

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成31年1月10日(2019.1.10)

【公表番号】特表2018-512040(P2018-512040A)

【公表日】平成30年5月10日(2018.5.10)

【年通号数】公開・登録公報2018-017

【出願番号】特願2017-533766(P2017-533766)

【国際特許分類】

C 12 P 19/04 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 P 19/04 Z N A

C 12 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成30年11月26日(2018.11.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0160

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0160】

RchCdp1酵素およびVrucdp1酵素のいずれかで合成された不溶性セルロースを1.7~2.5重量含有するコロイド分散液の粘度を分析した。簡単に記載する、ブルックフィールドレオメータを使用して、粘度対剪断速度データを得、その曲線から剪断速度10(1/s)の粘度を求めた。コロイド分散液は両方とも、水の粘度の1000倍という高い粘度を示すことがわかった(図2)。また、分散液はすり減粘挙動(粘度が剪断速度の関数として減少する)を示した。その挙動は多くの増粘化用途で所望されているものである。各不溶性セルロース試料が低DPw(DPwが25未満、表2)であることを考慮すると、そのような高レベルの粘度が得られたことは注目すべきことである。実際、商業的に入手可能なカルボキシメチルセルロース(水溶性)では、水中粘度を、本明細書に提示の不溶性セルロースを使用した場合に観察される粘度と同じ程度まで増大させるために、DPw(約1000以上)を大きく増大させる必要があった(図3)。

上記のように、ビブリオ・ルバー(V. ruber)およびルミノコッカス・チャンパネレンス(R. chamaepanelleensis)のセロデキストリンホスホリラーゼによって生成された不溶性多糖類物質は低分子量の不溶性セルロースを含む。このセルロースは、約18~24のDPwを有し、セルロースII型結晶構造を示す。セルロースII型結晶構造は、マーセル化、誘導体化/非誘導体化処理などの化学的プロセスの結果ではなく、むしろ、不溶性セルロース材料を特徴付けるものである。なぜなら、それが酵素により直接生成されているからである。本明細書に示された不溶性セルロースの特有の特性は、粘度およびレオロジーの変性用途、ならびに膜/バリア用途における使用など、この材料に汎用性を付与するものである。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0161

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0161】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1. 水、グルコース - 1 - リン酸、セロデキストリン、および配列番号 2 または配列番号 6 と少なくとも 90 % 相同のアミノ酸配列を含むセロデキストリンホスホリーゼ酵素を含む酵素反応物であって、前記セロデキストリンホスホリーゼ酵素は、不溶性セルロースを合成する、酵素反応物。

2. 前記セルロースは、10 ~ 1000 の重量平均重合度 (DP<sub>w</sub>) を有する、上記 1 に記載の酵素反応物。

3. 前記セルロースは、10 ~ 30 の重量平均重合度 (DP<sub>w</sub>) を有する、上記 1 に記載の酵素反応物。

4. 前記セロデキストリンは、セロビオースを含む、上記 1 に記載の酵素反応物。

5. 不溶性セルロースを製造する方法であって、

a) 少なくとも水、グルコース - 1 - リン酸、セロデキストリン、および配列番号 2 または配列番号 6 と少なくとも 90 % 相同のアミノ酸配列を含むセロデキストリンホスホリーゼ酵素を接触させる工程であって、不溶性セルロースが生成される、工程と、

b) 任意選択により、工程 (a) で生成される前記不溶性セルロースを分離する工程とを含む方法。

6. 工程 (a) で生成される前記セルロースは、約 10 ~ 約 1000 の重量平均重合度 (DP<sub>w</sub>) を有する、上記 5 に記載の方法。

7. 工程 (a) で生成される前記セルロースは、約 10 ~ 約 30 の重量平均重合度 (DP<sub>w</sub>) を有する、上記 5 に記載の方法。

8. 工程 (a) で生成される前記セルロースは、セルロース II 型結晶構造を有する、上記 5 に記載の方法。

9. 前記セロデキストリンは、セロビオースを含む、上記 5 に記載の方法。

10. 前記グルコース - 1 - リン酸は、工程 (a) において第 2 の反応を行うことによって供給され、前記第 2 の反応の生成物は、グルコース - 1 - リン酸を含む、上記 5 に記載の方法。

11. 前記第 2 の反応は、

(i) 水、無機リン酸塩、デンプン、デンプンホスホリーゼ、および任意選択によりデンプン脱枝酵素、例えばブルラナーゼまたはイソアミラーゼを接触させるか、

(ii) 水、無機リン酸塩、スクロース、およびスクロースホスホリーゼ酵素を接触させるか、または

(iii) 水、無機リン酸塩、セルロースバイオマス、エンドグルカナーゼ、セロデキストリンホスホリーゼ、ならびに任意選択により溶解性多糖類モノオキシゲナーゼおよび / またはセロビオヒドロラーゼを接触させる

ことによってグルコース - 1 - リン酸を生成する、上記 10 に記載の方法。

12. 前記第 2 の反応は、工程 (a) が実施される容器と同じ容器で行われ、前記第 2 の反応は、工程 (a) の前におよび / または工程 (a) に続いて実施される、上記 10 に記載の方法。

### 【手続補正 3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

### 【請求項 1】

水、グルコース - 1 - リン酸、セロデキストリン、および配列番号 2 または配列番号 6 と少なくとも 90 % 相同のアミノ酸配列を含むセロデキストリンホスホリーゼ酵素を含む酵素反応物であって、前記セロデキストリンホスホリーゼ酵素は、不溶性セルロースを合成する、酵素反応物。

### 【請求項 2】

不溶性セルロースを製造する方法であって、

a ) 少なくとも水、グルコース - 1 - リン酸、セロデキストリン、および配列番号 2 または配列番号 6 と少なくとも 90 % 相同のアミノ酸配列を含むセロデキストリンホスホリーゼ酵素を接触させる工程であって、不溶性セルロースが生成される、工程と、

b ) 任意選択により、工程 ( a ) で生成される前記不溶性セルロースを分離する工程とを含む方法。