

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和6年6月24日(2024.6.24)

【国際公開番号】WO2022/019330

【出願番号】特願2022-538041(P2022-538041)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/56(2006.01)

C 1 2 N 9/26(2006.01)

C 1 2 N 15/31(2006.01)

C 1 2 N 15/63(2006.01)

C 1 2 N 1/15(2006.01)

C 1 2 N 1/19(2006.01)

C 1 2 N 1/21(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 P 19/12(2006.01)

C 1 2 P 19/18(2006.01)

C 1 2 P 19/14(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 15/56

C 1 2 N 9/26 Z Z N A

C 1 2 N 15/31

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 19/12

C 1 2 P 19/18

C 1 2 P 19/14 Z

20

30

【手続補正書】

【提出日】令和6年6月14日(2024.6.14)

【手続補正1】

【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】

下記(1)及び(2)の基質特異性を有し、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、 $85,000 \pm 5,000$ ダルトンの分子量を示すパノース分解酵素：

(1) パノースを加水分解し、イソマルトースとD - グルコースを生成する；及び

(2) イソマルトトリオース、デキストラン、及びプルランに作用しない。

40

【請求項2】

さらに、下記(a)乃至(d)の理化学的性質を有する請求項1記載のパノース分解酵素：

(a) 至適pH

30、20分反応の条件下で、pH 5.0乃至5.6；

(b) 至適温度

50

pH 5.5、20分反応の条件下で35 ;

(c) pH安定性

4、24時間保持の条件下で、pH 4.5乃至11.5の範囲で安定；及び

(d) 温度安定性

pH 5.5、1時間保持の条件下、Ca<sup>2+</sup>イオン非存在下で30 まで安定、5 mM Ca<sup>2+</sup>イオン存在下で35 まで安定。

【請求項3】

配列表における配列番号11で示されるアミノ酸配列か、配列表における配列番号11で示されるアミノ酸配列において、パノース分解活性を保持する範囲で1個又は2個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を有する請求項1又は2記載のパノース分解酵素。 10

【請求項4】

サロクラディウム (*Sarocladium*) 属微生物由来である請求項1乃至3のいずれかに記載のパノース分解酵素。

【請求項5】

サロクラディウム (*Sarocladium*) 属微生物が、サロクラディウム・キリエンス (*Sarocladium kilienense*) U4520株 (独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター、受託番号NITE BP-03236) 又はその変異株である請求項4記載のパノース分解酵素。 20

【請求項6】

請求項1乃至3のいずれかに記載のパノース分解酵素産生能を有するサロクラディウム・キリエンス (*Sarocladium kilienense*) U4520株 (独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター、受託番号NITE BP-03236) 又はその変異株。 30

【請求項7】

請求項1乃至3のいずれかに記載のパノース分解酵素をコードするDNA。

【請求項8】

配列表における配列番号10で示される塩基配列か、又は配列表における配列番号10で示される塩基配列において、コードするパノース分解酵素の活性を保持する範囲で1個又は2個以上の塩基が欠失、置換又は付加した塩基配列、又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項7記載のDNA。 40

【請求項9】

遺伝子コードの縮重に基づき、コードするアミノ酸配列を変えなく、配列表における配列番号10で示される塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項8記載のDNA。

【請求項10】

請求項7乃至9のいずれかに記載のDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる組換えDNA。

【請求項11】

請求項10記載の組換えDNAを適宜の宿主細胞に導入してなる形質転換体。 50

【請求項12】

請求項1乃至3のいずれかに記載のパノース分解酵素産生能を有する微生物を栄養培地で培養して請求項1乃至3のいずれかに記載のパノース分解酵素を生成せしめ、これを採取することを特徴とするパノース分解酵素の製造方法。

【請求項13】

前記微生物が、サロクラディウム (*Sarocladium*) 属に属する微生物である請求項12記載のパノース分解酵素の製造方法。

【請求項14】

サロクラディウム (*Sarocladium*) 属微生物が、サロクラディウム・キリエンス (*Sarocladium kilienense*) U4520 (独立行政法人製品評価 50

技術基盤機構 特許微生物寄託センター、受託番号 N I T E B P - 0 3 2 3 6 ) 又はその変異株である請求項 1 3 記載のパノース分解酵素の製造方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 1 記載の形質転換体を培養し、培養物から請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載のパノース分解酵素を採取することを特徴とする組換え型パノース分解酵素の製造方法。

【請求項 1 6】

澱粉又は澱粉部分分解物に作用し、その - 1 , 4 グルカン鎖の非還元末端グルコース残基の 6 位水酸基に D - グルコースが - 1 , 6 結合した分岐構造を有する分岐 - グルカンを生成する活性を有する 6 - - グルコシル転移酵素と、請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のパノース分解酵素とを組合せ、澱粉又は澱粉部分分解物に作用させることによりイソマルトースを生成させる工程と、生成したイソマルトースを採取する工程とを含んでなるイソマルトースの製造方法。

10

【請求項 1 7】

前記澱粉又は澱粉部分分解物に作用し、その - 1 , 4 グルカン鎖の非還元末端グルコース残基の 6 位水酸基に D - グルコースが - 1 , 6 結合した分岐構造を有する分岐 - グルカンを生成する活性を有する 6 - - グルコシル転移酵素が、バチルス ( B a c i l l u s ) 属微生物又はアルスロバクター ( A r t h r o b a c t e r ) 属微生物由来の酵素である請求項 1 6 記載のイソマルトースの製造方法。

【請求項 1 8】

前記イソマルトースを生成させる工程において、さらに、澱粉枝切酵素、 - アミラーゼ、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ及びグルコアミラーゼから選ばれる 1 種又は 2 種以上の酵素を併用する請求項 1 6 又は 1 7 記載のイソマルトースの製造方法。

20

【請求項 1 9】

請求項 1 6 乃至 1 8 のいずれかに記載のイソマルトースの製造方法に、さらにイソマルトースを水素添加することにより還元しイソマルチトールに変換する工程と、変換されたイソマルチトールを採取する工程とを付加してなるイソマルチトールの製造方法。

【請求項 2 0】

澱粉又は澱粉部分分解物に作用し、その - 1 , 4 グルカン鎖の非還元末端グルコース残基の 6 位水酸基に D - グルコース若しくはグルコース重合度 2 以上の - 1 , 6 グルカカンが - 1 , 6 結合した分岐構造を有する分岐 - グルカンを生成する活性を有する - グルコシル転移酵素と、請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のパノース分解酵素とを組合せ、澱粉又は澱粉部分分解物に作用させることによりイソマルトオリゴ糖を生成させる工程と、生成したイソマルトオリゴ糖を採取する工程を含んでなるイソマルトオリゴ糖の製造方法。

30

【請求項 2 1】

前記澱粉又は澱粉部分分解物に作用し、その - 1 , 4 グルカン鎖の非還元性末端グルコース残基の 6 位水酸基に D - グルコース若しくはグルコース重合度 2 以上の - 1 , 6 グルカカンが - 1 , 6 結合した分岐構造を有する分岐 - グルカンを生成する活性を有する - グルコシル転移酵素が、バチルス ( B a c i l l u s ) 属微生物又はアルスロバクター ( A r t h r o b a c t e r ) 属微生物由来の酵素である請求項 2 0 記載のイソマルトオリゴ糖の製造方法。

40

【請求項 2 2】

前記イソマルトオリゴ糖を生成させる工程において、さらに、澱粉枝切酵素、 - アミラーゼ、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ及びグルコアミラーゼから選ばれる 1 種又は 2 種以上の酵素を併用する請求項 2 0 又は 2 1 記載のイソマルトオリゴ糖の製造方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 0 乃至 2 2 のいずれかに記載のイソマルトオリゴ糖の製造方法に、さらにイソマルトオリゴ糖を水素添加することにより還元しイソマルトオリゴ糖アルコールに変換す

50

る工程と、変換されたイソマルトオリゴ糖アルコールを採取する工程とを付加してなるイソマルトオリゴ糖アルコールの製造方法。

10

20

30

40

50