し、CsCBP 遺伝子のコーディング領域を除いたベクタープラスミド全長を含む

DNA断片を調製した。これらの断片をIn-Fusion法により連結した。得られた発現カセットX4 (SED1プロモーター (配列番号1) + SED1分泌シグナル (配列番号2) + CuCBP (配列番号7) + SED1アンカーリング領域 (配列番号3) + DIT1ターミネーター (配列番号4)) を含むプラスミドをpIU5-CuCBP-SSSDと命名した。

[0043] (調製例1-5: サーマシフォ・アフリカヌス (Thermosipho africanus) 由来セロビオースホスホリラーゼ (TaCBP) 表層発現カセットX5を含有するベクタープラスミドの調製)

サーマシフォ・アフリカヌス (Thermosipho africanus) 由来セロビオースホスホリラーゼ (TaCBP) 遺伝子のコーディング領域を含むDNA断片を遺伝子合成により調製した。次に、ベクタープラスミドpIU5-CsCBP-SSSDを鋳型とし、プライマー対SED1a-F (配列番号14) 及びSED1ss-R (配列番号15) を用いてPCR法により増幅し、CsCBP遺伝子のコーディング領域を除いたベクタープラスミド全長を含むDNA断片を調製した。これらの断片をIn-Fusion法により連結した。得られた発現カセットX5 (SED1プロモーター (配列番号1) + SED1分泌シグナル (配列番号2) + TaCBP (配列番号8) + SED1アンカーリング領域 (配列番号3) + DIT1ターミネーター (配列番号4)) を含むプラスミドをpIU5-TaCBP-SSSDと命名した。

[0044] (調製例1-6: サーマトガ・ネアポリタナ (Thermotoga neapolitana) 由来セロビオースホスホリラーゼ (TnCBP) 表層発現カセットX6を含有するベクタープラスミドの調製)

サーマトガ・ネアポリタナ (Thermotoga neapolitana) 由来セロビオースホスホリラーゼ (TnCBP) 遺伝子のコーディング領域を含むDNA断片を遺伝子合成により調製した。次に、ベクタープラスミドpIU5-CsCBP-SSSDを鋳型とし、プライマー対SED1a-F (配列番号14) 及びSED1ss-R (配列番号15) を用いてPCR法により増幅し、CsCBP遺伝子のコーディング領域を除いたベクタープラスミド全長を含む

DNA断片を調製した。これらの断片をIn-Fusion法により連結した。得られた発現カセットX6 (SED1プロモーター (配列番号1) + SED1分泌シグナル (配列番号2) + TnCBP (配列番号9) + SED1アンカーリング領域 (配列番号3) + DIT1ターミネーター (配列番号4)) を含むプラスミドをpIU5-TnCBP-SSSDと命名した。

[0045] (調製例1-7: ビフィドバクテリウム・ロングム (Bifidobacterium longum) 由来スクロースホスホリラーゼ (BISP) 表層発現カセットX7を含有するベクタープラスミドの調製)

プラスミドpIBISP-SSSDを鋳型とし、プライマー対BISP-NheI-F (配列番号23) 及びBISP-XhoI-R (配列番号24) を用いてPCR法により増幅し、さらにNheI及びXhoIで処理することで、BISP遺伝子のコーディング領域を含むDNA断片を調製した。また、ベクタープラスミドpIBG-PpSSG61 (ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来SP11プロモーター、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来SP11の分泌シグナルペプチド配列、アスペルギルス・アクレアタス由来β-グルコシダーゼ1 (AaBGL1) 遺伝子のコーディング領域、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来GCW61遺伝子のコーディング領域 (GCW61アンカーリング領域)、及びピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来AOX1遺伝子のターミネーター領域がこの順に配置されている発現カセットを有する表層発現用ベクター: Biotechnology and Bioengineering, Vol.120, 2023, 1097-1107) をNheI及びXhoIで処理し、AaBGL1遺伝子のコーディング領域を除いたベクタープラスミド全長を含むDNA断片を調製した。これらの断片をライゲーション法により連結した。次に、このプラスミドを鋳型とし、XhoI及びMluIで処理し、GCW61アンカーリング領域を除いたベクタープラスミド全長を含むDNA断片を調製した。さらに、プラスミドpIBG-PpGMG30 (ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来GAPDHプロモーター、サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来α-ファク

ターの分泌シグナルペプチド配列、アスペルギルス・アクレアタス由来β-グルコシダーゼ1 (A a B G L 1) 遺伝子のコーディング領域、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来GCW30遺伝子のコーディング領域 (GCW30アンカーリング領域)、及びピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来A O X 1 遺伝子のターミネーター領域がこの順に配置されている発現カセットを有する表層発現用ベクター: Biotechnology and Bioengineering, Vol.120, 2023, 1097-1107) をX h o l 及びM l u I で処理し、GCW30アンカーリング領域を含むDNA断片を調製した。これらの断片をライゲーション法により連結した。得られた発現カセットX7 (S P I 1プロモーター (配列番号10) + S P I 1分泌シグナル (配列番号11) + B I S P (配列番号5) + GCW30アンカーリング領域 (配列番号12) + A O X 1ターミネーター (配列番号13)) を含むプラスミドをp I B I S P - P p S S G 3 0と命名した。

[0046] (調製例1-8: ビフィドバクテリウム・ロングム (Bifidobacterium longum) 由来スクロースホスホリラーゼ (B I S P) 分泌発現カセットX8を含有するベクタープラスミドの調製)

プラスミドp I B I S P - P p S S G 3 0を鋳型とし、プライマー対B I S P - F 2 (配列番号25) 及びB I S P - R 2 (配列番号26) を用いてPCR法により増幅し、B I S P 遺伝子のコーディング領域を含むDNA断片を調製した。また、ベクタープラスミドp I H - E G - S S G 3 4 (ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来S P I 1プロモーター、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来S P I 1の分泌シグナルペプチド配列、トリコデルマ・リーセイ由来エンドグルカナーゼII (T r E G II) 遺伝子のコーディング領域、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来GCW34遺伝子のコーディング領域 (GCW34アンカーリング領域)、及びピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来A O X 1 遺伝子のターミネーター領域がこの順に配置されている発現カセットを有する表層発現用ベクター: Biotechnology and Bioengineering, Vol.120, 2023, 1097-1107) を鋳型とし、プラ

イマー対A O X 1 t - F (配列番号27) 及びS P I 1 s s - R (配列番号28) を用いてP C R法により増幅し、T r E G I I 遺伝子のコーディング領域及びG C W 3 4 アンカーリング領域を除いたベクタープラスミド全長を含むD N A断片を調製した。これらの断片をI n - F u s i o n法により連結した。得られた発現カセットX 8 (S P I 1 プロモーター (配列番号10) + S P I 1 分泌シグナル (配列番号11) + B I S P (配列番号5) + A O X 1 ターミネーター (配列番号13)) を含むプラスミドをp I H - B I S P - P p S S と命名した。

[0047] (調製例1-9: クロストリジウム・ステルコラリウム (*Clostridium sterco*
rarium) 由来セロビオースホスホリラーゼ (C s C B P) 表層発現カセット
X 9 を含有するベクタープラスミドの調製)

プラスミドp I U 5 - C s C B P - S S S D を鋳型とし、プライマー対C s C B P - N h e l - F (配列番号29) 及びC s C B P - X h o l - R (配列番号30) を用いてP C R法により増幅し、さらにN h e l 及びX h o l で処理することで、C s C B P 遺伝子のコーディング領域を含むD N A断片を調製した。また、ベクタープラスミドp I B I S P - P p S S G 3 0 をN h e l 及びX h o l で処理することで、B I S P 遺伝子のコーディング領域を除いたベクタープラスミド全長を含むD N A断片を調製した。これらの断片をライゲーション法により連結した。次に、このプラスミドを鋳型とし、プライマー対C s C B P - F (配列番号31) 及びA O X 1 t - R (配列番号32) を用いてP C R法により増幅し、C s C B P 遺伝子のコーディング領域、G C W 3 0 アンカーリング領域、及びA O X 1 ターミネーター領域を含むD N A断片を調製した。また、ベクタープラスミドp I Z - C B H 1 - P p S S G 3 4 (ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 由来S P I 1、タラロマイセス・エメルソニ (*Talaromyces emersonii*) 由来セロビオヒドロラーゼ (T s C B H 1) 遺伝子のコーディング領域、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 由来G C W 3 4 遺伝子のコーディング領域 (G C W 3 4 アンカーリング領域)、及びピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 由来A O X

1 遺伝子のターミネーター領域がこの順に配置されている発現カセットを有する表層発現用ベクター：Biotechnology and Bioengineering, Vol.120, 2023, 1097-1107) を鋳型とし、プライマー対 AOX1 t-F2 (配列番号33) 及び SP11 s-R (配列番号28) を用いてPCR法により増幅し、TsCBH1 遺伝子のコーディング領域、GCW34 アンカーリング領域、及び AOX1 ターミネーター領域を除いたベクタープラスミド全長を含むDNA断片を調製した。これらの断片を In-Fusion法により連結した。得られた発現カセットX9 (SP11 プロモーター (配列番号10) + SP11 分泌シグナル (配列番号11) + CsCBP (配列番号6) + GCW30 アンカーリング領域 (配列番号12) + AOX1 ターミネーター (配列番号13)) を含むプラスミドを pIZ-CsCBP-PpSSG30 と命名した。

[0048] ・形質転換酵母の作製

(調製例2-1：スクロースホスホリラーゼ表層提示酵母の製造)

調製例1-1に記載のプラスミド pIBISP-SSSD を NdeI で処理し、酵母サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741 ΔSUC2 株に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。この形質転換株を ΔSUC2-BISP 株と称する。同様に、調製例1-7に記載のプラスミド pIBISP-PpSSG30 を EcoRV で処理し、酵母ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) CBS7435 株に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。この形質転換株を Pp-BISP 株と称する。

[0049] また、調製例1-2に記載のプラスミド pIL2-BISP-SSSD を NdeI で処理し、ΔSUC2-BISP 株に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。この形質転換株を ΔSUC2-BISP2 株と称する。同様に、調製例1-8に記載のプラスミド pIH-BISP-PpSS を BsrGI で処理し、Pp-BISP 株に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。この形質転換株を Pp-BISP2 株と称する。

[0050] (調製例2-2：セロビオースホスホリラーゼ表層提示酵母の製造)

調製例 1-3~1-6 に記載のプラスミド pIU5-CsCBP-SSSD、pIU5-CuCBP-SSSD、pIU5-TaCBP-SSSD、又は pIU5-TnCBP-SSSD を SpeI で処理し、酵母サッカロマイセス・セレビスシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741 ΔSUC2 株に供し、酢酸リチウム法によりそれぞれ形質転換した。これらの形質転換株をそれぞれ ΔSUC2-CsCBP 株、ΔSUC2-CuCBP 株、ΔSUC2-TaCBP 株、及び ΔSUC2-TnCBP 株と称する。

[0051] (調製例 2-3 : スクロースホスホリラーゼ+セロビオースホスホリラーゼ 表層提示酵母の製造)

調製例 1-3 に記載のプラスミド pIU5-CsCBP-SSSD を SpeI で処理し、ΔSUC2-BISP2 株に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。この形質転換株を ΔSUC2-SP2CBP 株と称する。同様に、調製例 1-9 に記載のプラスミド pIZ-CsCBP-PpSSG30 を NsiI で処理し、Pp-BISP2 株に供し、エレクトロポレーション法により形質転換した。この形質転換株を Pp-SP2CBP 株と称する。

[0052] B. 形質転換酵母の前処理

A で形質転換した酵母 (菌株) のうち、サッカロマイセス・セレビスシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) を宿主とする ΔSUC2-BISP 株、ΔSUC2-BISP2 株、ΔSUC2-CsCBP 株、ΔSUC2-CuCBP 株、ΔSUC2-TaCBP 株、ΔSUC2-TnCBP 株、及び ΔSUC2-SP2CBP 株について、5 mL の YPD 培地 (乾燥酵母エキス (ナカライテスク) 1%、Bacto™ Peptone (Life Technologies) 2%、D-グルコース (ナカライテスク) 2%) に移植し、30℃、200 rpm にて 18 時間前培養したのち、50 mL の YPD 培地に OD600 が 0.05 となるように植菌し、30℃、150 rpm にて 48 時間振とう培養した。また、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) を宿主とする Pp-BISP 株、Pp-BISP2 株、及び Pp-SP2CBP 株について、5 mL の YPG 培地 (乾燥酵母エキス (ナカライテスク) 1%、Bacto™ Pe

p t o n e (Life Technologies) 2%、グリセロール (ナカライテスク) 2%) に移植し、30℃、200 rpmにて18時間前培養したのち、50 mLのYPG培地にOD600が0.05となるように植菌し、30℃、150 rpmにて48時間振とう培養した。これらの培養液を遠心分離して菌体を沈降させ、純水で2回洗浄し、できる限り上澄みを除いて固体の湿潤状態の菌体 (wet cell) の重量を測定し、これと同量の純水を加え菌体懸濁液を得た (約500 g 湿潤細胞/L)。菌体懸濁液は60℃で90分間保持し、前処理菌体とした。

[0053] C. 酵母細胞表層のスクロースホスホリラーゼ活性測定

反応液5 mL (組成: 10 g/Lスクロース (ナカライテスク); 80 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0); 及び調製例2-1で調製したPp-BISP株またはPp-BISP2株の前処理菌体 (最終菌体濃度100 g 湿潤細胞/L)) を調製し、35 rpm、60℃にて60分間反応させた。反応を停止させるために、反応液を100℃、10分間保持し、その後10分間氷冷した後に遠心して菌体などを沈殿させ、上清を集めてフルクトース濃度の分析に用いた。1分間で1 μmolのフルクトースを遊離する酵素量を1 IUとする。

[0054] D. スクロースホスホリラーゼ表層提示酵母とセロビオースホスホリラーゼ表層提示酵母を併用したスクロースからのセロビオース生産

反応液5 mL (組成: 100 g/Lスクロース (ナカライテスク); 80 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0); 1重量%硫酸マグネシウム; 1.5 IU/mLグルコースイソメラーゼ (キシロースイソメラーゼ、合同酒精(株)製、ストレプトマイセス・グリセオフスクス (*Streptomyces griseofuscus*) 由来); 調製例2-1で調製したΔSUC2-BISP2株の前処理菌体 (最終菌体濃度50 g 湿潤細胞/L); 及び調製例2-2で調製したΔSUC2-CsCBP株、ΔSUC2-CuCBP株、ΔSUC2-TaCBP株、またはΔSUC2-TnCBP株の前処理菌体 (最終菌体濃度50 g 湿潤細胞/L)) を調製し、35 rpm、60℃にて24時間反応させ

た。サンプリングは4時間及び24時間の2回行った。反応を停止させるために、サンプリング液はサンプリング容器にとって100℃、10分間保持し、その後10分間氷冷した後に遠心して菌体などを沈殿させ、上清を集めて分析に用いた。

[0055] E. スクロースホスホリラーゼ+セロビオースホスホリラーゼ表層提示酵母を用いたスクロースからのセロビオース生産

反応液5 mL（組成：100 g/Lスクロース（ナカライテスク）；80 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）；1重量%硫酸マグネシウム；1.5 IU/mLグルコースイソメラーゼ（キシロースイソメラーゼ、合同酒精(株)製、ストレプトマイセス・グリセオフスクス（*Streptomyces griseofuscus*）由来）；及び調製例2-3で調製した Δ SUC2-SP2CBP株またはPp-BISP2株の前処理菌体（最終菌体濃度100 g湿潤細胞/L））を調製し、35 rpm、60℃にて24時間反応させた。サンプリングは4時間、8時間、及び24時間の3回行った。反応を停止させるために、サンプリング液はサンプリング容器にとって100℃、10分間保持し、その後10分間氷冷した後に遠心して菌体などを沈殿させ、上清を集めて分析に用いた。

[0056] F. 分析

C、D、及びEの上清の分析にはHPLCを用いた。分析条件は下記とした。

・装置：ポンプユニット（Shimadzu LC-20AB）、オートサンプラー（Shimadzu SIL-20AC）、カラムオープン（Shimadzu CTO-20AC）

・使用カラム：Sugar-D（COSMOSIL、Code：05397-51、ID4.6×250mm）

・ガードカラム：Sugar-D guard column（COSMOSIL、Code：05397-81）

・移動相：アセトニトリル/水=70/30、流量1.0 mL/分

- ・ カラムオーブン温度：30℃
- ・ 検出器：示差屈折率検出器（RID）（Shimadzu RID-10A）
- ・ 分析時間：15分
- ・ 検量線：糖混合液（スクロース、グルコース、フルクトース、及びセロビオース）を使用し、1、5、10g/Lの3点で校正した。

[0057] G. 結果

Cのスクロースホスホリラーゼ活性測定の結果を図1に示す。スクロースホスホリラーゼを細胞壁に係留された状態で発現させるための発現カセットX1のみを導入された Δ SUC2-BISP株と比較して、発現カセットX1に加えてスクロースホスホリラーゼを分泌発現させるための発現カセットX2を導入された Δ SUC2-BISP2株は、著しく高いスクロースホスホリラーゼ活性を示すことが分かった。このことにより、スクロースホスホリラーゼについては、係留型と分泌型を併用することが好ましいことがわかった。

[0058] Dのスクロースホスホリラーゼ表層提示酵母とセロビオースホスホリラーゼ表層提示酵母を併用したスクロースからのセロビオース生産実験の反応液上清中のスクロース、グルコース、フルクトース、及びセロビオース濃度の経時変化を図2に示す。セロビオースホスホリラーゼ表層提示酵母として Δ SUC-C_sCBP株を用いた場合には、スクロースのセロビオースへの転換率は反応開始から24時間で約30%であった（図2（a））。一方で、セロビオースホスホリラーゼ表層提示酵母として Δ SUC-C_uCBP株（図2（b））、 Δ SUC-T_aCBP株（図2（c））又は Δ SUC-T_nCBP株（図2（d））を用いた場合には、転換率は反応開始から24時間でも10%以下であった。この結果により、CBP遺伝子としてはクロストリジウム・ステルコラリウム（*Clostridium stercorarium*）由来のものが好ましいことがわかった。

[0059] Eのサッカロマイセス・セレビスエ（*Saccharomyces cerevisiae*）を宿主

としたスクロースホスホリラーゼ+セロビオースホスホリラーゼ表層提示酵母 (Δ SUC2-SP2CBP株) を用いたスクロースからのセロビオース生産実験の反応液上清中のスクロース、グルコース、フルクトース、及びセロビオース濃度の経時変化を図3に示す。図3(a)のグラフはサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) を宿主とする Δ SUC2-SP2CBP株を用いた場合の結果を示し、図3(b)のグラフはピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) を宿主とするPp-SP2CBP株を用いた場合の結果を示す。サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) を宿主としてスクロースホスホリラーゼのみを発現する組換え酵母株とセロビオースホスホリラーゼのみを発現する組換え酵母株を併用した図2(a)の実験結果と比較して、同じサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) を宿主としてスクロースホスホリラーゼとセロビオースホスホリラーゼを共発現する単一の組換え酵母株を用いた図3(a)では、反応に使用した酵母菌体の総量は同じであるにも関わらず、スクロースがセロビオースにより高い転換率(約70%)で転換されていることがわかる。このことにより、スクロースホスホリラーゼとセロビオースホスホリラーゼについては単一の組換え酵母株に共発現させることが好ましいことがわかった。また、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) を宿主としてスクロースホスホリラーゼとセロビオースホスホリラーゼを共発現する単一の組換え酵母株を用いた図3(b)では、スクロースのセロビオースへの転換率は約80%にまで向上した。

[0060] Eのピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) を宿主としたスクロースホスホリラーゼ+セロビオースホスホリラーゼ表層提示酵母 (Pp-SP2CBP株) を用いたスクロースからのセロビオース生産実験の反応液上清中のスクロース、グルコース、フルクトース、及びセロビオース濃度の経時変化を図4に示す。図4(a)のグラフはグルコースを炭素源として培養したPp-SP2CBP株を用いた場合の結果を示し、図4(b)のグラフはグリセロールを炭素源として培養したPp-SP2CBP株を用いた場合の結果を

示す。Pp-SP2CBP株のスクロースのセロビオースへの転換率は、グルコースを炭素源として培養した場合には約40%であったが、グリセロールを炭素源として培養した場合には、約80%にまで向上した。このことにより、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) を宿主としたスクロースホスホリラーゼ+セロビオースホスホリラーゼ表層提示酵母を培養する際には、グリセロールを炭素源に用いることが好ましいことがわかった。

[0061] 〔実施例群II：形質転換酵母（スクロースホスホリラーゼ+セロビオース表層提示酵母）を再利用した繰り返しセロビオース生産〕

A. 形質転換酵母の作製

実施例群IのAで形質転換した酵母（菌株）のうち、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) を宿主とする Δ SUC2-SP2CBP株、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) を宿主とするPp-SP2CBP株を用いた。

[0062] B. 形質転換酵母の前処理

Aで用意した Δ SUC2-SP2CBP株について、5mLのYPD培地（乾燥酵母エキス（ナカライテスク）1%、Bacto™ Peptone（Life Technologies）2%、D-グルコース（ナカライテスク）2%）に移植し、30℃、200rpmにて18時間前培養したのち、50mLのYPD培地にOD600が0.05となるように植菌し、30℃、150rpmにて48時間振とう培養した。また、Pp-SP2CBP株について、5mLのYPG培地（乾燥酵母エキス（ナカライテスク）1%、Bacto™ Peptone（Life Technologies）2%、グリセロール（ナカライテスク）2%）に移植し、30℃、200rpmにて24時間前培養したのち、50mLのYPG培地に、OD600が0.05となるように植菌し、30℃、150rpmにて48時間振とう培養した。これらの培養液を遠心分離して菌体を沈降させ、純水で2回洗浄し、できる限り上澄みを除いて固体の湿潤状態の菌体（wet cell）の重量を測定し、これと同量の純水を加え菌体懸濁液を得た（約500g湿潤細胞/L）。菌体懸濁液は60℃で90分間保持し

、前処理菌体とした。

[0063] C. 形質転換酵母を再利用した繰り返しセロビオース生産

反応液 5 mL (組成: 100 g/L スクロース (ナカライテスク); 80 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0); 1 重量% 硫酸マグネシウム; 1.5 IU/mL グルコースイソメラーゼ (キシロースイソメラーゼ、合同酒精 (株) 製、ストレプトマイセス・グリセオフスクス (*Streptomyces griseofuscus*) 由来); 及び G-1 で調製した Δ SUC2-SP2CBP 株または Pp-SP2CBP 株の前処理菌体 (最終菌体濃度 100 g 湿潤細胞/L)) を調製し、35 rpm、60°C にて 24 時間反応させた (1 回目)。反応させた液の遠心分離で酵母細胞を回収し、新しい反応液に再懸濁し、35 rpm、60°C にて 24 時間反応させた (2 回目)。同様に 3 回目の反応を行った。サンプリングは、各回の反応において 4 時間、8 時間、及び 24 時間の 3 回行った。反応を停止させるために、各サンプリング液はサンプリング容器にとって 100°C、10 分間保持し、その後 10 分間氷冷した後に遠心して菌体などを沈殿させ、上清を集めて分析に用いた。

[0064] D. 分析

上記 D で得られた上清につき、実施例群 I の F に記載の方法で分析した。

[0065] E. 結果

上記 D で得られた上清中のスクロース、グルコース、フルクトース、及びセロビオース濃度の経時変化を、図 5 (a) (Δ SUC2-SP2CBP 株) 及び図 5 (b) (Pp-SP2CBP 株) に示す。この結果により、本発明の、スクロースホスホリラーゼ及びセロビオースホスホリラーゼを発現する組換え酵母とグルコースイソメラーゼとを含有する反応液中にスクロースを共存させる工程を含む、セロビオースの製造方法は、当該工程を繰り返しても高いセロビオースへの転換率が維持されることがわかった。また、グリセロールを炭素源として培養したピキア・パストリスを宿主としたスクロースホスホリラーゼ+セロビオースホスホリラーゼ表層提示酵母を形質転換酵母として用いた場合には、Pp-SP2CBP 株の酵母は、60°C、24 時

間の反応を3回繰り返しても、約80%の高いセロビオース転換率が維持されることが確認された。

産業上の利用可能性

[0066] 本発明の製造方法は、食品又は医薬品製剤に使用するセロビオースの製造方法として利用することができる。

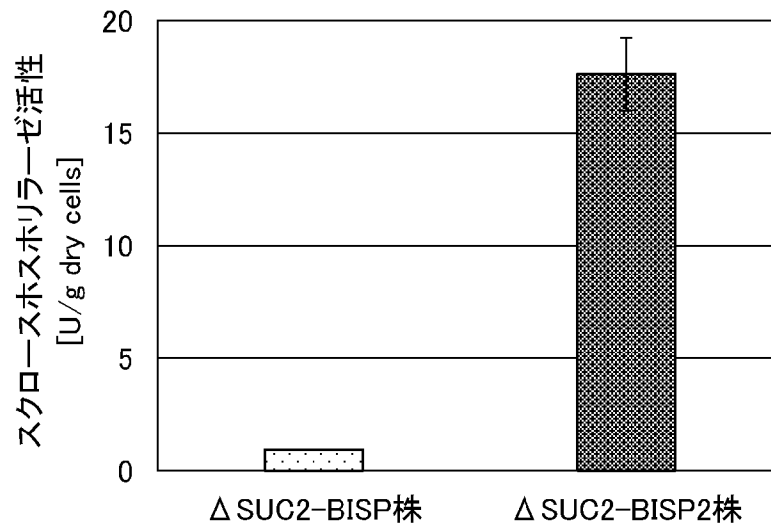
請求の範囲

- [請求項1] スクロースホスホリラーゼ及びセロピオースホスホリラーゼを発現する組換え酵母とグルコースイソメラーゼとを含有する反応液中にスクロースを共存させる反応工程を含む、セロピオースの製造方法。
- [請求項2] 組換え酵母が、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、又はヤロウヰア (*Yarrowia*) 属の酵母である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] スクロースホスホリラーゼが、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属、ロイコノストック (*Leuconostoc*) 属、又はストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属の細菌に由来する、請求項1又は2に記載の製造方法。
- [請求項4] スクロースホスホリラーゼが、組換え酵母から分泌発現される分泌型スクロースホスホリラーゼと、組換え酵母の細胞壁に係留された状態で発現される係留型スクロースホスホリラーゼとを含む、請求項1～3の何れか一項に記載の製造方法。
- [請求項5] セロピオースホスホリラーゼが、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、ルミノコッカス (*Ruminococcus*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、又はサーモトガ (*Thermotoga*) 属の細菌に由来する、請求項1～4の何れか一項に記載の製造方法。
- [請求項6] 前記組換え酵母が、スクロースホスホリラーゼ及びセロピオースホスホリラーゼを単一の菌体で共に発現する組換え酵母である、請求項1～5の何れか一項に記載の製造方法。
- [請求項7] 前記組換え酵母が、スクロースホスホリラーゼを発現する組換え酵母と、セロピオースホスホリラーゼを発現する組換え酵母との組み合わせである、請求項1～6の何れか一項に記載の製造方法。
- [請求項8] 前記組換え酵母が、スクロースホスホリラーゼ遺伝子を担持する発現ベクターにより形質転換された酵母である、請求項1～7の何れか一項に記載の製造方法。

- [請求項9] 前記発現ベクターが、スクロースホスホリラーゼ遺伝子及び酵母の細胞壁ドメイン遺伝子を共に担持する第1の発現ベクターと、酵母の細胞壁ドメイン遺伝子を担持せずスクロースホスホリラーゼ遺伝子のみを担持する第2の発現ベクターとの組み合わせを含む、請求項8に記載の製造方法。
- [請求項10] グルコースイソメラーゼが、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属の細菌に由来する、請求項1～9の何れか一項に記載の製造方法。
- [請求項11] 反応液中にスクロースを共存させる前に、組換え酵母を45℃～75℃で15分～150分処理する工程を更に含む、請求項1～10の何れか一項に記載の製造方法。
- [請求項12] 前記反応工程の前に、炭素源としてグリセロールを用いて酵母細胞を培養する工程を含む、請求項1～11の何れか一項に記載の製造方法。
- [請求項13] 前記反応工程の後に、製造されたセロビオースを反応液から分離する工程をさらに含む、請求項1～12の何れか一項に記載の製造方法。
- [請求項14] 前記反応工程の後に、前記組換え酵母を反応液から回収し、再度の反応工程に供することをさらに含む、請求項1～13の何れか一項に記載の製造方法。

[図1]

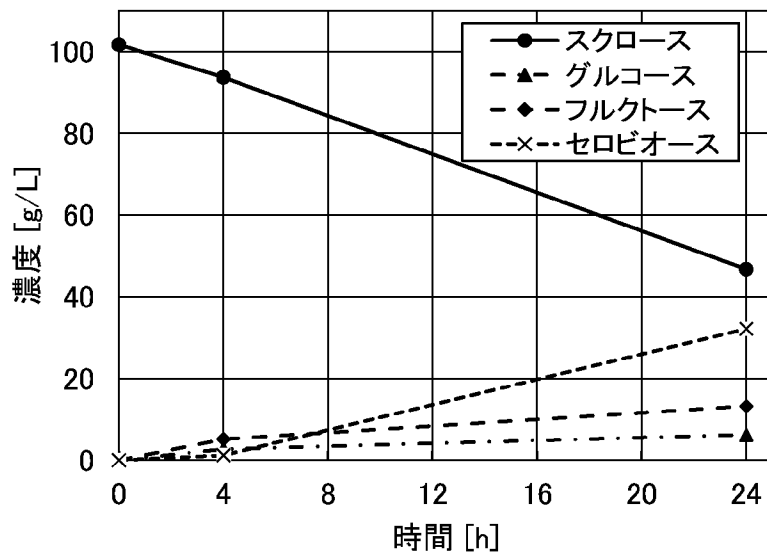
図1



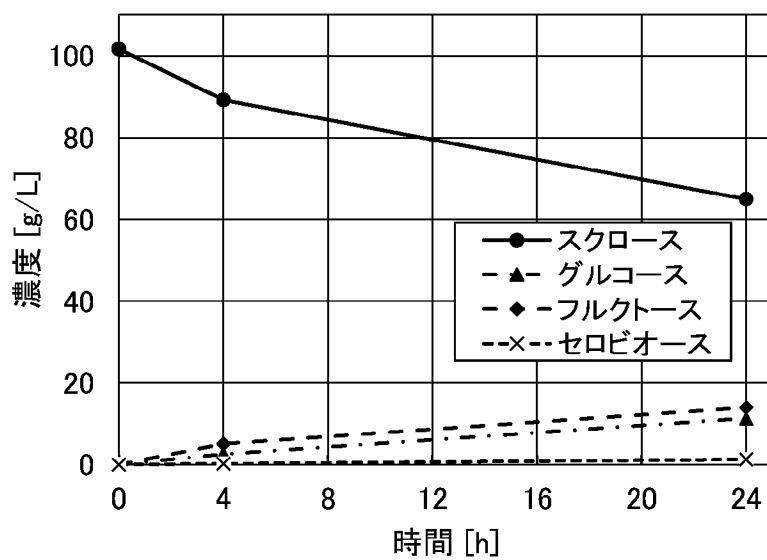
[図2-1]

図2-1

(a)



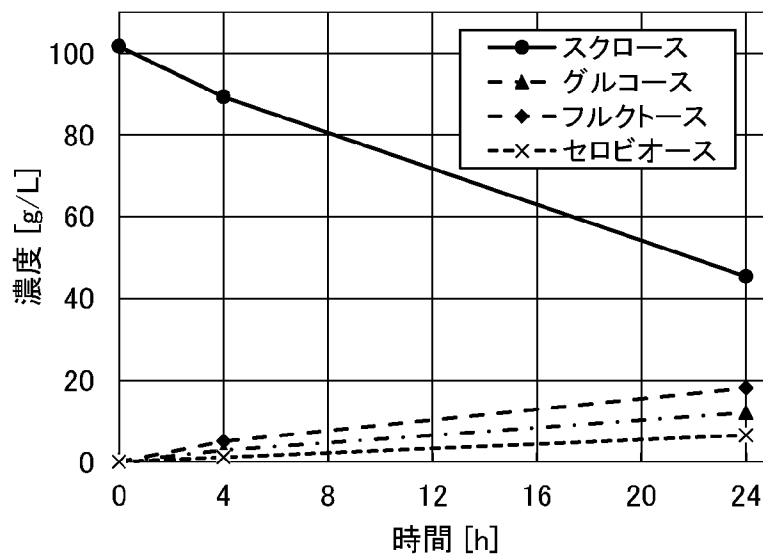
(b)



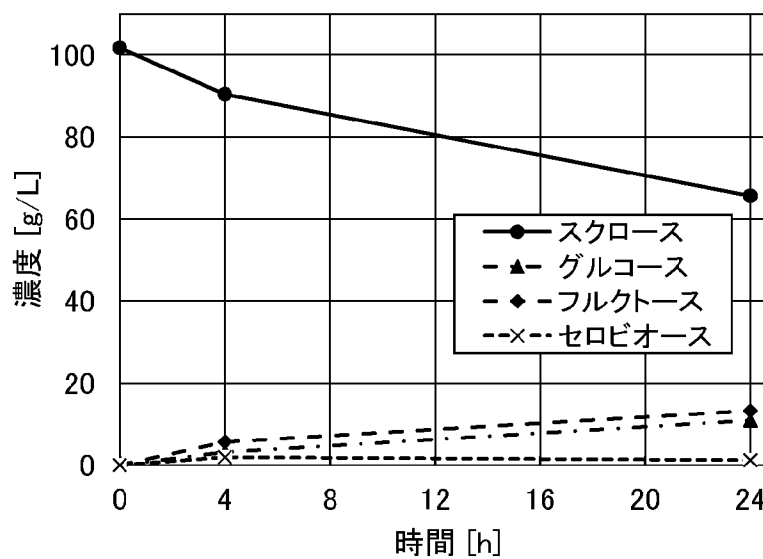
[図2-2]

図2-2

(c)



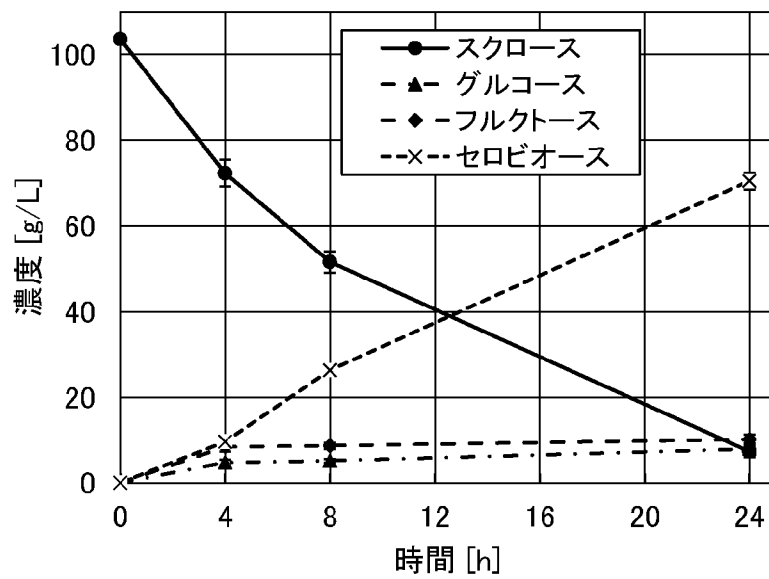
(d)



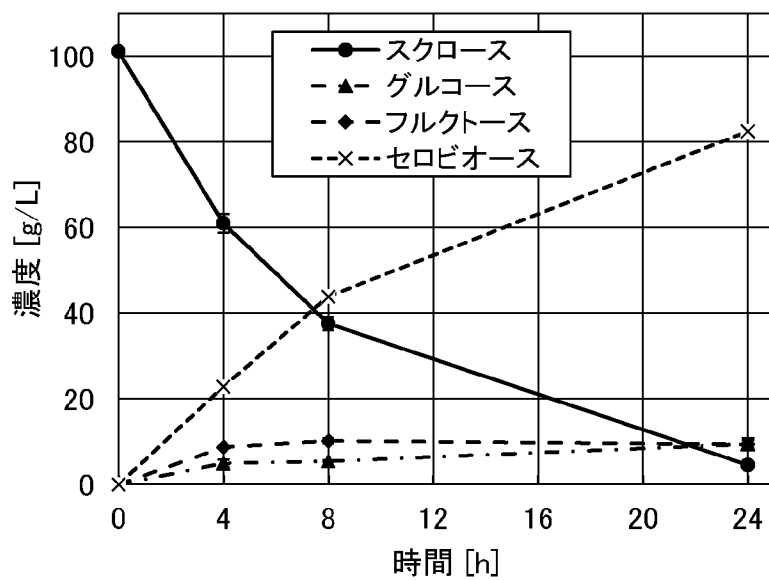
[図3]

図3

(a)



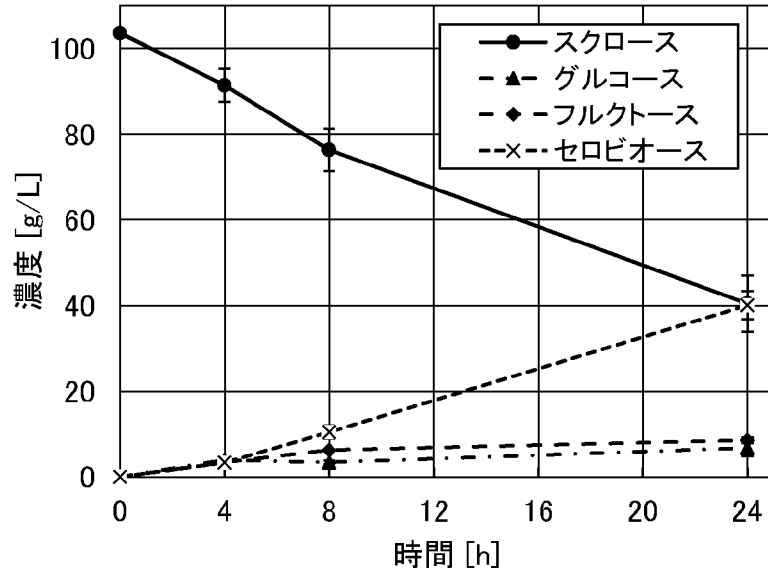
(b)



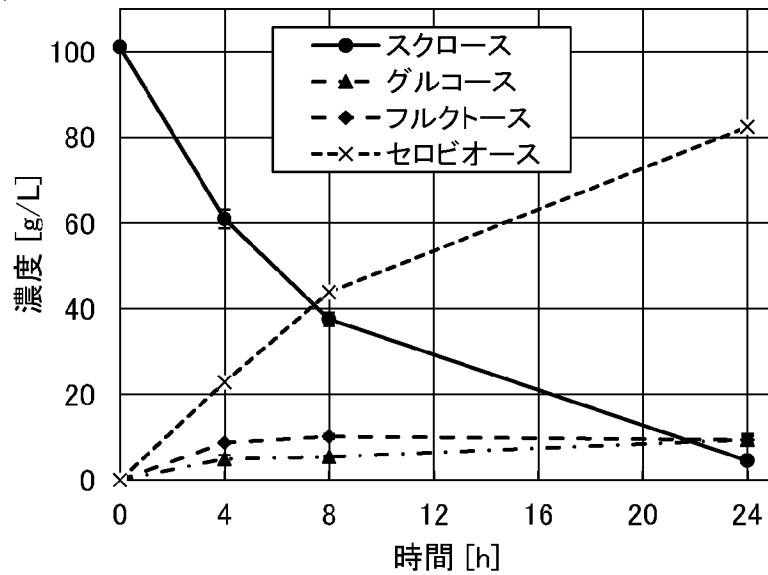
[図4]

図4

(a)

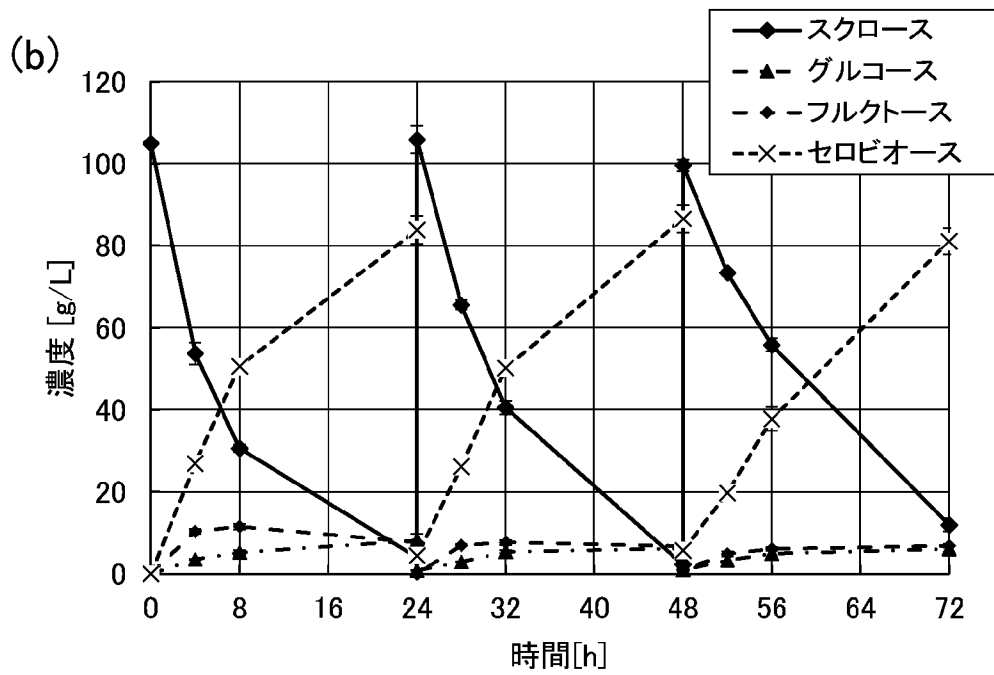
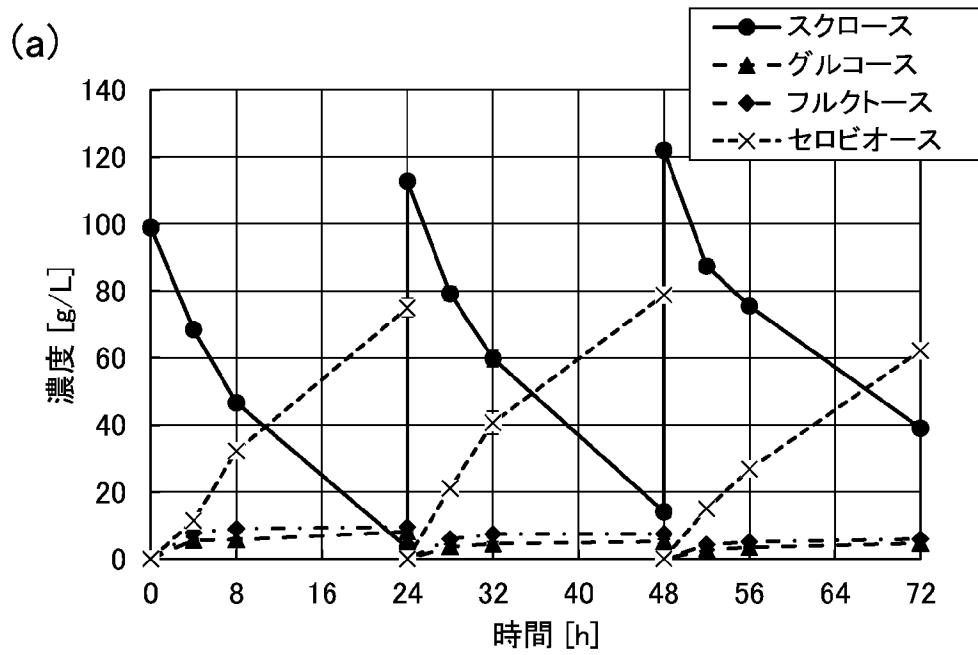


(b)



[図5]

図5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/018152

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 15/54</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/19</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/92</i> (2006.01)i; <i>C12P 19/12</i> (2006.01)i FI: C12N15/54 ZNA; C12N9/92; C12P19/12; C12N1/19		
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) C12N15/54; C12N1/19; C12N9/92; C12P19/12		
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 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 3-130086 A (NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE) 03 June 1991 (1991-06-03) claims, examples	1-14
A	KITAOKA, Motomitsu et al. Conversion of Sucrose into Cellobiose Using Sucrose Phosphorylase, Xylose Isomerase and Cellobiose Phosphorylase. Denpun Kagaku. 1992, vol. 39, no. 4, pp. 281-283 abstract, p. 281	1-14
A	ZHONG, Chao et al. A kinetic model of one-pot rapid biotransformation of cellobiose from sucrose catalyzed by three thermophilic enzymes. Chemical Engineering Science. 2017, vol. 161, pp. 159-166 abstract	1-14
A	北岡本光, スクロースからセロビオースを生産する, 化学と生物, 2002, vol. 40, no. 8, pp. 498-500, (KITAOKA, Motomitsu. KAGAKU TO SEIBUTSU.), non-official translation (Producing cellobiose from sucrose) fig. 1	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 June 2024		Date of mailing of the international search report 18 June 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HOU, Ching T. et al. BIOCATALYSIS AND BIOTECHNOLOGY FOR FUNCTIONAL FOODS AND INDUSTRIAL PRODUCTS. CRC Press. 2007, ISBN 0-8493-9282-9 pp. 326-328	1-14
A	CN 108611386 A (TIANJIN INST IND BIOTECHNOLOGY CAS) 02 October 2018 (2018-10-02) example 1	1-14
A	KULLIN, B. et al. A functional analysis of the Bifidobacterium longum cscA and scrP genes in sucrose utilization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006, vol. 72, pp. 975-981 abstract	1-14
A	JP 2004-222506 A (NIKKEN KASEI KK) 12 August 2004 (2004-08-12) claims	1-14
A	JP 01-137979 A (NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE) 30 May 1989 (1989-05-30) example 1	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/018152

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2024/018152

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 3-130086 A	03 June 1991	US 5077205 A claims, examples EP 423768 A1	
-----	-----	-----	-----
CN 108611386 A	02 October 2018	(Family: none)	
-----	-----	-----	-----
JP 2004-222506 A	12 August 2004	(Family: none)	
-----	-----	-----	-----
JP 01-137979 A	30 May 1989	SE 8800331 A example 1	
-----	-----	-----	-----

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/54(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 9/92(2006.01)i; C12P 19/12(2006.01)i FI: C12N15/54 ZNA; C12N9/92; C12P19/12; C12N1/19		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/54; C12N1/19; C12N9/92; C12P19/12 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 3-130086 A（農林水産省食品総合研究所長）03.06.1991（1991 - 06 - 03） 特許請求の範囲、実施例	1-14
A	KITAOKA Motomitsu, et al., Conversion of Sucrose into Cellobiose Using Sucrose Phosphorylase, Xylose Isomerase and Cellobiose Phosphorylase, Denpun Kagaku, 1992, Vol.39, No.4, pp.281-283 要約, p.281	1-14
A	ZHONG Chao, et al., A kinetic model of one-pot rapid biotransformation of cellobiose from sucrose catalyzed by three thermophilic enzymes, Chemical Engineering Science, 2017, Vol.161, pp.159-166 Abstract	1-14
A	北岡本光, スクロースからセロビオースを生産する, 化学と生物, 2002, Vol.40, No.8, pp.498-500 図1	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に 公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を 付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の 後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵 触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引 用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性 又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献 との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな いと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	04.06.2024	国際調査報告の発送日 18.06.2024
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 鳥居 敬司 4B 4045 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	HOU Ching T., et al., BIOCATALYSIS AND BIOTECHNOLOGY FOR FUNCTIONAL FOODS AND INDUSTRIAL PRODUCTS, CRC Press, 2007, ISBN 0-8493-9282-9 pp.326-328	1-14
A	CN 108611386 A (TIANJIN INST IND BIOTECHNOLOGY CAS) 02.10.2018 (2018 - 10 - 02) example 1	1-14
A	KULLIN B., et al., A functional analysis of the Bifidobacterium longum cscA and scrP genes in sucrose utilization, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, Vol.72, pp.975-981 abstract	1-14
A	JP 2004-222506 A (日研化成株式会社) 12.08.2004 (2004 - 08 - 12) 特許請求の範囲	1-14
A	JP 01-137979 A (農林水産省食品総合研究所長) 30.05.1989 (1989 - 05 - 30) 実施例 1	1-14

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
 - a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 - b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a）
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/018152

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 3-130086 A	03.06.1991	US 5077205 A claims, examples EP 423768 A1	
CN 108611386 A	02.10.2018	(ファミリーなし)	
JP 2004-222506 A	12.08.2004	(ファミリーなし)	
JP 01-137979 A	30.05.1989	SE 8800331 A example 1	