

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6499081号
(P6499081)

(45) 発行日 平成31年4月10日 (2019. 4. 10)

(24) 登録日 平成31年3月22日 (2019. 3. 22)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 N 1/15 (2006. 01) C 1 2 N 1/15
C 1 2 P 19/02 (2006. 01) C 1 2 P 19/02
C 1 2 P 7/06 (2006. 01) C 1 2 P 7/06
C 1 2 C 5/00 (2006. 01) C 1 2 C 5/00
A 2 3 L 33/10 (2016. 01) A 2 3 L 33/10

請求項の数 18 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-547962 (P2015-547962)
(86) (22) 出願日 平成25年11月21日 (2013. 11. 21)
(65) 公表番号 特表2016-500267 (P2016-500267A)
(43) 公表日 平成28年1月12日 (2016. 1. 12)
(86) 国際出願番号 PCT/US2013/071154
(87) 国際公開番号 W02014/092960
(87) 国際公開日 平成26年6月19日 (2014. 6. 19)
審査請求日 平成28年11月4日 (2016. 11. 4)
(31) 優先権主張番号 PCT/CN2012/086349
(32) 優先日 平成24年12月11日 (2012. 12. 11)
(33) 優先権主張国 中国 (CN)

(73) 特許権者 509240479
ダニスコ・ユーエス・インク
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロ
ード 925
(74) 代理人 100071010
弁理士 山崎 行造
(74) 代理人 100118647
弁理士 赤松 利昭
(74) 代理人 100138438
弁理士 尾首 亘聰
(74) 代理人 100138519
弁理士 奥谷 雅子
(74) 代理人 100123892
弁理士 内藤 忠雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 由来のグルコアミ
ラーゼを発現するトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞、及

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 2 又は 1 3 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する A f G A T R 又は グルコアミラーゼ活性を有する A f G A T R 変異体を発現する組み換えトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞であって、前記トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞が、同一の条件下で前記 A f G A T R 又はその変異体と同じアミノ酸配列を有する A f G A 又はその変異体を発現するアスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 宿主細胞と同等のレベルにて、前記 A f G A T R 又はその変異体を発現する、組み換えトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞。

【請求項 2】

配列番号 1 2 又は 1 3 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する A f G A T R 又は グルコアミラーゼ活性を有する A f G A T R 変異体を発現する組み換えトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞であって、前記 A f G A T R 又はその変異体が、A f G A T R 又はその変異体と同じアミノ酸配列を有する A f G A 又はその変異体よりも熱安定性に優れ、かつ前記 A f G A 又はその変異体が A. フミガタス (*A. fumigatus*) 宿主細胞において発現される、組み換えトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞。

【請求項 3】

(a) 配列番号 1 2 又は 1 3 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する組み換え A f G A T R 又は グルコアミラーゼ活性を有する変異体を発現する T. レーシ (T. reesei

10

20

i) 宿主細胞を提供する工程と、

(b) 前記組み換えA f G A T R又はその変異体の生成を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程と、

を含む、組み換えA f G A T R又はその変異体を生成するための方法であって、前記A f G A T R又はその変異体が、A f G A T R又はその変異体と同じアミノ酸配列を有するA f G A又はその変異体よりも熱安定性に優れ、かつ前記A f G A又はその変異体がA. フミガタス (A. fumigatus) 宿主細胞において発現される、組み換えA f G A T R又はその変異体の生成方法。

【請求項4】

請求項1若しくは請求項2に記載の宿主細胞、又は請求項3に記載の方法により生成される組み換えA f G A T R又はその変異体。

10

【請求項5】

前記A f G A T R又はその変異体が74℃でpH 5.0にて10分間にわたって少なくとも70%のグルコアミラーゼ活性を有する、請求項4に記載の組み換えA f G A T R又はその変異体。

【請求項6】

前記A f G A T R又はその変異体がA f G A 1 T R又はその変異体である、請求項5に記載の組み換えA f G A T R又はその変異体。

【請求項7】

前記A f G A 1 T R又はその変異体が、55℃～74℃の温度範囲でpH 5.0にて10分間にわたって少なくとも70%のグルコアミラーゼ活性を有する、請求項6に記載の組み換えA f G A 1 T R又はその変異体。

20

【請求項8】

前記A f G A T R又はその変異体の至適温度が約68℃である、請求項7に記載の組み換えA f G A 1 T R又はその変異体。

【請求項9】

前記A f G A T R又はその変異体がA f G A 2 T R又はその変異体である、請求項5に記載の組み換えA f G A T R又はその変異体。

【請求項10】

前記A f G A 2 T R又はその変異体が、61℃～74℃の温度範囲でpH 5.0にて10分間にわたって少なくとも70%のグルコアミラーゼ活性を有する、請求項9に記載の組み換えA f G A 2 T R又はその変異体。

30

【請求項11】

前記A f G A 2 T R又はその変異体の至適温度が約69℃である、請求項10に記載の組み換えA f G A 2 T R又はその変異体。

【請求項12】

前記A f G A T R又はその変異体が、配列番号12に対して少なくとも95%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項4～8のいずれか一項に記載の組み換えA f G A T R又はその変異体。

【請求項13】

40

前記A f G A T R又はその変異体が、配列番号13に対して少なくとも95%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項4～5及び9～11のいずれか一項に記載の組み換えA f G A T R又はその変異体。

【請求項14】

デンプンを含む組成物を糖化して、グルコースを含む組成物を生成する方法であって、前記方法が、

(i) 請求項4～13のいずれか一項に記載の単離された組み換えA f G A T R又はその変異体をデンプン組成物と接触させる工程と、

(i i) 前記デンプン組成物を糖化して前記グルコース組成物を生成する工程と、を含む、前記A f G A 1 T R又はその変異体が、デンプンを含む組成物からグルコースを含む

50

組成物への糖化を触媒する、方法。

【請求項 15】

グルコースを含む前記組成物が、同一の条件下で24時間の糖化後にA n G Aにより生成されたD P 1を含む第2の組成物と比較してD P 1が富化される、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

グルコースを含む前記組成物が、同一の条件下で野生型A f G Aにより生成されたD P 1を含む第2の組成物と比較してD P 1が富化される、請求項14に記載の方法。

【請求項 17】

前記A f G A T R又はその変異体がA f G A T R 2であり、グルコースを含む前記組成物が、同一の条件下でA f G A 1 T Rにより生成されたD P 1を含む第2の組成物と比較してD P 1が富化され得る、請求項14に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記A f G A 1 T R又はその変異体が、同一の条件下でA n G Aの約40%～50%の用量にて糖化の24時間後に同じD P 1生産量を生ずる、請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2012年12月11日に出願された国際特許出願第P C T / C N 2 0 1 2 / 0 8 6 3 4 9号による優先権の利益を主張するものであり、その全体が本明細書において参照により援用されている。

20

【0002】

本明細書には配列番号1～14を含む配列表が添付され、その全体が本明細書において参照により援用されている。

【0003】

(発明の分野)

アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) (A f G A T R) 由来のグルコアミラーゼを発現するトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞、又はその変異体、及びその使用方法。

30

【背景技術】

【0004】

デンプンはアミロース (15～30% w t / w t) とアミロペクチン (70～85% w t / w t) の混合物からなる。アミロースは、約60,000～約800,000の分子量 (MW) を有する α -1,4-結合型グルコース単位の線状鎖からなる。アミロペクチンは、24～30グルコース単位毎に α -1,6分岐点を包含した分岐鎖状ポリマーで、MWは1億にもなる場合がある。

【0005】

現在、デンプン由来の糖を濃縮デキストロースシロップ形態で製造する際には、(1) α アミラーゼによる、固体デンプンのデキストリン (平均重合度約7～10) への液化 (又は減粘) と、(2) グルコアミラーゼ (アミログルコシダーゼ又はG Aとも呼ばれる) による、得られた液化デンプン (即ち、デンプン加水分解産物) の糖化と、を含む、酵素により触媒されるプロセスが用いられる。得られるシロップは高グルコース含量を有する。市販のグルコースシロップの多くは、続いて酵素により、イソシロップとして知られるブドウ糖/果糖混合物へと異性化される。また、得られたシロップを、酵母菌などの微生物を用いて発酵させ、例えば、エタノール、クエン酸、乳酸、コハク酸、イタコン酸、グルタミン酸ナトリウム、グルコン酸塩、リジン、他の有機酸、他のアミノ酸、及び他の生化学物質を含む商品を生産することができる。発酵及び糖化を同時に実施することで (即ち、S S Fプロセス)、経済性と効率性を向上させることができる。

40

【0006】

50

グルコアミラーゼ（グルカン1，4- α -グルコヒドロラーゼ、EC 3.2.1.3）は、連続したグルコース単位を、デンプン又は関連するオリゴ及び多糖類分子の非還元末端から除去するのを触媒する、エキソ作用型カルボヒドラーゼを加水分解するデンプンである。グルコアミラーゼは、デンプン（例えば、アミロース及びアミロペクチン）の直鎖状及び分枝状グルコシド結合の両方を加水分解し得る。他方、 α アミラーゼは、内部の α -1,4-グルコシド結合を無作為に切断することにより、デンプン、グリコーゲン、及び関連する多糖類を加水分解する。グルコアミラーゼは、デンプン糖化、醸造、焼成、食品業界向けシロップ類の生産、発酵プロセス用の供給原料の生産、及び動物飼料の消化率向上の目的を含む、多様な目的に使用されてきた。

【0007】

グルコアミラーゼは、多くの細菌類、菌類及び植物の株から生成される。例えば、グルコアミラーゼは、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) の株により生成される。Luo et al. (2008) 「Production of acid proof raw starch-digesting glucoamylase from a newly isolated strain of *Aspergillus fumigatus* MS-09」, Sci. Tech. Food Indus. 29 (5): 151~154; Sellars et al. (1976) 「Degradation of barley by *Aspergillus fumigatus* Fres」, Proc. Int. Biodegradation Symp., 3rd, S. J. Miles et al., eds., Appl. Sci., Barking, UK, pp. 635~43; Domingues et al. (1993) 「Production of amylase by soil fungi and partial biochemical characterization of amylase of a selected strain (*Aspergillus fumigatus* Fresenius)」, Can. J. Microbiol. 39 (7): 681~85; Cherry et al. (2004) 「Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*」, Pakistan J. Biol. Sci. 7 (11): 1988~92。しかしながら、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) は、ヒト及び植物に対して非常にアレルギー性であり、かつ病原となる。よって、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) は、食用製造製品の工業プロセスに用いられるグルコアミラーゼに対して生存可能な産生宿主ではない。A. フミガタス (*A. fumigatus*) のグルコアミラーゼを好適な宿主から生成することに対するニーズが存在している。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) (AfGATR) において発現される、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 由来のグルコアミラーゼは、高温にてかつ酸性pHで長時間にわたって糖化を触媒する。核酸をコードするアスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) (配列番号1及び2) 由来の、及びポリヌクレオチドを発現するトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞由来の公知のグルコアミラーゼの例が、提供されている。トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞は、天然に発現されるAfGAアスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) より高いレベル又は少なくとも同等なレベルにてAfGATRを発現する。AfGA1TR及びAfGA2TRをはじめとするAfGATRは、高温かつ低pHにて高活性を呈するため、アスペルギルス・カワチイ (*Aspergillus kawachii*) の α アミラーゼ (AkAA) のような α アミラーゼの存在下で、糖化プロセスにおいて効率的に利用され得る。AfGATRは好都合にもデンプンの糖化を触媒することにより、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) のグルコアミラーゼ (AnGA)、又はアスペルギルス

・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) において発現される天然の A f G A が触媒する糖化の産物と比べて、D P 1 (即ち、グルコース) が著しく富化されたオリゴ糖組成物を生ずる。A f G A 1 T R、A f G A 2 T R 又はその変異体などの A f G A T R は、A n G A 及び天然に発現される A f G A よりも低用量で使用して、同等なレベルのグルコースを生成し得る。A f G A T R 又はその変異体を、植物 (例えば、シリアル及び穀粒) 由来の酵素と併用してもよい。また、A f G A T R 又はその変異体を、宿主細胞により分泌される酵素、又は宿主細胞に内在する酵素と併用してもよい。例えば、A f G A T R 又はその変異体を糖化反応又は S S F プロセスに加えてもよく、この糖化反応中に又は S S F プロセス中に、1 種以上のアミラーゼ、追加のグルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、フィターゼ、エステラーゼ、酸化還元酵素、トランスフェラーゼ、又はその他の酵素が、10
産生宿主により分泌される。A f G A T R 又はその変異体はまた、内在性かつ非分泌型の産生宿主酵素と共に作用し得る。別の実施例において、A f G A T R 又はその変異体は、糖化中に又は S S F 中に、産生宿主細胞により他の酵素と共に分泌され得る。A f G A T R グルコアミラーゼ、又はその変異体は、シロップ及び／又は生化学物質 (例えば、アルコール、有機酸、アミノ酸、その他の生化学物質及び生体適合物質) 用のデンプンの直接加水分解が関与するプロセスにおいて、反応温度が基質の糊化温度未満である場合に、使用できる。糖化中に又は S S F 中に、A f G A T R 又はその変異体は、他の酵素と共に、トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞により分泌され得る。

【0009】

したがって、配列番号 1 2 又は 1 3 に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する A f G A T R 又はその変異体を発現する組み換えトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞であって、前記トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞が、同一の条件下で A f G A T R 又はその変異体と同じアミノ酸配列を有する A f G A 又はその変異体を発現するアスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 宿主細胞と同等のレベルにて、A f G A T R 又はその変異体を発現する、組み換えトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞が提供されている。20

【0010】

また、配列番号 1 2 又は 1 3 に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する A f G A T R 又はその変異体を発現する組み換えトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞であって、A f G A T R 又はその変異体が、A f G A T R 又はその変異体と同じアミノ酸配列を有する A f G A 又はその変異体よりも熱安定性に優れ、かつ A f G A 又はその変異体が A . フミガタス (*A. fumigatus*) 宿主細胞において発現される、組み換えトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞も提供されている。30

【0011】

また、(a) 配列番号 1 2 又は 1 3 に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する組み換え A f G A T R 又はその変異体を発現する T . レーシ (*T. reesei*) 宿主細胞を提供する工程と、(b) 前記組み換え A f G A T R 又はその変異体の生成を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程と、(c) 前記組み換え A f G A T R 又はその変異体を単離する工程と、を含む、組み換え A f G A T R 又はその変異体の生成方法であって、A f G A T R 又はその変異体と同じアミノ酸配列を有する A f G A 又はその変異体よりも熱安定性に優れ、かつ A f G A 又はその変異体が A . フミガタス (*A. fumigatus*) 宿主細胞において発現される、組み換え A f G A T R 又はその変異体の生成方法も、提供されている。40

【0012】

また、開示されている宿主細胞により生成された組み換え A f G A T R 又はその変異体が提供されている。組み換え A f G A T R 又はその変異体は、7 4 °C、p H 5 . 0 にて 1 0 分間にわたって少なくとも 7 0 % の活性を有し得る。組み換え A f G A T R 又はその変異体は、A f G A 1 T R であり得る。A f G A 1 T R は、5 5 ° ~ 7 4 °C の温度範囲で p H 5 . 0 にて 1 0 分間にわたって少なくとも 7 0 % の活性を有し得る。A f G A 1 T R の至適温度は、約 6 8 °C であり得る。組み換え A f G A T R 又はその変異体はまた、A 50

f G A 2 T Rであり得る。A f G A 2 T Rは、61 ° ~ 74 ° Cの温度範囲でpH 5.0にて10分間にわたって少なくとも70%の活性を有し得る。A f G A 2 T Rの至適温度は、約69 ° Cであり得る。組み換えA f G A T R又はその変異体は、配列番号12に対して少なくとも90%、95%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。組み換えA f G A T R又はその変異体は、配列番号12を含み得る。組み換えA f G A T R又はその変異体はまた、配列番号13に対して少なくとも90%、95%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列からなり得る。組み換えA f G A T R又はその変異体は、配列番号12からなり得る。組み換えA f G A T R又はその変異体はまた、配列番号13に対して少なくとも90%、95%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。組み換えA f G A T R又はその変異体は、配列番号13を含み得る。組み換えA f G A T R又はその変異体はまた、配列番号13に対して少なくとも90%、95%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列からなり得る。組み換えA f G A T R又はその変異体は、配列番号13からなり得る。

10

【0013】

また、デンプンを含む組成物を糖化してグルコースを含む組成物を生成する方法であって、前記方法が、(i)請求項4~15のいずれか一項に記載の単離されたA f G A T R又はその変異体をデンプン組成物と接触させる工程と、(ii)デンプン組成物を糖化して前記グルコース組成物を生成する工程と、を含み、前記A f G A 1 T R又はその変異体が、デンプンを含む組成物からグルコースを含む組成物への糖化を触媒する、方法も提供されている。グルコースを含む組成物は、同一の条件下でA n G Aにより生成されたD P 1を含む第2の組成物と比較して、D P 1が富化され得る。グルコースを含む組成物はまた、同一の条件下で、野生型A f G Aにより生成されたD P 1を含む第2の組成物と比較してD P 1が富化され得る。A f G A T R又はその変異体はA f G A T R 2であってもよく、グルコースを含む組成物は、同一の条件下で、A f G A 1 T Rにより生成されたD P 1を含む第2の組成物と比較してD P 1が富化され得る。A f G A 1 T R又はその変異体は、同一の条件下でA n G Aの用量の約40%~50%にて投与され、同じD P 1収率を生じ得る。

20

【0014】

液化デンプン、ゼラチン化されたデンプン、又は粒状デンプンを包含するデンプンを含む組成物もまた、提供されている。糖化は、約30 ° C~約65 ° Cの温度範囲で実施することができる。温度範囲は、47 ° C~60 ° Cであってもよい。糖化は、pH 2.0~pH 6.0のpH範囲で実施することができる。このpH範囲は、pH 3.5~pH 5.5であってもよい。また、このpH範囲は、pH 4.0~pH 5.0であってもよい。

30

【0015】

デンプン組成物を α アミラーゼと接触させる工程を更に含み得る糖化方法もまた、提供されている。 α アミラーゼはA k A Aであり得る。糖化方法は、デンプン組成物をプルリナーゼ(pullulanase)と接触させる工程を、更に含み得る。

【0016】

グルコース組成物を発酵させて発酵最終(E O F)産物を生成する工程を更に含み得る糖化方法もまた、提供されている。この発酵はまた、同時糖化発酵(S S F)反応であり得る。発酵は、pH 2~8、25 ° C~70 ° Cの温度範囲で24~70時間実施することができる。E O F産物はエタノールを含み得る。E O F産物は、8%~18%(v/v)のエタノールを含み得る。本方法は、マッシュ及び/又は糖化液をプルラナーゼ、 α アミラーゼ及びA f G A 1 T R又はその変異体と接触させる工程を、更に含み得る。本方法はまた、(a)マッシュを調製する工程と、(b)マッシュを濾過して糖化液を得る工程と、(c)糖化液を発酵させて発酵飲料を得る工程と、を更に含んでもよく、ここで、プルラナーゼ、 α アミラーゼ及びA f G A 1 T R又はその変異体は、(i)工程(a)のマッシュ、及び/又は(ii)工程(b)の糖化液、及び/又は(iii)工程(c)の発酵済み糖化液に加えられる。E O F産物は、代謝産物を含んでもよい。代謝産物は、ク

40

50

エン酸、乳酸、コハク酸、グルタミン酸ナトリウム、グルコン酸、グルコン酸ナトリウム、グルコン酸カルシウム、グルコン酸カリウム、グルコ δ -ラクトン、エリソルビン酸ナトリウム、 ω -3脂肪酸、ブタノール、アミノ酸、リジン、イタコン酸、1,3-プロパンジオール、又はイソプレンであってもよい。

【0017】

付加的なグルコアミラーゼ、ヘキソキナーゼ、キシラナーゼ、グルコースイソメラーゼ、キシロースイソメラーゼ、ホスファターゼ、フィターゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、 β アミラーゼ、付加的な α アミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、トレハラーゼ、イソアミラーゼ、酸化還元酵素、エステラーゼ、トランスフェラーゼ、ペクチナーゼ、 α グルコシダーゼ、 β グルコシダーゼ、リアーゼ、加水分解酵素、又はこれらの組み合わせを前記デンプン組成物に添加することを更に含む得る方法もまた提供されている。A f G A T R又はその変異体は、0.1~2グルコアミラーゼ単位(GAU)/g d sの用量にて添加され得る。A f G A T R又はその変異体は、約49.5 μ gタンパク質/g固形分の用量にて添加され得る。プルラナーゼもまた、添加され得る。単離されたA f G A T R又はその変異体は、前記トリコデルマ・レーシ(Trichoderma reesei)宿主細胞により分泌され得る。宿主細胞は、 α アミラーゼを更に発現し、かつ分泌できる。宿主細胞は、プルラナーゼを更に発現し、かつ分泌できる。

10

【0018】

デンプンを含む前記組成物を前記宿主細胞と接触させる工程を更に含む得る糖化方法もまた、提供されている。宿主細胞は、グルコース組成物を発酵できる。

20

【0019】

また、開示されている糖化方法により生成されたグルコースを含む組成物も想到される。また、開示されている糖化方法により生成された液化デンプンも想到される。また、開示されている糖化方法により生成された発酵飲料も想到される。

【0020】

また、単離されたA f G A 1 T R又はその変異体を含む、デンプン含有の組成物の糖化の使用も想到される。組成物は培養細胞物質であってよい。組成物は、グルコアミラーゼを更に含む得る。A f G A 1 T R又はその変異体は精製されていてもよい。A f G A 1 T R又はその変異体は、宿主細胞により分泌され得る。

【0021】

また、グルコースを含む組成物の生成における、A f G A 1 T R又はその変異体の使用も想到される。また、液化デンプンの生成における、A f G A 1 T R又はその変異体の使用も想到される。また、発酵飲料の生成における、A f G A 1 T R又はその変異体の使用も想到される。開示されている発酵飲料の糖化方法、又は発酵最終産物に関して開示されている使用であって、発酵飲料又は発酵最終産物が、i)フルモルトビール、「ビール純粋令」に従って醸造されたビール、エール、IPA、ラガー、ビター、発泡酒(第二のビール)、第三のビール、ドライビール、ニアビール、ライトビール、低アルコールビール、低カロリービール、ポーター、ボックビール、スタウト、麦芽酒、ノンアルコールビール、及びノンアルコール麦芽酒からなる群から選択されるビールと、ii)果物風味の麦芽飲料、酒風味の麦芽飲料、及びコーヒー風味の麦芽飲料からなる群から選択されるシリアル飲料又は麦芽飲料と、からなる群から選択される、方法、又は使用もまた、想到される。

30

40

【0022】

また、(i)1種以上の食品原料と、(ii)請求項4~15に記載の単離されたA f G A 1 T R又はその変異体と、を混合する工程を含み、食品原料中に存在するデンプン成分の加水分解を前記プルラナーゼ及び前記単離されたA f G A 1 T R又はその変異体が触媒してグルコースを生成する、食品組成物の生成方法も想到される。食品組成物は、食品、焼成組成物、食品添加物、動物性食品製品、飼料製品、飼料添加物、油、肉、及びラードからなる群から選択され得る。食品原料は、焼成原料又は添加剤を含み得る。1種以上の食品原料は、穀粉、老化防止アミラーゼ、ホスホリパーゼ、リン脂質、マルトース生成

50

α アミラーゼ、又はマルトース生成性 α アミラーゼ活性を有するその変異体、相同体、若しくは突然変異体、ベーカーリー用キシラナーゼ (E C 3. 2. 1. 8)、及びリパーゼからなる群から選択され得る。1 種以上の食品原料は、(i) バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のマルトース生成 α アミラーゼ、(i i) バチルス (*Bacillus*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、サーモミセス (*Thermomyces*)、又はトリコデルマ (*Trichoderma*) 由来のベーカーリー用キシラナーゼ、(i i i) フザリウム・ヘテロスポラム (*Fusarium heterosporum*) 由来のグリコリパーゼ、からなる群から選択され得る。食品組成物は、練り粉又は練り粉製品、好ましくは加工された練り粉製品を含み得る。本方法は、食品組成物を焼成して焼成食品を生産する工程を含み得る。本方法は、(i) デンプン基質を調製する工程と、(i i) デンプン基質にプルラナーゼ及び A f G A 1 T R 又はその変異体を加える工程と、(i i i) 焼成食品の生産工程 (b) の間に又はその後にデンプン基質に熱を加える工程と、を更に含み得る。

10

【0023】

また、A f G A 1 T R 又はその変異体を含む食品組成物の生成に用いられる組成物も、想到される。また、食品組成物の調製における A f G A 1 T R 又はその変異体の使用も想到される。食品組成物は、練り粉又は練り粉製品、好ましくは、加工された練り粉製品を含み得る。食品組成物はベーカーリー組成物であってよい。また、練り粉製品の劣化、好ましくは有害な老化を遅延又は軽減するための、練り粉製品における A f G A 1 T R 又はその変異体の使用も想到される。

20

【図面の簡単な説明】

【0024】

添付の図面は、本明細書において援用され、その一部を構成しており、かつ本明細書で開示する様々な方法及び組成物を図示している。図面は次の通りである。

【図1A】A f G A 1 の触媒コア、及び炭水化物結合ドメイン (それぞれ、配列番号1の残基27～476及び524～631、又は全長のC l u s t a l W によるアラインメントを、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) A 1 1 6 3 (A f G A 2) (それぞれ、配列番号2の残基27～476及び524～631)、ネオサートーヤ・フィシェリ (*Neosartorya fisheri*) N R R L 1 8 1 (それぞれ、配列番号3の残基28～476及び520～627)、タラロマイセス・スチピテイタス (*Talaromyces stipitatus*) A T C C 1 0 5 0 0 (それぞれ、配列番号4の残基28～478及び530～637)、ペニシリウム・マルネッフェイ (*Penicillium marneffeii*) A T C C 1 8 2 2 4 (それぞれ、配列番号5の残基31～481及び534～641)、並びにアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) F G S C A 4 (それぞれ、配列番号6の残基55～493及び544～661) 由来のグルコアミラーゼの対応する残基と共に示す。図1において、アスタリスクで指示してある残基は、配列番号1～6における保存残基に対応するA f G A 1 残基である。

30

【図1B】A f G A 1 の触媒コア、及び炭水化物結合ドメイン (それぞれ、配列番号1の残基27～476及び524～631、又は全長のC l u s t a l W によるアラインメントを、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) A 1 1 6 3 (A f G A 2) (それぞれ、配列番号2の残基27～476及び524～631)、ネオサートーヤ・フィシェリ (*Neosartorya fisheri*) N R R L 1 8 1 (それぞれ、配列番号3の残基28～476及び520～627)、タラロマイセス・スチピテイタス (*Talaromyces stipitatus*) A T C C 1 0 5 0 0 (それぞれ、配列番号4の残基28～478及び530～637)、ペニシリウム・マルネッフェイ (*Penicillium marneffeii*) A T C C 1 8 2 2 4 (それぞれ、配列番号5の残基31～481及び534～641)、並びにアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) F G S C A 4 (それぞれ、配列番号6の残基55～493及び544～661) 由来のグルコアミラーゼの対応する残基と共に示す。図1において、アスタリスクで指示してある残基は、配列番号1～6における保存残基に対応するA f G A 1 残基である。

40

【図2】A f G A 1 ポリペプチド、p J G 2 2 2 (T r e x 3 g M - A f G A 1) をコー

50

ドするポリヌクレオチドを含む、p J G 2 2 2 発現ベクターのマップを示す。

【図 3】グルコアミラーゼ活性（相対単位）の pH 依存性を示す。グルコアミラーゼとしては、（１）アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) において発現される野生型 A f G A、（２）トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) において発現される A f G A 1 T R、及び（３）アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) において発現される A n G A が挙げられる。50℃にて可溶性デンプンからグルコースを放出させることにより、グルコアミラーゼ活性をアッセイした。

【図 4】グルコアミラーゼ活性（相対単位）の温度依存性を示す。グルコアミラーゼとしては、（１）アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) において発現される野生型 A f G A、（２）トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) において発現される A f G A 1 T R、及び（３）A n G A が挙げられる。pH 5.0にて可溶性デンプンからグルコースを放出させることにより、グルコアミラーゼ活性をアッセイした。

【図 5 A】pH 4.5 及び 5.0 にて乾燥固形分 35% のデンプンからグルコースを放出させることによりアッセイされた、A f G A 1 T R 及び A n G A グルコアミラーゼ活性を示す。

【図 5 B】pH 4.5 及び 5.0 にて乾燥固形分 35% のデンプンからグルコースを放出させることによりアッセイされた、A f G A 1 T R 及び A n G A グルコアミラーゼ活性を示す。

【図 6 A】A f G A T R 1、ブルナーゼ及び A k A A を含有する組成物が、乾燥固形分 35% のデンプンを D P 1 に加水分解し、D P 1 を D P 2 に転換したことを示す。

【図 6 B】A f G A T R 1、ブルナーゼ及び A k A A を含有する組成物が、乾燥固形分 35% のデンプンを D P 1 に加水分解し、D P 1 を D P 2 に転換したことを示す。

【図 7 A】A f G A T R 1、ブルナーゼ及び可変用量の A k A A を含有する組成物が、乾燥固形分 35% のデンプンを D P 1 に加水分解し、D P 1 を D P 2 に転換したことを示す。

【図 7 B】A f G A T R 1、ブルナーゼ及び可変用量の A k A A を含有する組成物が、乾燥固形分 35% のデンプンを D P 1 に加水分解し、D P 1 を D P 2 に転換したことを示す。

【図 8】A f G A 1 T R 又は A n G A を含有し、かつ α アミラーゼ (O P T I M A X L-100) 及び P U (G C 6 3 6) を更に含有する組成物が、乾燥固形分 35% のデンプンから還元糖を放出した後の、96% D P 1 含有の高グルコース組成物中に見出された D P 2 の量を示す。

【図 9】A f G A 2 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、p J G 3 1 3 (T r e x 3 g M-A f G A 2) を含んでなる、p J G 3 1 3 発現ベクターのマップを示す。

【図 10】トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) において発現されるグルコアミラーゼ（相対単位）A f G A 2 T R の pH 依存性を示す。50℃にて可溶性デンプン基質からグルコースを放出させることにより、グルコアミラーゼ活性をアッセイした。

【図 11】トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) において発現される A f G A 2 T R のグルコアミラーゼ活性（相対単位）の温度依存性を示す。pH 5.0 にて可溶性デンプン基質からグルコースを放出させることにより、グルコアミラーゼ活性をアッセイした。

【図 12】pH 5.0 にて 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液中での A f G A 2 T R の熱安定性を示す。可溶性デンプン基質への添加に先立って、サーモサイクラー中で所望される温度にて 2 時間酵素をインキュベートした。

【図 13】T. レーシ (*T. reesei*) において発現される A f G A 1 T R の S D S ゲルを示す。カラム M には、タンパク質分子量 (MW) ラダーが k D a 単位で含有される。カラム 1~4 は、発酵経過時間をそれぞれ 40.5 時間、64.5 時間、88.3 時間、及び 112 時間とした、A f G A T R を生成する T. レーシ (*T. reesei*) 発酵により得られた試料を表す。75 k D a にて矢印で標識された帯域は、A f G A 1 T R である。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【0025】

アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) (A f G A 1 T R 又は A f G A 2 T R) 及びその変異体由来の真菌グルコアミラーゼが、提供されている。A f G A 1 T R 又はその変異体は、pH 5.0 の最適 pH を有し、かつ pH 3.5 ~ pH 7.5 の範囲にわたって少なくとも 70 % の活性を有する。酵素は 68 °C において至適温度を有し、pH 5.0 で試験した場合に、55 ° ~ 74 °C の温度範囲にわたって少なくとも 70 % 活性を有する。A f G A 2 T R 又はその変異体は、pH 5.3 の最適 pH を有し、かつ pH 3.3 ~ pH 7.3 の範囲にわたって少なくとも 70 % の活性を有する。酵素の至適温度は 69 °C であり、pH 5.0 で試験した場合に、61 ~ 74 °C の温度範囲にわたって少なくとも 70 % 活性を有する。これらの特性により、同一の反応条件下で、これらの酵素を α アミラーゼと併用できる。これにより、pH 及び温度が α アミラーゼ又はグルコアミラーゼの使用に最適となるよう調節されなければならないバッチプロセスとして糖化反応を実施する必要がなくなる。

10

【0026】

A f G A T R (A f G A 1 T R 及び A f G A 2 T R を含む) 又はその変異体などのグルコアミラーゼの例示的な用途は、デンプン糖化プロセス、例えば、SSF、食品組成物の調製、洗濯物、食器類及び他の表面の洗浄用、編織布処理 (例えば、糊抜き) 用の洗浄組成物のような洗浄組成物の調製に使用できる。A f G A T R は好都合にもデンプンの糖化を触媒して、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 由来のグルコアミラーゼ (A n G A) により触媒される糖化の産物と比べて DP 1 (即ち、グルコース) が著しく富化されたオリゴ糖組成物を生ずる。A f G A T R は、発酵又は SSF 中に、その他の酵素とともに宿主細胞により分泌され得る。例えば、A f G A T R は、A n G A よりも糖化速度が高くなり、24 時間で 96 % 超のグルコースを生成することを、実証している。A f G A T R はまた、A n G A よりも低用量にて使用して、同等なレベルの DP 1 を生じ得る。少なくとも 50 % の用量節約が期待できる。A f G A T R はまた、糖化中に、統計的に A n G A よりも有意に熱安定性に優れる。A f G A T R は、植物 (例えば、穀草及び穀物) 由来の酵素と併用できる。A f G A T R はまた、T. レーシ (*T. reesei*) のような宿主細胞により分泌される、又はそのような宿主細胞に内在する酵素と併用できる。例えば、A f G A T R は、1 種以上のアミラーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、フィターゼ、エステラーゼ、酸化還元酵素、トランスフェラーゼ、又はその他の酵素が産生宿主により分泌されている糖化、発酵又は SSF プロセスの間に、該プロセスに加えることができる。A f G A T R は、アクセサリ (accessory) の α アミラーゼと併用することにより、更に糖化速度を上昇させ得る。例えば、0.1 SSU/g d s の A k A A を添加することにより、糖化速度が上昇する。A f G A T R は、A k A A 及びプルラーゼとの併用によって、単一の pH プロセスにおいて同じグルコース収率にて A n G A よりも 0.1 % だけ低い DP 3 を有することが見出された。また、A f G A T R は、内在性かつ非分泌型の産生宿主の酵素と組み合わせさせて機能し得る。別の実施例においては、発酵中又は SSF 中に、A f G A T R が他の酵素と共に産生宿主細胞により分泌され得る。A f G A T R はまた、基質の糊化温度未満の反応温度で、シロップ及び／又は生化学物質 (例えば、アルコール、有機酸、アミノ酸、その他の生化学物質及び生体適合物質) 用のデンプンを直接加水分解するのにも有効であり得る。

20

30

40

【0027】

1. 用語の定義及び略語

この発明を実施するための形態に従い、以下の略語及び定義を適用する。単数形「a」「an」及び「the」は、内容が明らかに他の事を指示していない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば「酵素」という場合には、複数のこうした酵素が含まれ、「添加量」という場合には、当業者には周知の 1 つ以上の添加量及びその等価物などが含まれる。

【0028】

特に定義されない限りは、本明細書で使用する技術用語及び科学用語はいずれも、当業

50

者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。以下の用語を下記に示す。

【0029】

1. 1. 略語及び頭字語

以下の略語／頭字語は、特に指示がない限り、以下の意味を有する。

【0030】

【表1-1】

ABTS	2, 2-アジノービス-3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸	
AcAmy1	アスペルギルス・クラバタス (<i>Aspergillus clavatus</i>) の α アミラーゼ	
AE	アルコールエトキシレート	
AEO	アルコールエトキシレート	
AEOS	アルコールエトキシ硫酸塩	10
AES	アルコールエトキシ硫酸塩	
AfGA	アスペルギルス・フミガタス (<i>Aspergillus fumigatus</i>) のグルコアミラーゼ	
AfGA1	アスペルギルス・フミガタス (<i>Aspergillus fumigatus</i>) のグルコアミラーゼ1	
AfGA2	アスペルギルス・フミガタス (<i>Aspergillus fumigatus</i>) のグルコアミラーゼ2	
AfGATR	トリコデルマ・レーシ (<i>Trichoderma reesei</i>) において発現される、アスペルギルス・フミガタス (<i>Aspergillus fumigatus</i>) のグルコアミラーゼ	
AfGA1TR	トリコデルマ・レーシ (<i>Trichoderma reesei</i>) において発現される、アスペルギルス・フミガタス (<i>Aspergillus fumigatus</i>) のグルコアミラーゼ1	
AfGA2TR	トリコデルマ・レーシ (<i>Trichoderma reesei</i>) において発現される、アスペルギルス・フミガタス (<i>Aspergillus fumigatus</i>) のグルコアミラーゼ2	
AkAA	アスペルギルス・カワチイ (<i>Aspergillus kawachii</i>) の α アミラーゼ	20
AnGA	アスペルギルス・ニガー (<i>Aspergillus niger</i>) のグルコアミラーゼ	
AOS	α -オレフィンスルホン酸塩	
AS	アルキル硫酸塩	
cDNA	相補的DNA	
CMC	カルボキシメチルセルロース	
DE	デキストロース当量	
DNA	デオキシリボ核酸	
DPn	サブユニットnを有する糖重合度	
ds又はDS	乾燥固形分	
DTMPA	ジエチレントリアミンペンタ酢酸	
EC	酵素委員会	
EDTA	エチレンジアミン四酢酸	30
EO	エチレンオキシド (ポリマー断片)	
EOF	発酵終了	
FGSC	真菌遺伝子保管管理センター (Fungal Genetics Stock Center)	
GA	グルコアミラーゼ	
GAU/g(ds)	グルコアミラーゼ活性ユニット／乾燥固形分重量 (g)	
HFCS	高フルクトースコーンシロップ	
HgGA	フミコーラ・グリセア (<i>Humicola grisea</i>) のグルコアミラーゼ	
HS	高糖 (higher sugar)	
IPTG	イソプロピル β -D-チオガラクトシド	
IRS	不溶性残留デンプン	
kDa	キロダルトン	40
LAS	直鎖状アルキルベンゼンスルホン酸塩	
MW	分子量	
MWU	改良ウォルゲムス単位 (1.6×10^{-5} mg/MWU = 活性単位)	
NCBI	国立生物工学情報センター	
NOBS	ノナノイルオキシベンゼンスルホン酸	
NTA	ニトリロ酢酸	

【0031】

【表 1 - 2】

(上記表の続き)

OxAm	Purastar HPAM 5000L (Danisco US Inc.)	
PAHBAH	p-ヒドロキシ安息香酸ヒドラジド	
PEG	ポリエチレングリコール	
pI	等電点	
ppm	百万分率	
PVA	ポリ(ビニルアルコール)	
PVP	ポリ(ビニルピロリドン)	
RNA	リボ核酸	
SAS	アルカンスルホン酸塩	10
SDS-PAGE	ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動	
SSF	同時糖化発酵	
SSU/g 固形分	可溶性デンプン単位/乾燥固形分(g)	
sp.	種	
TAED	テトラアセチルエチレンジアミン	
TrGA	トリコデルマ・レーシ (Trichoderma reesei) のグルコアミラーゼ	
w/v	重量/体積	
w/w	重量/重量	
v/v	体積/体積	
wt%	重量パーセント	
°C	セ氏温度	20
H ₂ O	水	
dH ₂ O 又は DI	脱イオン水	
dIH ₂ O	脱イオン水、ミリQ濾過	
g 又は gm	グラム	
μg	マイクログラム	
mg	ミリグラム	
kg	キログラム	
μL 及び μl	マイクロリットル;	
mL 及び ml	ミリリットル;	
mm	ミリメートル	
μm	マイクロメートル	30
M	モル濃度	
mM	ミリモル濃度	
μM	マイクロモル濃度	
U	ユニット	
sec	秒	
min	分	
hr	時間	
DO	溶存酸素	
Ncm	ニュートンセンチメートル	
ETOH	エタノール	
eq.	当量	
N	規定度	40

【0032】

1. 2. 用語の定義

用語「アミラーゼ」又は「デンプン分解酵素」は、特に、デンプンの分解を触媒できる酵素を指す。αアミラーゼは、デンプン中の α-D-(1→4) O-グルコシド結合を開裂させる加水分解酵素である。概して、αアミラーゼ (EC 3. 2. 1. 1; α-D-(1→4)-グルカングルカノヒドロラーゼ) は、デンプン分子内部の α-D-(1→4) O-グルコシド結合をランダムに切断して、(1~4)-α-結合型 D-グルコース単位を3つ以上含有する多糖類を生成するエンド作用型酵素として記述されている。対照的に、βアミラーゼ (EC 3. 2. 1. 2; α-D-(1→4)-グルカンマルト加水分解酵素) などのエキソ作用型のデンプン分解酵素、及びマルトース生成 αアミラーゼ (E

C 3. 2. 1. 133) のような幾つかの製品固有のアミラーゼは、基質の非還元末端から多糖類分子を開裂させる。β アミラーゼ、α グルコシダーゼ (EC 3. 2. 1. 20; α-D-グルコシドグルコヒドロラーゼ)、グルコアミラーゼ (EC 3. 2. 1. 3; α-D-(1→4)-グルカングルコヒドロラーゼ)、並びにマルトテトラオシダーゼ (EC 3. 2. 1. 60) 及びマルトヘキサオシダーゼ (EC 3. 2. 1. 98) のような製品固有のアミラーゼは、特定の長さのマルトオリゴ糖、又は特定のマルトオリゴ糖の濃縮シロップを生成し得る。

【0033】

本明細書において用いられている用語「グルコアミラーゼ」(EC 3. 2. 1. 3) (別名: グルカン 1, 4-α グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ、アミログルコシダーゼ、γ アミラーゼ、リソソーム α グルコシダーゼ、酸マルターゼ、エキソ-1, 4-α グルコシダーゼ、グルコースアミラーゼ、γ-1, 4-グルカングルコヒドロラーゼ、酸マルターゼ、1, 4-α-D-グルカングルコヒドロラーゼ、又は 4-α-D-グルカングルコヒドロラーゼ) は、デンプン並びに関連するオリゴ糖及び多糖の非還元末端からの D-グルコースの放出を触媒する酵素の部類を指す。これらはエキソ作用型の酵素であり、アミロース及びアミロペクチン分子の非還元末端からグルコシル残基を放出する。この酵素は、α-1, 6 及び α-1, 3 結合も加水分解するものの、α-1, 4 結合の場合と比較してその速度はかなり遅い。用語「デンプンの加水分解」は、水分子の付加によるグリコシド結合の開裂を指す。

【0034】

用語「プルラーゼ」(E. C. 3. 2. 1. 41、プルラン 6-グルカノ加水分解酵素) は、アミロペクチン分子中の α-1~6 グルコシド結合を加水分解する能力のある酵素の部類を指す。

【0035】

本明細書において用いられている「酵素ユニット」は、特定条件のアッセイ下で、1 時間あたりに生成される生成物量を指す。例えば、「グルコアミラーゼ活性ユニット」(GAU) は、60℃、pH 4. 2 にて、可溶性デンプン基質 (4% DS) から 1 時間あたり 1 g のグルコースを生成する酵素量として定義される。「可溶性デンプンユニット」(SSU) は、pH 4. 5、50℃ にて、可溶性デンプン基質 (4% DS) から 1 分あたり 1 mg のグルコースを生成する酵素量である。DS は「乾燥固形分」を意味する。

【0036】

本明細書において用いられている「乾燥固形分」含量は、乾燥重量パーセント基準での、スラリーの全固形分を指す。用語「スラリー」は、不溶性固形分を含有する水性混合物を指し、用語「高 ds」は、38% を超える乾燥固形分を含有する水性デンプンスラリーを指す。

【0037】

用語「ブリックス」は、所定の温度で溶液の糖含量を測定するための周知の比重計を指す。ブリックス計は、糖水溶液 100 g あたりに存在するショ糖のグラム数を測定する (総可溶化糖含量)。ブリックス測定の実施には、多くの場合、比重計又は屈折計が用いられる。

【0038】

用語「重合度」(DP) は、既定の糖中の無水-グルコピラノース単位の数 (n) を指す。グルコース及びフルクトースなどの単糖類は、DP 1 の例である。マルトース及びスクロースなどの二糖類は、DP 2 の例である。HS 又は DP 4+ (>DP 3) は、3 を超える重合度を有するポリマーを意味する。用語「DE」つまり「デキストロース当量」は、シロップ中の総炭水化物画分としての、還元糖、即ち、D-グルコースの割合として定義される、還元糖の総濃度に関する工業規格であり、乾燥重量基準での D-グルコースの割合として表される。加水分解されていないデンプン粒の DE は本質的に 0 であり、D-グルコースの DE は 100 である。

【0039】

本明細書において用いられている用語「デンプン」は、アミロース及びアミロペクチンで構成され、化学式 $(C_6H_{10}O_5)_x$ (Xは任意の数字であり得る) を有する、植物の複合多糖炭水化物で構成される任意の材料を指す。この用語には、穀類、草、塊茎及び根などの植物性材料が包含され、より具体的には、小麦、大麦、トウモロコシ、ライ麦、米、ソルガム、糠、キャッサバ、キビ、ジャガイモ、サツマイモ、及びタピオカから得られる材料などが包含される。用語「デンプン」は、粒状デンプンを含む。用語「粒状デンプン」は、未加工の、即ち加熱調理されていないデンプン、例えば、糊化を受けていないデンプンを指す。

【0040】

用語「グルコースシロップ」は、グルコース固形分を含有する水性組成物を指す。グルコースシロップのDEは、少なくとも20である。幾つかの実施形態において、グルコースシロップは、水の含有率が21%以下であり、デキストロースとして計算された還元糖の含有率が25%以上である。グルコースシロップは、少なくとも90%のD-グルコース、おそらく少なくとも95%のD-グルコースを含む。幾つかの実施形態において、用語グルコース及びグルコースシロップは、互換可能に用いられる。

10

【0041】

用語「総糖含量」は、デンプン組成物中に存在する総糖含量を指す。

【0042】

用語「乾燥成分屈折率」(RIDS)は、制御温度下でDE既知のデンプン溶液の屈折率を測定し、次に、トウモロコシ精製業協会(Corn Refiners Association)の重要データ表(the Critical Data Tables)などの適切な相関を利用して、RIを乾燥成分量に変換したもとして定義される。

20

【0043】

用語「接触」は、酵素が基質を最終生成物に転換することができるようにするために、それぞれの酵素をそれぞれの基質に十分に近接させて配置することを指す。当業者に理解されるように、酵素溶液をそれぞれの基質と混ぜると、接触をもたらすことができる。

【0044】

ポリペプチドに関しての用語「野生型」、「親の」、又は「参照」は、1つ以上のアミノ酸位において人工的な置換、挿入、又は欠失を含まない、天然型ポリペプチドを指す。同様に、ポリヌクレオチドに関しての用語「野生型」、「親の」、又は「参照」は、人工的なヌクレオチドの変化を含まない、天然型ポリヌクレオチドを指す。しかしながら、野生型、親の、又は参照ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、天然型ポリヌクレオチドに限定されるわけではなく、野生型、親の、又は参照ポリペプチドをコードする任意のポリヌクレオチドが包含される。更に、本明細書において文脈から明らかとなるように、特定の配列を「野生型」と呼ぶこともあるが、だからといって例中の接頭辞「野生型」が付加されていない他の配列が、野生型ではないことを意味するわけではないことは、理解されるであろう。

30

【0045】

本明細書において、発現レベルに関連して使用される用語「同等の(comparable)」は、別段文脈が明らかに指示していない限り、関心対象の試料の間で20%超のばらつきがないことを指す。

40

【0046】

野生型タンパク質の参照には、成熟型のタンパク質が包含されると解釈される。「成熟」ポリペプチドとは、シグナル配列の欠落したポリペプチド又はその変異体を意味する。例えば、シグナル配列は、ポリペプチドの発現中に切断され得る。成熟AfGA1又はAfGA2は、それぞれ、配列番号1及び配列番号2の位置1~612に及ぶ長さの612個のアミノ酸であり、ここで、位置はN末端から数えられる。野生型AfGA1又はAfGA2のシグナル配列は19アミノ酸長であり、配列番号11に記載の配列を有する。成熟AfGA1、AfGA2、又はその変異体は、異なるタンパク質からとられたシグナル配列を含み得る。成熟タンパク質は、成熟ポリペプチドとシグナル配列ポリペプチドとの

50

融合タンパク質である場合もある。

【0047】

A f G A 1、A f G A 2 又はその変異体の推定「触媒コア」は、配列番号1の残基41～453に及ぶ。アミノ酸残基534～630は、A f G A 1、A f G A 2 又はその変異体の推定「炭水化物結合ドメイン」を構成する。A f G A 1、A f G A 2、又はその変異体の「リンカー」又は「リンカー領域」は、「触媒コア」と「炭水化物結合ドメイン」の間の領域に及ぶ。

【0048】

ポリペプチドに関しての用語「変異体」は、特定の野生型、親の、又は参照ポリペプチドとは異っており、天然に生じる又は人工的なアミノ酸の置換、挿入、又は欠失を1つ以上含むポリペプチドを指す。同様に、ポリヌクレオチドに関しての用語「変異体」は、特定の野生型、親の、又は参照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列において異なるポリヌクレオチドを指す。野生型、親の、若しくは参照ポリペプチド又はポリヌクレオチドの同一性 (identity) は、文脈から明らかとなるであろう。

10

【0049】

グルコアミラーゼのような本酵素の事例において「活性」は、本明細書に記載されているようにして測定され得る酵素活性を指す。

【0050】

対象とする細胞、核酸、タンパク質、又はベクターに関して使用する場合、用語「組み換え型」は、対象が天然の状態から改変を受けていることを意味する。それ故、例えば、組み換え細胞は、細胞の天然（非組み換え）形態の中に見られない遺伝子を発現したり、自然界で見られるものと異なるレベル又は異なる条件下で天然の遺伝子を発現したりする。組み換え核酸は、1つ以上のヌクレオチドが天然の配列とは異っており、かつ／又は異種配列と作動可能に連結されており、例えば、発現ベクターにおいて異種プロモーターと作動可能に連結されている。組み換えタンパク質は、1つ以上のアミノ酸が天然の配列とは異っている、及び／又は異種配列と融合されている可能性がある。A f G A 1、A f G A 2 又はその変異体をコードする核酸を含むベクターは、組み換えベクターである。

20

【0051】

用語「回収される」、「単離される」、及び「分離される」は、自然界で見られる通り天然に関連付けられる少なくとも1つの他の物質又は成分からより分けられた、化合物、タンパク質（ポリペプチド）、細胞、核酸、アミノ酸、又は他の特定の物質若しくは成分（例えば、組み換え宿主細胞から単離されたA f G A T R）を指す。「単離された」A f G A T R 又はその変異体としては、限定されないが、異種宿主細胞（即ち、A. フミガタス (A. fumigatus) ではない宿主細胞）において発現される分泌済みA f G A T R を含有する培養ブロスが挙げられる。

30

【0052】

本明細書において用いられている用語「精製」は、物質（例えば、単離されたポリペプチド又はポリヌクレオチド）が、比較的純粋な状態であること、例えば、少なくとも約90%純粋、少なくとも約95%純粋、少なくとも約98%純粋、又は更には少なくとも約99%純粋であることを指す。

40

【0053】

酵素に関連して、用語「熱安定性」及び「熱安定」は、高温に曝露された後も活性を保有する酵素の能力を指す。アミラーゼ酵素のような酵素の熱安定性は、その T_m で測定でき、ここで、酵素活性の半分は定義済み条件の下で消失する。 T_m は、高温への曝露（即ち、負荷）後の残存グルコアミラーゼ活性を測定することによって計算することもできる。

【0054】

酵素に関連して、「pH範囲」は、酵素が触媒活性を示すpH値の範囲を指す。

【0055】

本明細書において或る酵素に関連して用いられている用語「pH安定の」及び「pH安

50

定性」は、所定の期間（例えば、15分、30分、及び1時間）にわたって、広いpH値の範囲にわたる活性を維持する、その酵素の能力に関する。

【0056】

本明細書において用いられている用語「アミノ酸配列」は、用語「ポリペプチド」、「タンパク質」、及び「ペプチド」と同義であり、互換可能に用いられる。そのようなアミノ酸配列は、活性を呈する場合に「酵素」と呼ばれ得る。アミノ酸残基についての従来の1文字コード又は3文字コードが用いられ、アミノ酸配列は標準のアミノ末端からカルボキシ末端に向かう方向（即ち、N→C）で示される。

【0057】

用語「核酸」には、DNA、RNA、ヘテロ二重鎖、及びポリペプチドをコードすることが可能な合成分子が包含される。核酸は1本鎖であっても又は2本鎖であってもよく、化学修飾されていてもよい。用語「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、互換可能に用いられる。遺伝子コードは縮重性であるため、特定のアミノ酸をコードするのに複数のコドンが用いられ得るものであり、本発明の組成物及び方法には、或る特定のアミノ酸配列をコードする複数のヌクレオチド配列が包含される。特に指示がない限り、核酸配列は5'から3'末端に向かう方向で示される。

10

【0058】

本明細書において用いられている「ハイブリッド形成」は、プロットハイブリッド法及びPCR法の間に生じるものとして、或る1本の核酸鎖が、相補鎖と二本鎖を形成する、即ち、塩基対を生じるプロセスを指す。厳密なハイブリッド形成条件は、次の条件下でのハイブリッド形成により例示される：65℃及び0.1X SSC（ここで、1X SSC = 0.15M NaCl、0.015M Na₃クエン酸塩、pH 7.0）。ハイブリッド形成した核酸二本鎖は、ハイブリッド形成させた核酸の半分が相補鎖との塩基対形成から外れる溶解温度（T_m）により特徴づけられる。二本鎖内でミスマッチしていたヌクレオチドはT_mが低くなる。グルコアミラーゼ変異体をコードする核酸は、配列番号8のヌクレオチドと、その同一の相補鎖との間で形成される二本鎖と比較して、T_mが1℃～3℃以上低い場合がある。

20

【0059】

本明細書において用いられている「合成」分子は、生物により生成されるというよりは、生体外での化学的又は酵素学的合成により生成される。

30

【0060】

本明細書において用いられている、ある細胞に関連して用いられる用語「形質転換される」、「安定形質転換される」、及び「トランスジェニックの」とは、その細胞が、その細胞のゲノムに組み込まれるか、又は複数世代を通して維持されるエピソームとして保有される、天然でない（例えば、異種の）核酸配列を包含することを意味する。

【0061】

核酸配列を細胞内に挿入する状況における用語「導入された」とは、当該技術分野において既知のように「形質移入」、「形質転換」又は「形質導入」を意味する。

【0062】

「宿主株」又は「宿主細胞」は、発現ベクター、ファージ、ウィルス、又は他のDNA構築体、例えば、関心対象（AfGATR又はその変異体）のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドなどを導入された有機体である。例示的な宿主株は、所望のポリペプチドの発現、及び／又は糖類の発酵が可能な微生物細胞（例えば、細菌、糸状菌、及び酵母菌（T.レーシ（T. reesei）など））である。用語「宿主細胞」は、細胞から生成されるプロトプラストを含む。

40

【0063】

ポリヌクレオチド又はタンパク質に関連して用いられる用語「異種の」は、宿主細胞中に天然に存在しない、ポリヌクレオチド又はタンパク質を指す。

【0064】

ポリヌクレオチド又はタンパク質に関連して用いられる用語「内在性の」は、宿主細胞

50

中に天然に存在する、ポリヌクレオチド又はタンパク質を指す。

【0065】

本明細書において用いられている用語「発現」は、ポリペプチドが核酸配列に基づいて生成されるプロセスを指す。このプロセスは、転写と翻訳の両方を含む。

【0066】

「選択マーカー (selective marker又はselectable marker)」は、宿主において発現可能な遺伝子であって、それによって、その遺伝子を保有する宿主細胞の選択を容易にするものを指す。選択マーカーの例としては、抗菌剤 (例えば、ハイグロマイシン、ブレオマイシン、又はクロラムフェニコール)、及び／又は代謝優位性 (宿主細胞に対する栄養上の優位性など) を付与する遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0067】

「ベクター」は、核酸を1つ以上の細胞型に導入するよう設計されたポリヌクレオチド配列を指す。ベクターとしては、クローニングベクター、発現ベクター、シャトルベクター、プラスミド、ファージ粒子、カセット及び同様物などが挙げられる。

【0068】

「発現ベクター」は、所望のポリペプチドをコードする、或るDNA配列を含むDNA構築体であって、そのコード配列が、好適な宿主において、そのDNAの発現に影響を与えることが可能である好適な制御配列に、作動可能に連結されたDNA構築体を指す。そのような制御配列には、転写に作用するプロモーター、転写を調節するための任意選択的なオペレーター配列、mRNA上の適切なリボソーム結合部位をコードしている配列、エンハンサー、並びに転写及び翻訳の終結を調節する配列が包含され得る。

20

【0069】

用語「作動可能に連結された」とは、特定の複数の構成要素が、意図した態様で機能することを可能にする関係 (並置であることが挙げられるが、これに限定されない) にあることを意味する。例えば、コード配列の発現が調節配列の調節下になるよう、調節配列はコード配列に作動可能に連結される。

【0070】

「シグナル配列」は、タンパク質のN末端部分に結合したアミノ酸配列であり、そのタンパク質が細胞外に分泌されるのを促進する。成熟型の細胞外タンパク質には、分泌プロセス中に切断されるシグナル配列は存在しない。

30

【0071】

本明細書において用いられている「生物学的に活性な」は、配列が、酵素活性などの特定の生物活性を有することを指す。

【0072】

本明細書において用いられている「布片」は、染みが付けられた布地などの材料片である。この材料は、例えば、綿、ポリエステル、又は天然繊維と合成繊維との混合物から製造された布地であってよい。布片は、更に、濾紙又はニトロセルロースなどの紙、あるいはセラミック、金属、又はガラスなどの硬質材料片でもあり得る。アミラーゼに関し、染みはデンプン性のものであるものの、血液、乳汁、インク、草類、お茶、ワイン、ハウレンソウ、肉汁、チョコレート、卵、チーズ、クレイ、顔料、油、又はこれらの化合物の混合物を含み得る。

40

【0073】

本明細書において用いられている「小さな見本 (smaller swatch)」は、一穴パンチ装置により切り出された見本部分、若しくは、多穴パンチのパターンが標準的な96ウェルマイクロタイタープレートに合うものである特別製造された96穴パンチ装置により切り出された見本部分であり、又は、該部分は、別のやり方で見本から取り出される。見本は、織物、紙、金属、又はその他の好適な材料であり得る。小さな見本は、24、48、又は96ウェルマイクロタイタープレートのウェルに配置する前又は後のいずれかで付着させた染みを有し得る。小さな見本は、材料の小片に染みを付着させることによって作製することもできる。例えば、小さな見本は、汚れが付いた直径1.59又は0.64cm (

50

5/8”又は0.25”)の布地の切れ端であってもよい。特別製造されるパウチは、96枚の見本を96ウェルプレートの全てのウェルに同時に供給するような方式で設計される。この装置は、同じ96ウェルプレートに単に複数回装填をすることにより1ウェル当たり2枚以上の見本を供給可能である。任意のフォーマットのプレート、例えば、限定するものではないが、24ウェル、48ウェル、及び96ウェルプレートなどに見本を同時に供給するための多穴パンチ装置が考えられる。別の考えられる方法では、被汚染試験プラットフォームは、汚れ物質により被覆されている金属、プラスチック、ガラス、セラミック、又は別の好適な材料から作製されたビーズであり得る。次に、1つ以上の被覆ビーズを、好適な緩衝液及び酵素を含有させた96、48、若しくは24ウェルプレート、又はより大きいフォーマットのウェルに配置する。

10

【0074】

本明細書において、「AfGATRを含む培養細胞物質」又は類似の用語は、成分としてAfGATR又はその変異体を含む細胞可溶化物又は上清（培地を含む）を指す。細胞物質は、AfGATR又はその変異体を生成させる目的で培養により増殖させた異種宿主由来のものであってよい。

【0075】

「配列同一性の割合(%)」は、デフォルトのパラメーターでCLUSTAL Wのアルゴリズムを使用して整列させたときに、或る変異体が、少なくとも特定の割合で、野生型AfGA1又はAfGA2と一致するアミノ酸残基を有することを意味する。Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673~4680を参照されたい。CLUSTAL Wアルゴリズムのデフォルトパラメーターは、次の通りである。

20

【0076】

【表2】

ギャップ開始ペナルティ(Gap opening penalty):	10.0
ギャップ伸長ペナルティ(Gap extension penalty):	0.05
タンパク質重み行列(Protein weight matrix):	BLOSUM系列
DNA重み行列(DNA weight matrix):	IUB
相違配列遅延(Delay divergent sequences)%:	40
ギャップ分離距離(Gap separation distance):	8
DNA遷移重み(DNA transitions weight):	0.50
親水性残基をリスト(List hydrophilic residues):	GPSNDQEKR
負行列を使用(Use negative matrix):	OFF
残基特異的なペナルティの切り替え(Toggle Residue specific penalties):	ON
親水性のペナルティの切り替え(Toggle hydrophilic penalties):	ON
末端ギャップ分離ペナルティの切り替え(Toggle end gap separation penalty):	OFF

30

【0077】

欠失は、参照配列と比較して非同一性である残基として計数される。いずれかの末端に存在する欠失も、含まれる。例えば、配列番号12の成熟AfGA1ポリペプチドのC末端に6つのアミノ酸の欠失を有する変異体は、成熟ポリペプチドに対して99% (606/612同一残基×100、整数に四捨五入)の配列同一性(%)を有することになる。このような変異体は、成熟AfGA1ポリペプチドに対し「少なくとも99%の配列同一性」を有する変異体に包含されることになる。

40

【0078】

「融合」ポリペプチド配列は、2つのポリペプチド配列間のペプチド結合により連結される、即ち、作動可能に連結される。

【0079】

用語「糸状菌」は、Eumycotina亜門の全ての糸状形態を指す。

50

【0080】

句「同時糖化発酵（SSF）」は、エタノール生成微生物などの微生物と、A f G A又はその変異体などの少なくとも1種の酵素が同一のプロセス工程中に存在する、生化学物質の産生プロセスを指す。SSFは、同じ反応容器中で、デンプン基質（粒状、液化、又は可溶化）を糖（グルコースなど）に同時加水分解する工程と、糖を、アルコール、又はその他の生化学物質若しくは生体適合物質に発酵する工程とを包含する。

【0081】

本明細書において用いられている「エタノール生成微生物」は、糖又はオリゴ糖をエタノールに変換する能力を有する微生物を指す。

【0082】

用語「発酵飲料」は、微生物発酵、例えば、細菌及び／又は酵母発酵などの発酵プロセスを含む方法により生産される、任意の飲料を指す。

【0083】

「ビール」はこのような発酵飲料の例であり、用語「ビール」は、デンプンを含有する植物材料の発酵／醸造により生産される任意の発酵糖化液を含むことを意味する。多くの場合、ビールは、麦芽若しくは補助剤、又は麦芽及び補助剤の任意の組み合わせのみから生成される。ビールの例には、フルモルトビール、「ビール純粋令」に従って醸造されたビール、エール、IPA、ラガー、ピター、発泡酒（第二のビール）、第三のビール、ドライビール、ニアビール、ライトビール、低アルコールビール、低カロリービール、ポーター、ボックビール、スタウト、麦芽酒、ノンアルコールビール、ノンアルコール麦芽酒、及び同様が包含されるものの、別の穀草及び麦芽飲料、例えば、果実風味の麦芽飲料（例えばレモン、オレンジ、ライム、又はベリー風味といったシトラス風味の麦芽飲料）、酒風味の麦芽飲料（例えば、ウォッカ、ラム、又はテキーラ風味の麦芽酒）、あるいはコーヒー風味の麦芽飲料（カフェイン風味の麦芽酒）、及び同様物も包含される。

【0084】

用語「麦芽」は、麦芽入り大麦又は小麦などの任意の麦芽入り穀物を指す。

【0085】

用語「補助剤」は、大麦又は小麦麦芽などの麦芽ではない任意のデンプン及び／又は糖含有植物材料を指す。補助剤の例としては、一般的なコーングリッツ、精製コーングリッツ、醸造用粉碎酵母、米、ソルガム、精製コーンデンプン、大麦、大麦デンプン、脱穀された大麦、小麦、小麦スデンプン、炒って加熱処理された穀草、穀草フレーク、ライ麦、オーツ麦、ジャガイモ、タピオカ、キャッサバ及びシロップ（コーンシロップ、サトウキビシロップ、反転型糖シロップ、大麦及び／又は小麦シロップ、並びに同様物）が挙げられる。

【0086】

用語「マッシュ」は、任意のデンプン及び／又は糖含有植物材料、例えば、製粉用穀物（例えば、破碎大麦麦芽、破碎大麦、及び／若しくはその他の補助剤、又はこれらの組み合わせを含む）などの水性スラリーを指し、このスラリーは、水と混合した後に、糖化液及び粕に分離される。

【0087】

用語「糖化液」は、マッシュ中の製粉用穀物の抽出後に放出される未発酵の液体を指す。

【0088】

「ヨウ素陽性デンプン」又は「IPS」は、（1）液化及び糖化後に加水分解されていないアミロース、又は（2）老化したデンプンポリマーを指す。糖化デンプン又は糖液をヨウ素により試験したとき、高DPnアミロース又は老化デンプンポリマーはヨウ素と結合し、特徴的な青色をもたらす。したがって、糖蒸留酒は、「ヨウ素陽性糖類」、又は「青色糖類」と呼ばれる。

【0089】

用語「老化デンプン」又は「デンプンの老化」は、デンプンペースト又はゲルに経時的

10

20

30

40

50

に自然に生じる変化を指す。

【0090】

用語「約」は、言及されている値の±15%を指す。

【0091】

2. アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) のグルコアミラーゼ (A f G A 1 及び A f G A 2)

グルコアミラーゼ活性を有する A. フミガタス (*A. fumigatus*) 種由来のポリペプチドである、A f G A 1 又はその変異体を単離及び／又は精製したものが提供されている。グルコアミラーゼは、触媒ドメイン、それに続くリンカー領域、及びそれらのドメインが連結されるデンブリン結合ドメインを含めた、3つの別個の構造ドメインからなる。A f G A 1 ポリペプチドは、配列番号12に示す成熟 A f G A 1 ポリペプチドであり得る。ポリペプチドには、N末端及び／又はC末端にて追加のアミノ酸配列を融合させることもできる。追加のN末端配列は、例えば、配列番号11で示される配列を有し得るシグナルペプチドであってよい。いずれかの末端に融合されているその他のアミノ酸配列としては、タンパク質の標識又は精製に有用な融合パートナーポリペプチドが挙げられる。

10

【0092】

例えば、A f G A 1 前駆体には、下記の配列 (配列番号1) が包含される。

MPRLSYALCALSLGHAAIAAPQLSARATGSLDSWLGTETTVALNGILANIGADGAYAKSAKPGIIIASPS
TSEPDYYYTWTRDAALVTKVLVDLFRNGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSGGLASGGLAEPKYNVDM
TAFTGAWGRPQRDGPALRATALIDFGNWLIDNGYSSYAVNNIWPIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLWEEVNS
MSFFTAVQHRALVEGSTFAKRVGASCSCWCDSPQILCYMQSFWTGSYINANTGGGRSGKDANTVLA
HTFDPEAGCDDTTTFQPCSPRALANHKVYTDSFRSVYAINSGIPQGAAVSAGRYPEDVYYNGNPWFLTTLA
AAEQLYDAIYQWKKGISISITSTSLAFFKDIYSSAAVGTYSSTSTFTDIINAVKTYADGYVSIQAHAM
NNGSLSEQFDKSSGLSLSARDLTWSYAAFLTANMRRNGVVPAPWGAASANSVPSSSCSMGSATGTYSTATA
TSWPSTLTSGSPGSTTTVGTTTSTTSGTAAETACATPTAVAVT**FNEIATTTYGENVYIVGSISELGNWDT**
SKAVALSASKYTSSNNLWYVSVTLPGATTFEYKYIRKESDGSIVWESDPNRSYTVPAACGVSTATENDTW
Q

20

【0093】

グルコアミラーゼ活性を有する A. フミガタス (*A. fumigatus*) 種由来のポリペプチドである、A f G A 1 又はその変異体を単離及び／又は精製したものがまた提供されている。グルコアミラーゼは、触媒ドメイン、それに続くリンカー領域、及びそれらのドメインが連結されるデンブリン結合ドメインを含めた、3つの別個の構造ドメインからなる。A f G A 2 ポリペプチドは、配列番号13に示す成熟 A f G A 2 ポリペプチドであり得る。ポリペプチドには、N末端及び／又はC末端にて追加のアミノ酸配列を融合させることもできる。追加のN末端配列は、例えば、配列番号11で示される配列を有し得るシグナルペプチドであってよい。いずれかの末端にて融合されている他のアミノ酸配列としては、タンパク質の標識又は精製に有用な融合タンパク質ポリペプチドが挙げられる。

30

【0094】

例えば、A f G A 2 前駆体には、下記の配列 (配列番号2) が包含される。

MPRLSYALCALSLGHAAIAAPQLSARATGSLDSWLGTETTVALNGILANIGADGAYAKSAKPGIIIASPS
TSEPDYYYTWTRDAALVTKVLVDLFRNGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSGGLASGGLAEPKYNVDM
TAFTGAWGRPQRDGPALRATALIDFGNWLIDNGYSSYAVNNIWPIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLWEEVNS
MSFFTAVQHRALVEGSTFAKRVGASCSCWCDSPQILCYMQSFWTGSYINANTGGGRSGKDANTVLA
HTFDPEAGCDDTTTFQPCSPRALANHKVYTDSFRSVYAINSGIPQGAAVSAGRYPEDVYYNGNPWFLTTLA
AAEQLYDAIYQWKKGISISITSTSLAFFKDIYSSAAVGTYSSTSTFTDIINAVKTYADGYVSIQAHAM
NNGSLSEQFDKSSGLSLSARDLTWSYAAFLTANMRRNGVVPAPWGAASANSVPSSSCSMGSATGTYSTATA
TSWPSTLTSGSPGSTTTVGTTTSTTSGTATETACATPTAVAVT**FNEIATTTYGENVYIVGSISELGNWDT**
SKAVALSASKYTSSNNLWYVSVTLPGATTFEYKYIRKESDGSIVWESDPNRSYTVPAACGVSTATENDTW
R

40

【0095】

上記のボールド体のアミノ酸は、A f G A 1 及び A f G A 2 の両方に対する C 末端炭水化物結合 (CBM) ドメイン (配列番号7) を構成する。グリコシル化リンカー領域は、

50

CBMドメインを含むN末端の触媒コアに連結する。AfGA1及びAfGA2中のCBMドメインは、 α アミラーゼ、 β アミラーゼ、グルコアミラーゼ、及びシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを含むデンプン分解酵素の多くで見ついている、CBM20ドメインに保存されている。CBM20は、2つのデンプン結合部位1及び2を備える逆平行 β -バレル構造として折りたたまれる。これらの2つの部位は機能的に異なると考えられる、即ち、部位1は、初期デンプン認識部位として作用し得るのに対し、部位2は、デンプンの適切な領域を特異的に認識するのに関与し得る。Sorimachi et al. (1997) 「Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to beta-cyclodextrin,」 Structure 5 (5) : 647~61を参照されたい。

10

【0096】

デンプン結合部位1及び2に保存されるAfGA1及びAfGA2のCBMドメイン中の残基は、以下の配列において数字1及び2でそれぞれ示してある。

```
FNEIATTTYGENVYIVGSISELGNWDTSKAVALSASKYTSSNNLWYVSVTLPGATTFEYKYIRKESDGSII
222222      1      1 1111      2 2222  22
```

VWESDPNRSYTVPAACGVSTATENDTW (配列番号7).

1

【0097】

20

変異体AfGA1又はAfGA2は、配列番号7のCBMドメインの、一部のアミノ酸残基を含んでいてもよいし、又は含んでいなくてもよい。あるいは、変異体は、配列番号7のCBMドメインに対し少なくとも80%、85%、90%、95%、又は98%の配列同一性を有するCBMドメインを含んでもよい。変異体は、異種又は遺伝子操作されたCBM20ドメインを含んでもよい。

【0098】

AfGA又はその変異体は、例えば、リンカー配列の適切なグリコシル化を可能にする、例えば、糸状真菌細胞などの真核宿主細胞で発現させることもできる。

【0099】

AfGA1をコードする代表的なポリヌクレオチドは、配列番号8に示すポリヌクレオチド配列である。AfGA2をコードする代表的なポリヌクレオチドは、配列番号14に示すポリヌクレオチド配列である。(NCBI参照配列NC_007195、A. フミガタスゲノム。) 上記のAfGA1及びAfGA2前駆体配列にイタリックで示してあるポリペプチド配列、MPRLSYALCALSLGHAAIA (配列番号11) は、適切な宿主細胞においてタンパク質が発現されたときに切断される、N末端シグナルペプチドである。

30

【0100】

AfGA1のポリペプチド配列は、AfGA2を含む他の真菌グルコアミラーゼと類似している。例えば、AfGA1が高い配列同一性を有する真菌グルコアミラーゼは、次の通りである。

40

アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) A1163 (配列番号2) (AfGA2) 由来のグリコシル加水分解酵素に対して99%の配列同一性

ネオサートーヤ・フィシェリ (*Neosartorya fisheri*) NRRL 181 (配列番号3) 由来のグリコシル加水分解酵素に対して92%の配列同一性

タラロマイセス・スチピテイタス (*Talaromyces stipitatus*) ATCC 10500 (配列番号4) 由来の推定グルコアミラーゼに対して82%の配列同一性

ペニシリウム・マルネッフェイ (*Penicillium marneffeii*) ATCC 18224 (配列番号5) 由来の推定グルコアミラーゼに対して81%の配列同一性

アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) FGSC A4 (配列番号6) 由来の仮定 (hypothetical) グルコアミラーゼに対して81%の配列同一性

50

配列番号1のA f G A 1の前駆体形態をクエリー配列として用いたB L A S Tアラインメントにより、配列同一性が決定された。A l t s c h u l e t a l . (1 9 9 0) J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 ~ 4 1 0 を参照のこと。配列同一性はまた、任意選択的に酵素の成熟形態を基準とし得る。

【0101】

A f G A 1 ポリペプチドの変異体が提供されている。変異体は、配列番号1の残基1～631のポリペプチドに対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドからなるか、又はこれを含むことができ、その変異体は、配列番号2～6中の1つ以上の対応するアミノ酸の、置換、挿入、又は欠失から選択される、1つ以上のアミノ酸修飾を含む。A f G A 2 ポリペプチドの変異体もまた、提供されている。変異体は、配列番号2の残基1～631のポリペプチドに対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドからなるか、又はこれを含むことができ、その変異体は、配列番号1及び／又は3～6中の1つ以上の対応するアミノ酸の、置換、挿入、又は欠失から選択される、1つ以上のアミノ酸修飾を含む。例えば、配列番号1の残基1～612のポリペプチドに対して、少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドからなる変異体は、配列番号1のA f G A 1 と比較して、1～6個のアミノ酸の置換、挿入、又は欠失を有してもよい。挿入又は欠失は、例えば、ポリペプチドの末端のいずれかにあり得る。あるいは、変異体は、配列番号1又は2の1～631のポリペプチドに対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドからなるポリペプチドを「含む」ことができる。変異体において、追加のアミノ酸残基が、ポリペプチドのいずれかの末端に融合され得る。変異体は、変異体が所与のアミノ酸配列を「含む」又は「これからなる」のいずれかにかかわらず、グリコシル化され得る。

【0102】

A f G A 1 (配列番号1) ; A f G A 2 (配列番号2) ; ネオサートーヤ・フィシェリ (Neosartorya fisheri) N R R L 1 8 1 (配列番号3) 由来のグルコアミラーゼ ; タラロマイセス・スチピテイタス (Talaromyces stipitatus) A T C C 1 0 5 0 0 (配列番号4) 由来のグルコアミラーゼ ; ペニシリウム・マルネッフェイ (Penicillium marneffei) A T C C 1 8 2 2 4 (配列番号5) 由来のグルコアミラーゼ ; 及びグルコアミラーゼアスペルギルス・ニデュランス (Aspergillus nidulans) F G S C A 4 (配列番号6) 間のC l u s t a l Wによるアラインメントが、図1に示してある。Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673～4680を参照のこと。原則として、関連するタンパク質配列のアラインメントにおいてアミノ酸が保存されている度合いは、タンパク質機能に対するそのアミノ酸位置の相対的重要性に比例する。つまり、関連する配列の全てに共通するアミノ酸は、重要な機能的役割を果たしている傾向があり、容易に置換され得ない。同様に、配列間で異なる位置は、タンパク質の活性は維持したままその他のアミノ酸により置換され得るか、あるいは別様に修飾され得る傾向がある。

【0103】

図1に示すアラインメントは、例えば、グルコアミラーゼ活性を有する変異体A f G A ポリペプチドを構築するうえでの手引きとなり得る。配列番号1のA f G A 1 ポリペプチドの変異体としては、限定されないが、配列番号2 (A f G A 2) 、 3、 4、 5、 及び6からなる群から選択されるポリペプチド中の対応するアミノ酸の置換、挿入、又は欠失から選択されるアミノ酸修飾を有するものが挙げられる。配列番号1のA f G A 1、及び配列番号2、 3、 4、 5及び6のグルコアミラーゼにおける位置間の一致は、図1に示すアラインメントを参照することで値付けされる。例えば、図1のアラインメントを参照すると、変異体A f G A 1 ポリペプチドは置換D 2 3 Nを有することができ、この場合、A s nは、配列番号6中の対応するアミノ酸である。変異体A f G A 1 ポリペプチドとしては

また、1、2、3、又は4つの、ランダムに選択されるアミノ酸修飾を有するものも挙げられるが、これらに限定されない。アミノ酸の修飾は、オリゴヌクレオチド指定突然変異導入法などの周知の方法を使用してなすことができる。同様に、配列番号2のA f G A 2ポリペプチドの変異体としては、限定されないが、配列番号1 (A f G A 1)、3、4、5、及び6からなる群から選択されるポリペプチド中の対応するアミノ酸の置換、挿入、又は欠失から選択されるアミノ酸修飾を有するものが挙げられる。

【0104】

A f G A 1ポリペプチド又はその変異体をコードする核酸もまた、提供される。A f G A 1をコードする核酸はゲノムDNAであり得る。あるいは、核酸は、配列番号8を含むcDNAであり得る。同様に、A f G A 2ポリペプチド又はその変異体をコードする核酸もまた、提供されている。A f G A 2をコードする核酸もまた、ゲノムDNAであり得る。あるいは、核酸は、配列番号14を含むcDNAであり得る。当業者には良好に理解される通り、遺伝子コードは縮重し、即ち、場合によっては複数のコドンが同一のアミノ酸をコードし得る。核酸としては、A f G A 1、A f G A 2又はその変異体をコードする、全てのゲノムDNA、mRNA、及びcDNA配列が挙げられる。

【0105】

A f G A 1、A f G A 2又はその変異体は「前駆体」、「未熟」又は「全長」（この場合、A f G A 1、A f G A 2又はその変異体は、シグナル配列を含む）であってもよいし、又は「成熟」（この場合、シグナル配列を欠く）していてもよい。グルコアミラーゼ変異体はまた、得られるポリペプチドがグルコアミラーゼ活性を保持する限りは、N又はC末端で切断されていてもよい。

【0106】

2. 1. A f G A 変異体の特徴

変異体A f G Aポリペプチドは、グルコアミラーゼ活性を保持し、野生型A f G Aポリペプチドよりも高い又は低い比活性を有し得る。A f G A変異体の特徴としては、ほかにも、例えば、安定性、pH範囲、温度プロファイル、酸化安定性、及び熱安定性が挙げられる。例えば、変異体は、24～60時間のpH安定性が、pH 3～約pH 8、例えば、pH 3.0～7.8、例えば、pH 3.0～7.5、pH 3.5～7.0、pH 4.0～6.7、又はpH 5.0であり得る。A f G A変異体は、野生型A f G Aの性能特徴を保ちつつ野生型A f G Aよりも高レベルで発現させることができる。A f G A変異体はまた、親グルコアミラーゼと比べて異なる酸化安定性を有し得る。例えば、酸化安定性の低下は、デンプン液化用組成物において好都合なものであり得る。変異体A f G Aは、野生型グルコアミラーゼと比較して温度プロファイルが異なり得る。そのようなA f G A変異体は、焼成、又は高温が必要とされるその他のプロセスで使用するのに好都合である。発現及び酵素活性レベルは、以降に開示されるものを含む、当業者に既知の標準アッセイ法を使用して評価することができる。

【0107】

3. A f G A 及びその変異体の生成

A f G A又はその変異体は、例えば、宿主細胞からA f G A又はその変異体を分泌させることにより、宿主細胞から単離され得る。A f G A又はその変異体を含む培養細胞物質は、宿主細胞からのA f G A又はその変異体の分泌の後に、得ることができる。A f G A又はその変異体は、使用に先立って任意選択的に精製される。A f G A遺伝子は、当該技術分野において周知の方法に従ってクローニングかつ発現され得る。好適な宿主細胞としては、細菌、植物、又は酵母菌細胞、例えば、糸状性真菌細胞が挙げられる。特に有用な宿主細胞としては、トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) が挙げられる。トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞は、天然に発現されるA f G Aアスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) より高いレベル又は少なくとも同等のレベルにてA f G A T Rを発現する。

【0108】

幾つかの実施形態において、A f G Aは、宿主において少なくとも10 g / リットルに

10

20

30

40

50

て非相同的に発現される。幾つかの実施形態において、A f G Aは、少なくとも15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、又は110 g／リットルにて非相同的に発現される。幾つかの実施形態において、A f G Aはトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主において非相同的に発現され、該発現は少なくとも15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、又は110 g／リットルである。幾つかの実施形態において、A f G Aはアスペルギルス宿主において非相同的に発現され、該発現は少なくとも15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、又は110 g／リットルである。

【0109】

宿主細胞は、同種又は異種アミラーゼ、即ち、宿主細胞と同一の種のものではないアミラーゼ、又は1種以上の他の酵素をコードする核酸を更に発現し得る。アミラーゼは変異体アミラーゼであり得る。加えて、宿主は1種以上のアクセサリー酵素、タンパク質、ペプチドを発現し得る。これらは、液化、糖化、発酵、SSFなどのプロセスに有益であり得る。なお、宿主細胞は、炭素原材料(類)の消化に用いられる酵素に加えて、生化学物質を生成し得る。このような宿主細胞は、酵素を加える必要性を低減又は排除するため、発酵又は同時糖化発酵プロセスに有用であり得る。

【0110】

3. 1. ベクター

A f G A又はその変異体をコードする核酸を含むDNA構築体を構築して、宿主細胞で発現させることができる。A f G A 1をコードする代表的な核酸としては配列番号8が挙げられる。A f G A 2をコードする代表的な核酸としては配列番号14が挙げられる。遺伝子暗号において周知の縮重により、同一のアミノ酸配列をコードする変異体ポリペプチドを常用の手法により設計及び作成することができる。特定の宿主細胞のコドンの使用を最適化することも、当業界では周知である。A f G A又はその変異体をコードする核酸を、ベクターに組み込むことができる。以下に記載のものなどの周知の形質転換法を使用し、ベクターを宿主細胞に移入させることができる。

【0111】

ベクターは、宿主細胞中に形質変換させ、細胞内で複製させることのできる任意のベクターであり得る。例えば、A f G A又はその変異体をコードする核酸を含むベクターを形質転換させ、ベクターを増殖及び増幅する手法として細菌宿主細胞において複製させることができる。コードする核酸が、機能性のA f G A又はその変異体として発現され得るよう、ベクターを発現宿主中に形質変換させることもできる。発現宿主として提供される宿主細胞としては、例えば、糸状真菌を挙げることができる。真菌遺伝子保管管理センター(FGSC)の株カタログには、真菌宿主細胞における発現に好適なベクターが掲載されている。FGSC、株カタログ、ミズーリ大学、www.fgsc.net (最新改訂版2007年1月17日)を参照されたい。代表的なベクターとしては、pJG222 (Trex3gM-A f G A 1) (図2) 及びpJG313 (Trex3gM-A f G A 2) (図10) が挙げられ、それらの各ベクターは、pTrex3gM発現ベクター(米国特許出願公開第2011/0136197 A1号)を含み、真菌宿主中のcbh1プロモーターの制御下にて、A f G Aをコードする核酸の発現を可能にしている。両方のpJG222及びpJG313は、A f G A変異体をコードする核酸を含み、かつ発現するように、通例の技術を用いて改変できる。

【0112】

A f G A又はその変異体をコードする核酸は、好適なプロモーターに作動可能に連結し得、このプロモーターにより、宿主細胞における転写が可能となる。プロモーターは、最適な宿主細胞中で転写活性を示す任意のDNA配列であってよく、宿主細胞にとって同種又は異種のいずれかであるタンパク質をコードしている遺伝子に由来し得る。真菌宿主における転写の際に有用なプロモーターの例としては、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) のTAKAアミラーゼ、リゾムコール・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) の

10

20

30

40

50

アスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) の中性 α アミラーゼ、*A. niger* の酸安定性 α アミラーゼ、*A. niger* のグルコアミラーゼ、リゾムコール・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) のリパーゼ、*A. oryzae* のアルカリプロテアーゼ、*A. oryzae* のトリオースリン酸異性化酵素、又は *A. nidulans* のアセトアミダーゼをコードする遺伝子に由来するものが挙げられる。*A f G A* 又はその変異体をコードする遺伝子が、大腸菌 (*E. coli*) などの細菌種で発現されるとき、好適なプロモーターは、例えば、T7プロモーター及びファージ λ プロモーターを含むバクテリオファージプロモーターから選択され得る。酵母種の発現に好適なプロモーターの例としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の *G a l 1* 及び *G a l 1 0* プロモーター及びピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) *A O X 1* 又は *A O X 2* プロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。例えば、図2に記載の *p J G 2 2 2* ベクターは、*A f G A 1* に作動可能に連結された *c b h 1* プロモーターを含有する。図10に示す *p J G 3 1 3* ベクターは、*A f G A 2* に作動可能に結合された *c b h 1* プロモーターを含む。*c b h 1* は、*T. reesei* 由来の内在する誘導性プロモーターである。*Liu et al.* (2008) 「Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (*c b h 1*) promoter optimization,」 *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)* 40 (2) : 158 ~ 65 を参照のこと。

【0113】

コード配列はシグナル配列に作動可能に連結され得る。シグナル配列をコードする DNA は、発現対象の *A f G A* 遺伝子に対して自然に関連付けられている DNA 配列であり得る。例えば、DNA は、*A f G A* 又はその変異体をコードする核酸に作動可能に結合された配列番号 11 の *A f G A 1* 及び *A f G A 2* シグナル配列をコードし得る。DNA は、*A. fumigatus* 以外の種に由来するシグナル配列をコードする。DNA 構築体又はベクターを含むシグナル配列及びプロモーター配列は、真菌宿主細胞に導入することができ、同じ源に由来するものであってもよい。例えば、シグナル配列は、*c b h 1* プロモーターに作動可能に連結された *c b h 1* シグナル配列である。

【0114】

発現ベクターはまた、好適な転写終結配列、及び真核細胞においては、*A f G A* 又はその変異体をコードする DNA 配列に作動可能に結合されたポリアデニル化配列も含み得る。転写終結及びポリアデニル化配列は、プロモーターと同じ源から好適に由来し得る。

【0115】

ベクターには、宿主細胞におけるベクターの複製を可能にする DNA 配列を更に含有させることもできる。このような配列例としては、プラスミド *p U C 1 9*、*p A C Y C 1 7 7*、*p U B 1 1 0*、*p E 1 9 4*、*p A M B 1* 及び *p I J 7 0 2* の複製起点が挙げられる。

【0116】

ベクターには、選択マーカー、例えば、バチルス・スブチリス (*B. subtilis*) 又はバチルス・リケニフォルミス (*B. licheniformis*) 由来の *d a l* 遺伝子、あるいは例えば、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、又はテトラサイクリン耐性などの抗生物質耐性を付与する遺伝子などの、単離宿主細胞における欠損を補填する産物の遺伝子を含ませてもよい。更に、ベクターは、アスペルギルス (*Aspergillus*) 選択マーカー、例えば、*a m d S*、*a r g B*、*n i a D* 及び *s C*、即ち、ヒグロマイシン耐性を生じるマーカーを含んでいてもよく、又は選択は、当該技術分野において既知のものなどの同時形質転換によって達成され得る。例えば、国際公開第 91/17243 号を参照されたい。

【0117】

細胞内発現は幾つかの態様、例えば、特定の細菌又は真菌を宿主細胞として使用して、多量の *A f G A* 又はその変異体を生産させ、その後精製する場合に、有利であり得る。また、培養培地への *A f G A* 又はその変異体の細胞外分泌を使用して、単離された *A f G A*

又はその変異体を含む培養細胞物質を製造することもできる。

【0118】

発現ベクターは、典型的には、例えば、選択された宿主生物においてベクターの自律複製を可能にするエレメント、及び選択目的で1つ以上の表現型で検出可能なマーカーなどの、クローニングベクター成分を含む。発現ベクターは、通常、プロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位、翻訳開始シグナル及び場合により、リプレッサー遺伝子又は1つ以上の活性化遺伝子などの調節ヌクレオチド配列を含む。加えて、発現ベクターには、A f G A 又はその変異体に、宿主細胞の細胞小器官（ペルオキシソームなど）、又は特定の宿主細胞区画を標的とさせ得るアミノ酸配列をコードする配列を含ませることができる。そのような標的配列としては、限定されないが、既知のペルオキシソーム標的シグナルである配列セリンーリジンーロイシン（S K L）が挙げられる。制御配列の指示の下で発現した場合、A f G A 又はその変異体の核酸配列は、発現に関して適切な様式にて、制御配列に作動可能に結合される。

10

【0119】

A f G A 又はその変異体、プロモーター、ターミネーター及び他の因子をコードするDNA構築体をそれぞれリゲートするため、及び複製に必要な情報を包含する好適なベクターにそれらを挿入するために使用される手順は、当業者に広く知られている（例えば、S a m b r o o k e t a l . , M O L E C U L A R C L O N I N G : A L A B O R A T O R Y M A N U A L , 2^{n d} e d . , C o l d S p r i n g H a r b o r , 1989、及び3^{r d} e d . , 2001を参照されたい）。

20

【0120】

3. 2. 宿主細胞の形質転換及び培養

DNA構築体又は発現ベクターのいずれかを含むトリコデルマ・レーシ（*Trichoderma reesei*）宿主細胞は、A f G A T R 又はその変異体の組み換え生産において、宿主細胞として好都合に使用される。細胞は、宿主染色体にDNA構築体（1つ以上のコピー）を都合よく組み込むことにより、酵素をコードするDNA構築体で形質転換することができる。DNA配列がより安定的に細胞に維持される傾向があることから、この組み込みは一般的に有利なものと考えられる。DNA構築体の宿主染色体への組み込みは、例えば、同種又は異種組み換え法によるものなどの従来法により実施することができる。あるいは、細胞は、異なる種類の宿主細胞に関連して上記される通りに発現ベクターにより形質転換させることができる。

30

【0121】

形質転換させる発現ベクターにより遺伝子の欠損が補填され得る場合、発現宿主から遺伝子を欠失させることも有利である。不活性化された遺伝子を1つ以上有する真菌宿主細胞を得るにあたり既知の方法を使用することができる。遺伝子の不活性化は、完全な又は部分的な欠失により、挿入による不活性化により、又は遺伝子が機能性タンパク質の発現を阻害されるように意図される目的のために遺伝子を非機能的にする任意の他の手段により、実行できる。クローニングされているトリコデルマ種（*Trichoderma* sp.）、又はその他の糸状菌宿主に由来する任意の遺伝子、例えば、c b h 1、c b h 2、e g l 1、及びe g l 2 遺伝子を欠失させることができる。遺伝子の欠失は、不活性化させることが所望される遺伝子の形態を、当該技術分野において既知の方法によりプラスミドに挿入することで実行できる。

40

【0122】

宿主細胞へのDNA構築体又はベクターの導入には、形質転換、電気穿孔法、核微量注入法、形質導入、トランスフェクション、例えば、リポフェクションを介した及びD E A E -デキストリンを介したトランスフェクション、リン酸カルシウムDNA沈殿を用いたインキュベーション、DNAコーティングされた微粒子銃による高速導入、及びプロトプラスト融合といった技術が含まれる。一般的な形質転換法が当該技術分野において既知である。例えば、上掲のS a m b r o o k e t a l . (2001)を参照されたい。トリコデルマ（*Trichoderma*）における異種タンパク質の発現が、例えば、米国特許第6、

50

022, 725号に記載されている。同様に、アスペルギルス (*Aspergillus*) 株の形質転換に関しては、Cao et al. (2000) *Science* 9:991~1001も参照される。遺伝的に安定な形質転換体をベクター系で構築することで、AfGA又はその変異体をコードする核酸を宿主細胞染色体に安定的に組み込むことができる。その後、形質転換体は、既知の手法により選別され、精製される。

【0123】

形質転換のためのトリコデルマ種 (*Trichoderma* sp.) の調製は、例えば、菌類の菌糸からのプロトプラスト調製を包含し得る。Campbell et al. (1989) *Curr. Genet.* 16:53~56を参照のこと。菌糸は、出芽させた栄養胞子から得ることができる。細胞壁を消化する酵素により菌糸を処理することで、プロトプラストが得られる。懸濁培地に浸透圧安定剤を存在させることでプロトプラストを保護する。これらの安定剤としては、ソルビトール、マンニトール、塩化カリウム、硫酸マグネシウム及び同様が挙げられる。通常、これらの安定剤の濃度は、0.8M~1.2Mの間の様々な値を取り、例えば、1.2Mのソルビトール溶液を、懸濁培地において使用することができる。

10

【0124】

宿主トリコデルマ種 (*Trichoderma* sp.) 株へのDNA取り込みはカルシウムイオン濃度に依存する。一般的に、約10~50mMのCaCl₂が取り込み用溶液に使用される。更に好適な化合物としては、TE緩衝液 (10mM Tris (pH 7.4); 1mM EDTA) 又は10mM MOPS (pH 6.0) 及びポリエチレングリコールなどの緩衝系が挙げられる。ポリエチレングリコールは細胞膜を融合させ、培地の内容物をトリコデルマ種 (*Trichoderma* sp.) 株の細胞質へ送達するものと考えられる。この融合は、宿主の染色体に組み込まれたプラスミドDNAの複数のコピーを高頻度に残すことになる。

20

【0125】

通常、トリコデルマ種 (*Trichoderma* sp.) の形質転換では、典型的には密度 $10^5 \sim 10^7$ /mL、特に 2×10^6 /mLにて浸透性処理を受けたプロトプラスト又は細胞を使用する。適切な溶液 (例えば、1.2Mのソルビトール及び50mMのCaCl₂) 中の、これらのプロトプラスト又は細胞を、100μLの体積にて、所望のDNAと混合させてよい。概して、高濃度のPEGが取り込み用溶液に加えられる。0.1~1容量の25% PEG 4000をプロトプラスト懸濁液に加えることができるものの、約0.25容量をプロトプラスト懸濁液に加えることが有用である。ジメチルスルホキシド、ヘパリン、スペルミジン、塩化カリウム、及び同様物などの添加剤を取り込み用溶液に加えて、形質転換を促進させることもできる。同様の手順が他の真菌宿主細胞についても利用可能である。例えば、米国特許第6,022,725号を参照のこと。

30

【0126】

3.3. 発現

AfGATR又はその変異体の生産方法は、酵素の生成を促す条件下で上述したようにトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞を培養することと、細胞及び/又は培養培地から酵素を回収することと、を含み得る。トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞は、天然に発現されるAfGAアスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) より高いレベル又は少なくとも同等のレベルにてAfGATRを発現する。

40

【0127】

細胞の培養に使用される培地は、対象とする宿主細胞を増殖させ、AfGATR又はその変異体の発現を得るのに好適な任意の従来培地であり得る。好適な培地及び培地成分は市販元から入手可能であり、あるいは公開されている処方に従って調製することもできる (例えば、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関のカatalogに記載の通り)。

【0128】

宿主細胞から分泌される酵素は全ブロス製剤で使用する事ができる。本方法において

50

、組み換え微生物の馴化全発酵ブロス (spent whole fermentation broth) の調製は、グルコアミラーゼの発現が得られる、当該技術分野において既知の任意の培養法を使用して実施され得る。それ故、発酵には、グルコアミラーゼの発現又は単離を可能とする好適な培地中及び条件下で行われる、フラスコ振盪培養法、実験用又は工業用発酵槽中での小規模又は大規模発酵 (連続発酵、バッチ発酵、流加発酵、又は固相発酵などを含む) が含まれると理解することができる。本明細書において定義されている用語「馴化全発酵ブロス」は、培養培地、細胞外タンパク質 (例えば、酵素)、及び細胞バイオマスを含む、発酵材料の未分画成分として定義される。用語「馴化全発酵ブロス」には、当該技術分野において周知の方法を用いて可溶化又は透過処理された細胞バイオマスが包含されることも理解される。

10

【0129】

宿主細胞から分泌される酵素は、周知の手順により、培養培地から簡便に回収されてよく、周知の手順としては、遠心分離又は濾過による培地からの細胞の分離、及び硫酸アンモニウムのような塩を用いた培地のタンパク質成分の沈殿に続いて、クロマトグラフィ法 (イオン交換クロマトグラフィ、親和性クロマトグラフィなど) を使用することによって分離することなどが挙げられる。

【0130】

ベクターにおいて、A f G A 又はその変異体をコードするポリヌクレオチドは、宿主細胞によるコード配列の発現をもたらす得るよう、制御配列に作動可能に連結させることができ、即ち、ベクターは発現ベクターである。調節配列は、例えば、調節配列により命令される転写レベルが、転写性モジュレーターに対して更に応答的になるよう、更なる転写調節エレメントを付加することにより改変することもできる。調節配列は、特に、プロモーターを含み得る。

20

【0131】

宿主細胞は、A f G A T R 又はその変異体の発現を可能にする好適な条件下で培養され得る。酵素の発現は、持続的に生成される常時発現型、あるいは発現を開始するための刺激を必要とする誘導型であり得る。誘導発現の場合、タンパク質産生は、必要とされたときに、例えば、培養培地に誘導物質、例えば、デキサメタゾン又は I P T G 又はセファロース (Sepharese) を加えることにより開始することができる。ポリペプチドは、T N T (商標) (P r o m e g a) ウサギ網状赤血球系などの生体外無細胞系で、組み換えにより産生させることもできる。

30

【0132】

発現宿主は、好氣的条件下で、宿主に適切な培地において培養することもできる。宿主の要求と所望される A f G A T R 又はその変異体の産生とに応じて、振盪、又は攪拌と通気との併用を実施することができ、宿主に適切な温度、例えば、約 25℃～約 78℃ (例えば、30℃～45℃) で生成が行われる。培養は、約 12～約 100 時間又はそれ以上実施することができる (及び、例えば、24～72 時間の間の任意の時間数)。典型的には、培養ブ罗斯は、同様に A f G A T R 又はその変異体の産生に関連する宿主に必要とされる培養条件に応じて、pH 約 4.0～約 8.0 である。

【0133】

3. 4. A f G A T R 活性の同定

宿主細胞における A f G A T R 又はその変異体の発現を評価するために、アッセイを行うことで、発現タンパク質、対応する m R N A、又はグルコアミラーゼ活性を測定することができる。例えば、好適なアッセイとしては、適切に標識されたハイブリダイゼーションプローブを使用するノザンブロット、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、及びインサイツハイブリダイゼーションが挙げられる。また、好適なアッセイとしては、例えば、培養培地のグルコースなどの還元糖を直接測定するアッセイによって試料中の A f G A T R 活性を測定することなどが挙げられる。例えば、グルコース濃度は、グルコース試薬キット番号 15-U V (S i g m a C h e m i c a l C o.) 又は、T e c h n i c o n A u t o a n a l y z e r などの装置を使用して測定することもできる。グルコアミラーゼ活

40

50

性はまた、下に記載する P A H B A H アッセイ又は A B T S アッセイなどの任意の公知の方法で測定され得る。

【0134】

3. 5. A f G A T R 及びその変異体の精製方法

発酵、分離、及び濃縮法は当該技術分野において周知であり、濃縮 A f G A T R 又はグルコアミラーゼ変異体ポリペプチド含有溶液を調製するために都合のよい手法を使用することができる。

【0135】

アミラーゼ溶液を得る目的で、発酵後に発酵ブロスを得て、残存する未加工の発酵材料を含む、微生物細胞及び各種懸濁固体が従来の分離手法により除去される。濾過、遠心分離、精密濾過、回転真空ドラム濾過、限外濾過、遠心分離後限外濾過、抽出、又はクロマトグラフィなどが一般的に使用される。

10

【0136】

回収率を最適化するためには、A f G A T R 又はグルコアミラーゼ変異体ポリペプチド含有溶液の濃縮が望ましい。未濃縮の溶液を使用するためには、精製酵素沈殿物を回収するためにインキュベーション時間を延長させる必要のある場合もある。

【0137】

酵素含有溶液は、従来の濃縮法を使用し、所望の酵素濃度が得られるまで濃縮する。酵素含有溶液の濃縮は、本願で記載の任意の手法により実施され得る。精製法の例としては、回転真空濾過及び／又は限外濾過が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0138】

酵素溶液は、濃縮 A f G A T R 又はグルコアミラーゼ変異体ポリペプチド含有溶液の酵素活性が所望の濃度になるまで濃縮して濃縮酵素溶液とする。

【0139】

濃縮は、例えば、金属ハロゲン化物沈殿剤などの沈殿剤を使用して実施してもよい。金属ハロゲン化物沈殿剤としては、アルカリ金属塩化物、アルカリ金属臭化物、及び2種類以上のこれらの金属ハロゲン化物の配合物が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な金属ハロゲン化物としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、臭化ナトリウム、臭化カリウム、及びこれらの金属ハロゲン化物のうちの2種以上の配合物が挙げられる。金属ハロゲン化物沈殿剤、塩化ナトリウムも保存料として使用できる。

30

【0140】

金属ハロゲン化物沈殿剤は、A f G A T R 又はその変異体を沈殿させるのに有効な量で使用される。酵素の沈殿をもたらすのに少なくとも有効な量及び最適な量の金属ハロゲン化物の選択、並びにインキュベーション時間、pH、温度及び酵素濃度を含む、回収率を最大にするための沈殿条件は、所定の試験後に当業者には容易に明らかとなろう。

【0141】

一般的に、少なくとも約5% w/v (重量/体積) ~ 約25% w/v の金属ハロゲン化物を濃縮酵素溶液に加え、通常、少なくとも8% w/v を加える。一般的に、約25% w/v 以下の金属ハロゲン化物を濃縮酵素溶液に加え、通常、約20% w/v 以下を加える。金属ハロゲン化物沈殿剤の最適濃度は、とりわけ、特異的 A f G A T R 又はグルコアミラーゼ変異体ポリペプチドの性質、及び濃縮酵素溶液中での A f G A T R 又はグルコアミラーゼ変異体ポリペプチドの濃度に依存するであろう。

40

【0142】

酵素を沈殿させる別の代替法は、有機化合物を使用するものである。有機化合物沈殿剤の例としては、4-ヒドロキシ安息香酸、4-ヒドロキシ安息香酸のアルカリ金属塩、4-ヒドロキシ安息香酸のアルキルエステル、及びこれらの有機化合物のうちの2種以上の配合物が挙げられる。該有機化合物沈殿剤の添加は、金属ハロゲン化物沈殿剤の添加に先立って、それと同時に、又はその後に行ってもよく、両沈殿剤（有機化合物及び金属ハロゲン化物）の添加は、順番に又は同時に行われてもよい。

【0143】

50

一般的に、有機沈殿剤は、4-ヒドロキシ安息香酸のアルカリ金属塩（ナトリウム又はカリウム塩など）、及び4-ヒドロキシ安息香酸の線状又は分岐状アルキルエステル、及びこれらの有機化合物のうちの2種以上の配合物からなる群から選択され、ここで、アルキル基は、炭素原子を1～12個含有する。有機化合物沈殿剤は、例えば、4-ヒドロキシ安息香酸の線状又は分岐状アルキルエステル、及びこれらの有機化合物のうちの2種以上の配合物であってよく、ここで、アルキル基は、炭素原子を1～10個含有する。有機化合物の例は、4-ヒドロキシ安息香酸の線状アルキルエステル、及びこれらの有機化合物のうちの2種以上の配合物であり、ここで、アルキル基は、炭素原子を1～6個含有する。4-ヒドロキシ安息香酸のメチルエステル、4-ヒドロキシ安息香酸のプロピルエステル、4-ヒドロキシ安息香酸のブチルエステル、4-ヒドロキシ安息香酸のエチルエステル、及びこれらの有機化合物のうちの2種以上の配合物を使用することもできる。追加の有機化合物としては、4-ヒドロキシ安息香酸メチルエステル（メチルパラベンと名づける）、4-ヒドロキシ安息香酸プロピルエステル（プロピルパラベンと名づける）が挙げられるがこれらに限定されず、この両者はアミラーゼ保存剤である。更なる記載に関しては、例えば、米国特許第5,281,526号を参照されたい。

10

【0144】

有機化合物沈殿剤を添加すると、pH、温度、AfGATR又はグルコアミラーゼ変異体ポリペプチド濃度、沈殿剤濃度、及びインキュベーション時間に関する沈殿条件に、高い柔軟性がもたらされるという利点を得られる。

【0145】

20

有機化合物沈殿剤は、金属ハロゲン化物沈殿剤を用いることによる酵素の沈殿を向上させるのに有効な量で使用する。有機化合物沈殿剤の少なくとも有効な量及び最適な量の選択、並びにインキュベート時間、pH、温度及び酵素濃度を含む、回収率を最大にするための沈殿条件は、業者には、所定の試験後に本願の見地から容易に明らかとなろう。

【0146】

一般的に、少なくとも約0.01% w/vの有機化合物沈殿剤を濃縮酵素溶液に加え、通常、少なくとも約0.02% w/vを加える。一般的に、約0.3% w/v以下の有機化合物沈殿剤を濃縮酵素溶液に加え、通常、約0.2% w/v以下を加える。

【0147】

金属ハロゲン化物沈殿剤及び有機化合物沈殿剤を含有する濃縮ポリペプチド溶液は、精製する酵素に必然的に依存することになるpHに調整することができる。概して、pHは、グルコアミラーゼの等電点付近のレベルに調整される。pHは、等電点（pI）からpH単位が約2.5低いpHから、等電点（pI）からpH単位が約2.5高いpHまでの範囲のpHに調整することができる。

30

【0148】

精製酵素の沈殿を得るのに必要とされるインキュベート時間は、具体的な酵素の性質、酵素濃度、並びに具体的な沈殿剤（1つ又は複数）及びその（それらの）濃度に応じて異なる。一般的に、酵素を沈殿させるのに有効な時間は、約1～約30時間であり、通常、約25時間を超過することはない。有機化合物沈殿剤の存在下では、インキュベーション時間はいっそう短縮され、約10時間未満となり、多くの場合では約6時間になる。

40

【0149】

一般的に、インキュベート中の温度は約4℃～約50℃である。通常、方法は、約10℃～約45℃の温度（例えば、約20℃～約40℃）で実施される。沈殿を誘発する最適温度は、溶液条件、及び使用する酵素又は沈殿剤（1つ又は複数）に従い変化する。

【0150】

精製酵素沈殿物の最終的な回収率、及び実施するプロセスの効率は、酵素を含む溶液を攪拌すること、加える金属ハロゲン化物、及び加える有機化合物により向上される。攪拌工程は、金属ハロゲン化物及び有機化合物を加える間、及び続くインキュベート時間の間の両方を行う。好適な攪拌方法としては、機械的攪拌又は振盪、積極的な通気、あるいは任意の類似の手法が挙げられる。

50

【0151】

インキュベート期間後、続いて、精製酵素は、解離した(dissociated)顔料及びその他の不純物から分離され得ると共に、従来の分離法、例えば濾過、遠心分離、精密濾過、回転真空濾過、限外濾過、加圧濾過、クロス式膜精密濾過、クロスフロー式膜精密濾過、又は同様の方法などにより回収され得る。精製酵素沈殿物の更なる精製は、沈殿物を水で洗浄することにより得ることができる。例えば、精製酵素沈殿物を、金属ハロゲン化物沈殿剤を含有する水、又は金属ハロゲン化物及び有機化合物沈殿剤を含有する水で洗浄する。

【0152】

発酵中に、A f G A T R又はグルコアミラーゼ変異体ポリペプチドは、培養ブロス中に溜まる。所望のA f G A T R又はグルコアミラーゼ変異体の単離及び精製の際、培養ブロスを遠心分離又は濾過して細胞を除去し、結果として得られた無細胞液を酵素精製に使用できる。一実施形態では、無細胞ブロスには、約70%飽和硫酸アンモニウムにより塩析を行い、次に、70%飽和沈殿画分を緩衝液に溶解させ、Sephadex G-100カラムなどのカラムにかけ、及び溶出し酵素活性化区分を回収する。更なる精製の際、イオン交換クロマトグラフィなどの従来手法を使用することもできる。

【0153】

精製酵素は、洗濯及び洗浄用途に有用である。例えば、それらは洗濯洗剤及び染み抜き剤に使用することができる。精製酵素は、液体(溶液、スラリー)又は固体(顆粒剤、粉末)のいずれかの最終生成物として製造することができる。

【0154】

より具体的な精製例は、Sumitani et al. (2000)「New type of starch-binding domain: the direct repeat motif in the C-terminal region of Bacillus sp. 195 glucoamylase contributes to starch binding and raw starch degrading」, Biochem. J. 350: 477~484に記載されており、本明細書において簡約されている。4リットルのストレプトミセス・リビダンス(Streptomyces lividans) TK24培養液の上清から得られた酵素を、飽和度80%の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を用いて処理した。10,000×g(20分かつ4℃)での遠心分離によって沈殿物を回収し、5mMの CaCl_2 を含有する20mMのTris/HCl緩衝液(pH 7.0)に再溶解させた。溶解させた沈殿物を次に同じ緩衝液に対して透析した。透析したサンプルを、次に予め20mMのTris/HCl緩衝液、(pH 7.0)、5mMの CaCl_2 により平衡化したSephacryl S-200カラムに装填し、同じ緩衝液により線流速7mL/hrで溶出した。カラムからの画分を回収し、酵素アッセイ及びSDS-PAGEをもとに判定されるものとして活性について評価した。タンパク質は更に次の通りに精製した。Toyopearl HW55カラム(Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA; カタログ番号19812)を、5mMの CaCl_2 及び1.5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含有する20mMのTris/HCl緩衝液(pH 7.0)により平衡化した。酵素を、5mMの CaCl_2 を含有する20mMのTris/HCl緩衝液(pH 7.0)中の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ につき、1.5から0Mの直線濃度勾配で溶出させた。活性画分を回収し、酵素を、飽和度80%の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を用いて沈殿させた。沈殿物を上記の通りに回収し、再溶解し、透析した。その後、流速60mL/時間で、5mM CaCl_2 含有の20mMトリス/HCl緩衝液(pH 7.0)であらかじめ平衡させたMono Q HR5/5カラム(Amersham Pharmacia; Cat. No. 17-5167-01)に、透析済み試料を適用した。活性画分を集めて、1.5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液に加えた。活性酵素画分を、Toyopearl HW55カラムに対し前述同様に再度クロマトグラフィ処理をし、SDS-PAGEにより判断される通り均質な酵素を得た。その方法及びバリエーションの概要については、Sumitani et al. (2000) Bioch

10

20

30

40

50

em. J. 350:477~484を参照のこと。

【0155】

生産規模の回復のため、AfGATR又はグルコアミラーゼ変異体ポリペプチドは、上に概説したように、ポリマーによる凝集を介し細胞を除去することにより部分的に精製することができる。あるいは、酵素は、精密濾過による精製後に、入手可能な膜及び装置を使用して限外濾過により濃縮することができる。しかしながら、或る種の用途に関しては、酵素を精製する必要はなく、全部ブロス培養物を溶解し、更なる処理はせずに使用することができる。次に、酵素は例えば顆粒へと加工することができる。

【0156】

4. AfGATR及びその変異体の組成物及び使用

AfGATR及びその変異体は、多様な工業用途に有用である。例えば、AfGATR及びその変異体は、デンプン変換プロセスにおいて有用であり、具体的には、液化を受けたデンプンの糖化プロセスにおいて有用である。所望の最終製品は、酵素によるデンプン基質の変換により生産され得る任意の生成物であってよい。例えば、所望の製品は、HFC Sの調製などの他のプロセスで使用できる、又はアスコルビン酸中間体類（例えば、グルコン酸；2-ケト-L-グルコン酸；5-ケト-グルコン酸；及び2,5-ジケトグルコン酸など）；1,3-プロパンジオール；芳香族アミノ酸類（例えば、チロシン、フェニルアラニン、及びトリプトファンなど）；有機酸類（例えば、乳酸、ピルビン酸、コハク酸、イソクエン酸、及びオキサロ酢酸など）；アミノ酸類（例えば、セリン及びグリシンなど）；抗生物質類；抗菌剤類；酵素類；ビタミン類；ホルモン類などの、多数の他の有用な製品に変換できる、グルコースに富むシロップであってよい。

【0157】

デンプンの変換プロセスは、燃料用アルコール、又は飲むためのアルコール（即ち、飲用アルコール）を生産するように設計された発酵プロセスに先立って、又はそれと同時に進行されるプロセスであってもよい。当業者は、これらの最終産物の生産に使用することのできる多様な発酵条件を承知しているであろう。AfGATR及びその変異体はまた、食品の調製に係る組成物及び方法に有用である。AfGATR及びその変異体のこれらの多様な用途は、以降により詳細に記載される。

【0158】

4. 1. デンプン基質の調製

一般的な当業者は、本開示のプロセスで使用するデンプン基質の調製に使用し得る、利用可能な方法をよく理解している。例えば、有用なデンプン基質は、塊茎類、根類、茎類、豆類、穀草類又は未精製の穀物から得ることができる。より具体的には、粒状デンプンは、トウモロコシ、トウモロコシ穂軸、小麦、大麦、ライ麦、ライコムギ、ミロ、サゴ、アワ、キャッサバ、タピオカ、ソルガム、米、さや豆、豆、バナナ、又はジャガイモから得ることができる。トウモロコシは約60~68%のデンプンを含有し、大麦は約55~65%のデンプンを含有し、キビは約75~80%のデンプンを含有し、小麦は約60~65%のデンプンを含有し、精白米は70~72%のデンプンを含有する。具体的に想定されているデンプン基質は、トウモロコシデンプン及び小麦デンプンである。穀類由来のデンプンは摩砕されていても、未精製でもよく、穀粒、糠、及び／又は穂軸といったトウモロコシ固形分を含む。デンプンは、高精製した生デンプン、又はデンプン精製プロセスで得られる原材料であってよい。また、様々なデンプンが市販されている。例えば、トウモロコシデンプンは、Ceresstar、Sigma、及びKatayama Chemical Industry Co. (Japan) から、小麦デンプンはSigmaから、サツマイモデンプンはWako Pure Chemical Industry Co. (Japan) から、そしてジャガイモデンプンはNakaari Chemical Pharmaceutical Co. (Japan) から入手可能である。

【0159】

デンプン基質は、粉碎した全粒から得た粗デンプンであってよく、この粗デンプンは、非デンプン画分（例えば、胚芽の残分及び繊維など）を含有している。粉碎には、湿式又

10

20

30

40

50

は乾式粉碎又は磨砕のいずれかが含まれ得る。湿式粉碎法では、未精製の穀物を水又は希酸に浸して、穀物をその構成部分（例えば、デンプン、タンパク質、胚芽、油、穀粒繊維）に分離する。湿式粉碎法は胚芽と穀粉（ミール）（即ち、デンプン顆粒とタンパク質）を効率的に分離し、シロップの調製に特に好適である。乾式粉碎法又は磨砕法では、未精製の穀粒を挽いて細かい粉末にし、多くの場合、穀物をその構成部分に分画せずに加工する。幾つかの場合では、仁由来の油が回収される。一般的に、乾式磨砕された穀類は、デンプンに加えて、大量の非デンプン炭水化物化合物を含むことになる。デンプン基質の乾式粉碎を使用して、エタノール及びその他の生化学物質を生産することができる。加工対象のデンプンは、高精製のデンプン品質のものであってよく、例えば、純度が少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、又は少なくとも99.5%であってもよい。

10

【0160】

4. 2. デンプンの糊化及び液化

本明細書において用いられている用語「液化」又は「液化する」とは、デンプンを、より粘性が低くかつ短鎖のデキストリンに転換するプロセスを意味する。一般的に、このプロセスは、 α アミラーゼを加えるのと同様の、又はそれに続くデンプンの糊化を包含するものの、場合により追加の液化誘導酵素を加えてもよい。幾つかの実施形態では、上述したように調製したデンプン基質を、水と共にスラリー化する。デンプンスラリーは、乾燥固形分の重量%として約10~55%、約20~45%、約30~45%、約30~40%、又は約30~35%のデンプンを含み得る。 α アミラーゼ（EC 3. 2. 1. 1）は、例えば、計量型ポンプでスラリーに添加され得る。この用途で典型的に使用される α アミラーゼは、熱的に安定な細菌 α アミラーゼであり、例えば、ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス（*Geobacillus stearothermophilus*）の α アミラーゼである。 α アミラーゼは、通常、例えば、デンプン乾燥物質1kg当たり約1500ユニットで供給する。 α アミラーゼの安定性及び活性を最適化するため、スラリーのpHは、典型的には約pH 5. 5~6. 5に調整し、及び典型的には、約1mMのカルシウム（約40ppm遊離カルシウムイオン）を加える。ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス（*Geobacillus stearothermophilus*）変異体、又はその他の α アミラーゼは、異なる条件を要求し得る。液化後にスラリー中に残存する細菌 α アミラーゼは、続く反応工程においてpHを低下させることを含む多様な方法を介し、あるいは酵素がカルシウムに依存する場合に、スラリーからカルシウムを除去することにより、失活させてもよい。

20

30

【0161】

α アミラーゼが加えられたデンプンスラリーを、蒸気で105℃に加熱されたジェットクッカーを連続的に通過させて、汲み上げてよい。これらの条件下では、糊化が急速に生じ、せん断力と組み合わされた酵素活性により、デンプン基質の加水分解が開始される。ジェットクッカー中滞留時間は短時間である。部分的に糊化したデンプンを、105~110℃に維持された一連の保持管に注入した後、約5~8分間保持して、糊化プロセスを完了することができる（「第1液化」）。85~95℃又はそれ以上の温度の保持槽において約1~2時間かけて、必要とされるDEへの加水分解を完了する（「第2液化」）。逆混合を防ぐために、これらの槽はバッフルを備えてもよい。本明細書において用いられている用語「第2液化時間（分）」は、第2液化の開始からデキストロース当量（DE）が測定された時点までに経過した時間を指す。次に、スラリーを室温に冷却させる。この冷却工程は、30~180分であってよく、例えば90分~120分である。

40

【0162】

上記のプロセスから得られる液化デンプンは、典型的には、約98%のオリゴ糖類及び約2%のマルトース及び0. 3%のD-グルコースを含有する。液化デンプンは、典型的には、約10~50%、約10~45%、約15~40%、約20~40%、約25~40%、又は約25~35%の乾燥固形分含量（wt / wt）有するスラリーの形態である。

【0163】

50

A k A A、A t A m y 1、A f A m y 1 及び A c A m y 1、並びにそれらの変異体は、液化プロセスにおいて、細菌性 α アミラーゼに代えて使用することができる。これらの α アミラーゼ及びその変異体による液化は、好都合にも、pH を約 pH 5.5 ~ 6.5 に調整する必要なく、低 pH で実施することができる。これらの α アミラーゼその変異体は、pH 範囲 2 ~ 7 にて（例えば、pH 3.0 ~ 7.5、pH 4.0 ~ 6.0、又は pH 4.5 ~ 5.8 にて）、液化に使用することができる。これらは、約 85 °C ~ 95 °C の温度範囲（例えば、85 °C、90 °C、又は 95 °C など）にて液化活性を維持することができる。例えば、液化は、乾燥固形分 25 % のトウモロコシデンプン溶液において、800 μ g の A c A m y 1 又はその変異体により、例えば、pH 5.8 及び 85 °C、又は pH 4.5 及び 95 °C で 10 分実施することができる。液化活性は、当該技術分野において既知の多数の粘度アッセイのいずれかを使用しアッセイすることができる。

10

【0164】

4. 3. 糖化

液化デンプンは、任意選択に別の酵素（類）の存在下にて、A f G A T R 及びその変異体を使用することにより、より低 DP、特に DP1 の糖類に富むシロップに糖化することができる。糖化産物の正確な組成は、使用される酵素の組み合わせ、並びに加工される粒状デンプンの種類に依存する。好都合にも、提供される A f G A T R 及びその変異体を使用して得られるシロップは、糖化デンプン中の総オリゴ糖類の約 65 % 超、例えば、70 %、80 %、85 %、90 %、95 %、又は 96 % の重量割合で DP1 を含み得る。

【0165】

20

液化は、一般的に、連続的なプロセスとして実施されるのに対し、糖化は、多くの場合バッチプロセスとして実施される。糖化は、典型的には、温度約 55 ~ 75 °C、pH 約 4.0 ~ 6.7（例えば、pH 5.0）にて最も効果的であるので、液化デンプンの冷却と pH 調整が必要となる。糖化は、例えば、約 40 °C、約 55 °C、又は約 65 °C ~ 約 70 °C、約 75 °C、又は約 80 °C の温度で実施することができる。糖化は、通常、充填又は排出するのに数時間を必要とし得る攪拌槽で実施する。酵素は、典型的には、槽が充填されるに伴い乾燥固形分に対し一定比で加えられ、あるいは充填段階の開始時に、単回添加物として加えられる。シロップを作製するための糖化反応は、典型的には、約 24 ~ 73 時間、例えば、24 ~ 48 時間実施する。最大又は所望の DE が得られたとき、例えば 85 °C で 5 分間加熱して反応を停止させる。更にインキュベートすることで、酵素による逆転反応及び／又は熱力学的な平行作用により、堆積したグルコースはイソマルトース及び／又はその他の元の生成物へと再重合されるので、低 DE から、最終的には約 90 DE までが得られる。A f G A T R ポリペプチド又はその変異体を使用するとき、糖化は、約 40 °C ~ 約 80 °C、例えば、約 55 °C ~ 約 75 °C 又は約 65 °C ~ 約 70 °C の温度範囲で最適に実施される。糖化は、約 pH 3.0 ~ 約 pH 7.5 の pH 範囲にわたって（例えば、pH 3.5 ~ pH 7.0、pH 4.0 ~ pH 6.7、又は pH 5.0）行うことができる。

30

【0166】

A f G A T R 又はその変異体は、組成物の形態でスラリーに添加され得る。A f G A T R 又はその変異体は、約 0.6 ~ 10 ppm ds（例えば、2 ppm ds）の量で、粒状デンプン基質のスラリーに添加することができる。A f G A T R 又はその変異体は、全ブロス、清澄化、部分精製、又は精製酵素として加えることができる。精製 A f G A 1 T R 又はその変異体の比活性は、例えば、A B T S アッセイにより測定したときに約 187.7 U/mg であり得る。精製 A f G A 2 T R 又はその変異体の比活性は、例えば、A B T S アッセイにより測定したときに約 213.7 U/mg であり得る。また、A f G A T R 又はその変異体を全ブロス製剤として加えることもできる。

40

【0167】

A f G A T R 又はその変異体は、単離された酵素溶液としてスラリーに添加され得る。例えば、A f G A T R 又はその変異体は、A f G A T R 又はその変異体を発現する宿主細胞によって生成された培養細胞物質の形態で添加することができる。A f G A T R 又はそ

50

の変異体はまた、酵素が持続的に反応に供給されるように、発酵又はSSFプロセスの間に、宿主細胞から反応培地に分泌され得る。AfGATR又はその変異体を生成し、かつ分泌する宿主細胞はまた、グルコアミラーゼなどの更なる酵素を発現し得る。例えば、米国特許第5,422,267号は、アルコール飲料の生産用の酵母におけるグルコアミラーゼの使用を開示している。例えば、トリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) などの宿主細胞は、糖化中にエンジニアリングによってAfGATR又はその変異体、及びAkAA、AcAmy1、天然のトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) の α アミラーゼ又はその変異体を含むがそれらに限定されない α アミラーゼを共発現し得る。宿主細胞は、内在性のグルコアミラーゼ、及び／又は他の酵素類、タンパク質類、又は他の物質を発現しないように、遺伝的に改変されていてもよい。宿主細胞は、広域スペクトルの各種糖分解性酵素を発現するよう遺伝子操作され得る。例えば、組み換え酵母菌宿主細胞は、グルコアミラーゼ、 α グルコシダーゼ、ペントース糖を利用する酵素、 α アミラーゼ、プルラーゼ、イソアミラーゼ、及び／又はイソプルラーゼをコードする核酸を含んでもよい。例えば、国際公開第2011/153516 A2号を参照のこと。

【0168】

4.4. 異性体

AfGATR又はその変異体を用いた処理により生産された可溶性デンプン加水分解物は、高フルクトースのトウモロコシシロップ (HFC S) などの、高フルクトースデンプン系シロップ (HFSS) に変換できる。この変換は、グルコースイソメラーゼ、特に固体支持体上に固定化されたグルコースイソメラーゼを使用して行うことができる。pHは、約6.0～約8.0、例えば、pH 7.5に上昇させ、 Ca^{2+} はイオン交換により除去する。好適なイソメラーゼとしては、Sweetzyme (登録商標)、IT (Novozymes A/S)、G-zyme (登録商標) IMG I、及びG-zyme (登録商標) G993、Ketomax (登録商標)、G-zyme (登録商標) G993、G-zyme (登録商標) G993液体、及びGenSweet (登録商標) IGIが挙げられる。異性体化後、混合物は、典型的には約40～45%フルクトース、例えば、42%フルクトースを含有する。

【0169】

4.5. 発酵

可溶性デンプン加水分解物、具体的にはグルコースに富むシロップは、典型的には約32℃ (例えば30℃～35℃) の温度で、発酵生物と上記デンプン加水分解物を接触させることによって、発酵させることができる。EOF生産物としては、クエン酸、乳酸、コハク酸、グルタミン酸一ナトリウム、グルコン酸、グルコン酸ナトリウム、グルコン酸カルシウム、グルコン酸カリウム、イタコン酸及び他のカルボン酸類、グルコ δ -ラクトン、エリソルビン酸ナトリウム、リジン及び他のアミノ酸類、 ω -3脂肪酸、ブタノール、イソプレン、1,3-プロパンジオール、並びに他の生体材料などの代謝産物が挙げられる。

【0170】

エタノール生成微生物としては、アルコール脱水素酵素及びピルビン酸脱炭酸酵素を発現する、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの酵母、及び細菌、例えば、ザイモモナス・モブリス (*Zymomonas mobilis*) が挙げられる。エタノール生成微生物は、キシロースをキシルロースに変換する、キシロース還元酵素及びキシリトール脱水素酵素を発現することができる。エタノール生成微生物の改良株、例えば、更に高温に耐性を示し得る改良株は、当該技術分野において既知であり、使用することができる。Liu et al. (2011) Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 27 (7): 1049～56を参照されたい。市販の酵母としては、ETHANOL RED (登録商標) (Lesaffre)、Thermosacc (登録商標) (Lallemand)、RED STAR (登録商標) (Red Star)、FERMIOL (登録商標) (DSM Specialties)、及びSUPERSTART (登録商標) (Alltech) が挙げられる。発酵により、クエン酸及び乳酸など

のその他の代謝産物を生産する微生物も当該技術分野において既知である。例えば、Papagianni (2007) 「Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling」, Biotechnol. Adv. 25 (3): 244~63; John et al. (2009) 「Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production」, Biotechnol. Adv. 27 (2): 145~52を参照のこと。

【0171】

10

糖化及び発酵プロセスは、SSFプロセスとして実施してもよい。発酵は、例えば、続いてエタノールの精製及び回収が含まれ得る。発酵中、ブロス又は「ビール」のエタノール含量は、約8~18% v/v例えば、14~15% v/vに達し得る。ブロスは、蒸留して富化された、例えば純度96%のエタノール溶液を生産することもできる。更に、発酵により生じるCO₂は、CO₂ 気体洗浄装置により回収し、圧縮し、及び他の用途のために、例えば、炭酸飲料、又はドライアイスの生産用に販売することもできる。発酵プロセス由来の固体廃棄物は、タンパク質に富む製品、例えば、家畜用飼料として使用することもできる。

【0172】

20

上述したように、SSFプロセスは、SSFの間中に連続してAfGATR又はその変異体を発現させ、かつ分泌させるトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) のような真菌細胞を使用して実施することができる。また、AfGATR又はその変異体を発現する真菌細胞は、発酵性の微生物 (例えば、エタノール産生微生物) でもあり得る。したがって、エタノール産生は、外因性酵素をほとんど又は全く加える必要がなくなるよう、十分にAfGATR又はその変異体を発現する真菌細胞を使用して実施することができる。真菌宿主細胞は、適切に遺伝子操作した菌株に由来し得る。また、AfGATR又はその変異体に加えて、他の酵素を発現し、かつ分泌する真菌宿主細胞を使用することもできる。そのような細胞は、 α アミラーゼ及び/若しくはプルランナーゼ、フィターゼ、 α グルコシダーゼ、イソアミラーゼ、 β アミラーゼセルラーゼ、キシラナーゼ、他のヘミセルラーゼ、プロテアーゼ、 β グルコシダーゼ、ペクチナーゼ、エステラーゼ、酸化還元酵素、トランスフェラーゼ、AfGATR以外のグルコアミラーゼ、又は他の酵素を発現し得る。

30

【0173】

このプロセスの変化形が、「流加発酵」システムであり、このシステムでは、発酵の進行に伴い基質が徐々に加えられる。流加発酵システムは、異化産物抑制によって細胞の代謝が阻害される可能性があり、培地中の基質の量が限定されていることが望ましい場合に有用である。流加システムにおける実際の基質濃度は、pH、溶存酸素、及びCO₂などの排出ガスの分圧などの測定可能な因子の変化に基づいて推定される。バッチ発酵及び流加発酵は一般的なものであり、当該技術分野では周知のものである。

【0174】

40

連続発酵は、規定の発酵培地をバイオリアクターに連続的に加え、等量の調整済の培地を加工用に同時に取り出す開放システムである。連続発酵では一般的に培養物は一定の高密度に維持され、細胞は主として対数期増殖する。連続発酵により、細胞成長、及び/又は生産物濃度の調節が可能となる。例えば、炭素源又は窒素源などの律速栄養素が固定速度に維持され、他の全てのパラメーターは適度に調節される。増殖は一定に維持されることから、培地が抜き出されることによる細胞の損失は、発酵中の細胞増殖率に対し調整すべきである。連続発酵プロセスを最適化し、生成物の形成速度を最大化する方法は、工業微生物学の技術分野において周知である。

【0175】

4. 6. AfGATR又はその変異体を含む組成物

AfGATR又はその変異体は、 α アミラーゼ (EC 3. 2. 1. 1) と併用され得

50

る。幾つかの実施形態において、 α アミラーゼは、有効量にて添加された場合に3.0～7.0、好ましくは3.5～6.5のpH範囲で活性を有する、酸安定性 α アミラーゼである。 α アミラーゼは、真菌 α アミラーゼ又は細菌性 α アミラーゼであり得る。更に、 α アミラーゼは、野生型 α アミラーゼ又はその変異体であり得る。

【0176】

真菌 α アミラーゼの好ましい例としては、アスペルギルス (*Aspergillus*) (例えば、*A. ニガー* (*A. niger*)、*A. カワチイ* (*A. kawachii*) 及び *A. オリザエ* (*A. oryzae*)) ; トリコデルマ (*Trichoderma*) 種、クモノスカビ (*Rhizopus*) 種、ムコール (*Mucor*) 種、並びにペニシリウム (*Penicillium*) 種を含むがそれら限定されない糸状性真菌の菌株から得られるものが挙げられる。乳酸桿菌 (*Lactobacilli*) 種及びストレプトモース (*Streptomyces*) 種。酸安定性 α アミラーゼは、細菌の株から導出され得る。好ましい細菌の株としては、*B. リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*)、*B. アミロリケファシエンス* (*B. amyloliquefaciens*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、*B. レンタス* (*B. lentus*)、及び *B. コアグランス* (*B. coagulans*) などのバチルス (*Bacillus*) 種が挙げられる。特に好ましいのは、*B. リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*)、及び *B. アミロリケファシエンス* (*B. amyloliquefaciens*) である。本発明の組成物及びプロセスに用いられる細菌性 α アミラーゼの1つとしては、米国特許第5,093,257号、同第5,763,385号、同第5,824,532号、同第5,958,739号、同第6,008,026号、同第6,093,563号、同第6,187,576号、同第6,361,809号、同第6,867,031号；米国特許出願公開第2006/0014265号；及び国際公開第96/23874号、同第96/39528号、同第97/141213号、同第99/19467号、及び同第05/001064号に記載されている α アミラーゼの1つを挙げることができる。

【0177】

例示的な α アミラーゼとしては、比活性及び熱安定性に優れるAkAA又はAcAmy1及びその変異体が挙げられる。AkAAの好適な変異体としては、 α アミラーゼ活性を有し、野生型AkAAに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するものが挙げられる。AcAmy1の好適な変異体としては、 α アミラーゼ活性を有し、野生型AcAmy1に対して少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の配列同一性を有するものが挙げられる。AfGATR及びその変異体は、好都合にも、AnGA又はTr-GAにより触媒される糖化プロセスにおいて生成されるグルコースの収率を高める。

【0178】

組成物に用いることが考えられる市販の α アミラーゼ及び方法としては、SPEZYME (商標) AA ; SPEZYME (商標) FRED ; SPEZYME (商標) XTRA ; GZYME (商標) 997 ; 及びCLARASE (商標) L (Genencor International Inc.) ; TERMAMYL (商標) 120-L、LC及びSC並びにSUPRA (Novozymes Biotech) ; LIQUOZYME (商標) X及びSAN (商標) SUPER (Novozymes A/S) 並びにFuelzyme (商標) LF (Diversa) が挙げられる。幾つかの実施形態において、 α アミラーゼとしては、SPEZYME (商標) AA、SPEZYME (商標) FRED又はSPEZYME (商標) XTRAのような、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来の α アミラーゼが挙げられる。幾つかの実施形態においては、酵素組成物として、BP-WT、SPEZYME (商標) XTRA及び任意選択的にSPEZYME (商標) FREDが挙げられる。他の実施形態においては、組成物として、BP-17、SPEZYME (商標) XTRA、及び任意選択的にSPEZYME (商標) FREDが挙げられる。

【0179】

AfGATR又はその変異体と共に使用することができる、他の好適な酵素としては、

A f G A T R以外のグルコアミラーゼ、フィターゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、 β アミラーゼ、イソアミラーゼ、 α グルコシダーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、他のヘミセルラーゼ、 β グルコシダーゼ、トランスフェラーゼ、ペクチナーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、エステラーゼ、酸化還元酵素、又はこれらの組み合わせなどが挙げられる。

【0180】

例えば、プルラナーゼ (EC 3. 2. 1. 41) などの脱分枝酵素、例えば、Promozyme (登録商標) は、当業者に周知の有効量にて添加できる。プルラナーゼは、典型的には、100 U/kg (ds) で加えられる。プルラナーゼは一般的にバチルス (Bacillus) 種により分泌される。例示的なプルラナーゼは、バチルス・デラミフィカンス (Bacillus deramificans) (米国特許第5, 817, 498号、1998)、バチルス・アシドブルーライティカス (Bacillus acidopullulyticus) (欧州特許第0, 063, 909号) 及びバチルス・ナガノエンシス (Bacillus naganoensis) (米国特許第5, 055, 403号) に関して記述されている。プルラナーゼ活性を有する酵素で商業的に使用される酵素は、例えば、バチルス (Bacillus) 種から製造される (Danisco-Genencor製の商標名OPTIMAX (商標) のL-1000、及びNovozymes製のPromozyme (商標))。

【0181】

バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) アミラーゼ/トランスフェラーゼ (BMA) : バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) アミラーゼは、分枝糖を、グルコアミラーゼにより容易に加水分解される形態に変換する能力を有する (Habeda R. E., Styrlund C. R. and Teague, W. M.; 1988 Starch/Stärke, 40, 33~36)。酵素は、pH 5. 5かつ温度75℃にて最大活性を呈する (David, M. H., Gunther H. and Vilvoorde, H. R.; 1987, Starch/Stärke, 39 436~440)。酵素は、遺伝的にエンジニアリングされたバチルス・ズブチルス (Bacillus subtilis) においてクローニング、発現され、かつ商業的規模で生産されてきた (Brumm, P. J., Habeda R. E, and Teague W. M., 1991 Starch/Stärke, 43 315~329)。アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) のグルコアミラーゼによる酵素液化デンプンの糖化中に、グルコース収率を高めるための酵素は、商標名MEGADEX (商標) で販売されている。

【0182】

イソアミラーゼ (EC 3. 2. 1. 68) はまた、当該技術分野において周知の有効量で添加され得る。また、プルラナーゼ (EC 3. 2. 1. 41)、例えば、Promozyme (登録商標) も好適である。プルラナーゼは、典型的には、100 U/kg (ds) で加えられる。更に好適な酵素類としては、真菌性プロテアーゼ、細菌性プロテアーゼなどのプロテアーゼ類が挙げられる。真菌プロテアーゼには、A. ニガー (A. niger)、アワモリコウジカビ (A. awamori)、A. オリゼ (A. oryzae) などのアスペルギルス (Aspergillus)、ムコール (Mucor) (例えば、M. ミエヘイ (M. miehei))、クモノスカビ (Rhizopus)、及びトリコデルマ (Trichoderma) から得られるものが含まれる。

【0183】

β アミラーゼ (EC 3. 2. 1. 2) は、エキソ作用型のマルトース生成アミラーゼであり、1, 4- α グルコシド結合の加水分解を触媒してアミロペクチン及び関連するグルコースポリマーを生ずることで、マルトースを放出させる。 β アミラーゼは、様々な植物及び微生物から単離されてきた。Fogarty et al. (1979) in PROGRESS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, Vol. 15, pp. 112~115を参照されたい。これらのBアミラーゼは、40℃~65℃の範囲の至適温度、及び約4. 5~約7. 0の範囲の最適pHを有する。想定されているBアミラーゼとしては、大麦由来のBアミラーゼであるSpezyme (登録商標) BBA 1500、Spezyme (登録商標) DBA、Optimalt (商標) ME、Op

timalt (商標) BBA (Danisco US Inc.)、及びNovozym (商標) WBA (Novozymes A/S) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0184】

5. 焼成及び食品調製のための組成物及び方法

本発明は、また、AfGATR又はその変異体を含む「食品組成物」(食品製品、動物飼料、及び／又は、食品／飼料添加物などが挙げられるが、これらに限定されない)、及びAfGATR又はその変異体を、1種類以上の食品原料と混合することを含む、そのような食品組成物の調製方法、又はその使用にも関する。

【0185】

AfGATR又はその変異体は食品組成物の調製に使用してもよく、この調製においてはポリペプチドの添加後に、食品組成物が焼成される。本明細書において用いられている用語「焼成組成物」は、焼成用製粉穀物、練り粉、焼成用添加物、及び／又は焼成食品が挙げられるがこれらに限定されない、焼成食品の提供プロセスで調製される任意の組成物及び／又は添加剤を意味する。食品組成物又は添加剤は液体又は固体であり得る。

【0186】

本明細書において用いられている用語「製粉穀物」は、粉碎又は磨砕された穀物を意味する。用語「製粉穀物」は、磨砕又はすり潰されたサゴ又は塊茎製品も意味する。一部の実施形態では、製粉穀物は、粉碎又はすり潰された穀草又は植物材料以外の構成成分も含有する。追加の構成成分の例としては、膨張剤が挙げられるが、これらに限定されない。穀物としては、小麦、オート麦、ライ麦、及び大麦が挙げられる。塊茎産物としては、製粉タピオカ、製粉キャッサバ、及びカスタード粉末が挙げられる。用語「製粉穀物」には、磨砕トウモロコシ粉、トウモロコシミール、米粉、全粉粒、ふくらし粉入りの小麦粉、タピオカ粉、キャッサバ粉、米粉、強化小麦粉、及びカスタード粉末も含まれる。

【0187】

焼成用及び食品生産用の穀粉の商用又は家庭での使用では、穀粉において適当なレベルのグルコアミラーゼ活性を維持することが重要である。活性レベルが高過ぎると、製品が粘着性になり及び／又は締りがなくなり、したがって商品にならない恐れがある。グルコアミラーゼ活性が不十分な穀粉では、適切な酵母の作用に十分な糖を含有できず、乾燥した、もろいパン又は焼成製品となってしまう。したがって、AfGATR又はその変異体を単独で、又は α アミラーゼ(1種又は複数種)と組み合わせて製粉穀物に加え、製粉穀物中に内在するグルコアミラーゼの活性レベルを増加させることもできる。

【0188】

アミラーゼを単独で、又はその他のアミラーゼと組み合わせて加えて、焼成製品の劣化、即ち、クラム硬化を防止又は遅延させることができる。抗劣化アミラーゼの量は、典型的には、製粉穀物1kg当たり0.01~10mgの酵素タンパク質の範囲であり、例えば、0.5mg/kg(ds)である。AfGATR又はその変異体と組み合わせて使用できる追加の抗劣化アミラーゼとしては、エンド型アミラーゼ、例えば、バチルス(Bacillus)由来の細菌性エンド型アミラーゼが挙げられる。追加のアミラーゼは、例えば、バチルス(Bacillus)由来のその他のマルトース生成 α アミラーゼ(EC 3.2.1.133)であってもよい。Novamyl(登録商標)は、B.ステアロサーモフィルス(B. stearothermophilus)株NCIB 11837由来の例示的なマルトース生成 α アミラーゼであり、例えば、Christophersen et al. (1997) Starch 50:39~45に記載されている。その他の抗劣化エンド型アミラーゼの例としては、B.リケニフォルミス(B. licheniformis)又はB.アミロリケファシエンス(B. amyloliquefaciens)などのバチルス(Bacillus)由来の細菌性 α アミラーゼが挙げられる。老化防止アミラーゼは、 β アミラーゼなどの、エキソ型アミラーゼでもよく、例えば、 β アミラーゼは、大豆などの植物原材料由来、又はバチルス(Bacillus)などの細菌原材料由来でもよい。

【0189】

A f G A T R 又はその変異体を含む焼成用組成物は、ホスホリパーゼ又はホスホリパーゼ活性を有する酵素を更に含むことができる。ホスホリパーゼ活性を有する酵素は、リパーゼユニット (L U) で測定することのできる活性を有する。ホスホリパーゼは、リン脂質類から脂肪酸を取り除き、リゾリン脂質を形成させる、 A_1 又は A_2 活性を有していてもよい。ホスホリパーゼは、リパーゼ活性、即ち、トリグリセリド基質に対する活性を有しても有さなくてもよい。ホスホリパーゼは、典型的には $30 \sim 90^\circ\text{C}$ (例えば、 $30 \sim 70^\circ\text{C}$) の範囲に至適温度を有する。加えるホスホリパーゼは、動物由来、例えば、膵臓由来 (例えば、ウシ又はブタ膵臓由来)、ヘビ毒液又は蜂毒液由来であり得る。あるいは、ホスホリパーゼは、微生物由来、例えば、糸状真菌、酵母、又は細菌由来であってもよい。

10

【0190】

ホスホリパーゼは、焼成後しばらくの間、特に焼成後最初の 24 時間の間のパンの柔らかさを向上させる量で加えられる。ホスホリパーゼの量は、典型的には、製粉穀物 1 kg 当たり $0.01 \sim 10 \text{ mg}$ の範囲の酵素タンパク質、例えば、 $0.1 \sim 5 \text{ mg/kg}$ であり得る。即ち、ホスホリパーゼ活性は、一般的に、製粉穀物 1 kg 当たり $20 \sim 1000 \text{ LU/kg}$ の範囲であり、ここでリパーゼユニットは、アラビアゴムを乳化剤とし、トリブチリンを基質とし、 30°C 、 $\text{pH } 7.0$ にて 1 分当たり $1 \mu\text{mol}$ の酪酸を放出させるのに必要とされる酵素量として定義される。

【0191】

練り粉組成物は、一般的に、小麦全粒粉又は小麦粉、及び／又はその他種類のミール、製粉穀物、又はデンプン (トウモロコシ粉、トウモロコシデンプン、ライ麦ミール、ライ麦粉、オート麦粉、オートミール、大豆粉、ソルガムミール、ソルガム粉、ジャガイモミール、ジャガイモ粉、又はジャガイモデンプン) を含む。練り粉は、新鮮、凍結、又は半焼成のものであってよい。練り粉は、発酵させた練り粉、又は発酵させる練り粉であってよい。練り粉は、化学膨張剤 (例えば、重炭酸ナトリウム) を加えること、あるいはイーストを加えること (即ち練り粉を発酵させること) などにより、多様な方法により膨らますことができる。練り粉は、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) (パン菓子用酵母)、例えば、*S. セレビシエ* (*Saccharomyces cerevisiae*) の市販株の培養など、好適な酵母培養物を加えて膨らますこともできる。

20

【0192】

練り粉にはまた、その他の従来練り粉原料、例えば、タンパク質 (乳汁粉末、グルテン、及び大豆など)、卵 (例えば、全卵、卵黄、又は卵白))、酸化剤 (アスコルビン酸、臭素酸カリウム、ヨウ素酸カリウム、アゾジカーボンアミド (A D A)、又はアンモニウム過硫酸塩)、L-システインなどのアミノ酸、糖、又は塩類 (塩化ナトリウム、酢酸カルシウム、硫酸ナトリウム、又は硫酸カルシウムなど) を含ませることもできる。練り粉には、更に脂肪、例えば、トリグリセリド (粒状脂肪又はショートニングなど) を含ませることもできる。練り粉には、更に乳化剤、例えば、モノ又はジグリセリド、モノ又はジグリセリドのジアセチル酒石酸エステル、脂肪酸の糖エステル、脂肪酸のポリグリセロールエステル、モノグリセリドの乳酸エステル、モノグリセリドの酢酸エステル、ステアリン酸ポリオキシエチレン、又はリゾレシチンなどを含ませることもできる。例えば、練り粉は、乳化剤の添加を行うことなく製造することができる。

30

40

【0193】

練り粉製品は、揚げ焼き、揚げ、ロースト、焼成、蒸し上げ、及び茹で上げされた練り粉を含む、任意の加工のなされた練り粉製品 (例えば蒸しパン及び餅類など) であってよい。一実施形態では、食品はベーカリー製品である。典型的なベーカリー (焼成) 製品としては、ローフ類、ロール類、丸パン類、ベーグル類、ピザ生地などのパン類、ペストリー、プレッツェル類、トルティーヤ類、ケーキ類、クッキー類、ビスケット類、クラッカー類などが挙げられる。

【0194】

所望により、追加の酵素を抗劣化アミラーゼ及びホスホリパーゼとともに使用してもよ

50

い。追加の酵素は、例えば、アミログルコシダーゼ、 β アミラーゼ、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼなどの第2のアミラーゼであってよく、あるいは追加の酵素は、ペプチダーゼ、特に、エキソペプチダーゼ、トランスグルタミナーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、例えば、国際公開第95/00636号に開示されるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、例えば、グリコシルトランスフェラーゼ、分岐酵素（1, 4- α グルカン分岐酵素）、4- α グルカノトランスフェラーゼ（デキストリングリコシルトランスフェラーゼ）、又は酸化還元酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、グルコース酸化酵素、ピラノース酸化酵素、リポオキシゲナーゼ、L-アミノ酸酸化酵素、又はカルボヒドレートオキシダーゼであってよい。追加の酵素（1種又は複数種）は、哺乳類及び植物を含む任意の由来であってよく、特に微生物（細菌、酵母、又は真菌）由来であってよく、当該技術分野で一般に使用される手法により得ることができる。

10

【0195】

キシラナーゼは、典型的には微生物由来であり、例えば、バクテリア、又は真菌（アスペルギルス（*Aspergillus*）株など）由来である。キシラナーゼには、例えば、トリコデルマ・レーシ（*Trichoderma reesei*）から製造された市販のキシラナーゼ製剤である *Pentopan*（登録商標）及び *Novozym 384*（登録商標）が含まれる。アミログルコシダーゼは *A. ニガー*（*A. niger*）アミログルコシダーゼ（*AMG*（登録商標）など）であってよい。その他の有用なアミラーゼ製剤としては、*Grindamyl*（登録商標）*A 1000*又は*A 5000*（*Grindsted Products, Denmark*）及びアミラーゼ（登録商標）*H*又はアミラーゼ（登録商標）*P*（*DSM*）が挙げられる。グルコース酸化酵素は、真菌グルコース酸化酵素、特に、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）のグルコース酸化酵素（*Gluzyme*（登録商標）など）であってよい。プロテアーゼの例は *Neutrase*（登録商標）である。

20

【0196】

柔らかい又はクリスピー様の特徴のいずれかであり、精白、色白又は色黒のいずれかである、練り粉からあらゆる種類の焼成製品を調製するためのプロセスを使用することができる。例としてはパンがあり、具体的には、白パン、全粒粉パン、ライ麦パン（典型的には、ローフ状又はロール状のもの）であり、例えば、フレンチバゲットタイプのパン、ピタパン、トルティーヤ、ケーキ、パンケーキ、ビスケット、クッキー、パイクラスト、クリスプブレッド、蒸しパン、ピザなどがあるが、これらに限定されない。

30

【0197】

*AfGATR*又はその変異体は、老化防止アミラーゼ、ホスホリパーゼ、及び／又はリン脂質と共に穀粉を含むプレミックス中に使用され得る。プレミックスには、その他の練り粉を改良する及び／又はパンを改良する添加剤、例えば、上記の酵素を含む任意の添加剤を含有させることができる。*AfGATR*又はその変異体は、焼成用添加物として使用される、老化防止アミラーゼと、ホスホリパーゼとを含む酵素製剤の成分であってもよい。

【0198】

酵素製剤は、場合により、粒状又は凝集粉末の形態である。製剤は、粒子の95重量%超が25~500 μm の範囲内にある狭い粒度分布を有してよい。顆粒と凝集粉末は、従来法（例えば、*AfGATR*又はその変異体を流動層造粒機内で担体上へ噴霧すること）により調製され得る。担体は、好適な粒径を有する粒子コアからなっており、担体は、可溶性又は不溶性の、例えば、塩（*NaCl*又は硫酸ナトリウムなど）、糖（スクロース又はラクトースなど）、糖アルコール（ソルビトールなど）、デンプン、米、コーングリッツ、又は大豆であってよい。

40

【0199】

封入粒子、即ち、グルコアミラーゼ粒子は、*AfGATR*又はその変異体を含み得る。封入グルコアミラーゼ粒子を調製するために、酵素を、全てのグルコアミラーゼ粒子を懸濁させるのに十分な量の食品グレードの脂質と接触させる。本明細書で使用するとき、食

50

品グレードの脂質は、水には不溶性であるものの、炭化水素又はジエチルエーテルなどの無極性有機溶媒には可溶性である、任意の天然の有機化合物であり得る。好適な食品グレードの脂質としては、飽和又は不飽和である脂肪又は油のいずれかの形態のトリグリセリドが挙げられるがこれらに限定されない。飽和トリグリセリドを作る脂肪酸及びそれらの組み合わせの例の例としては、酪酸（乳汁脂肪由来）、パルミチン酸（動物及び植物性脂肪由来）、及び／又はステアリン酸（動物及び植物性脂肪由来）が挙げられるがこれらに限定されない。不飽和トリグリセリドを作る脂肪酸及びそれらの組み合わせの例としては、パルミトレイン酸（動物及び植物性脂肪由来）、オレイン酸（動物及び植物性脂肪由来）、リノール酸（植物油由来）、及び／又はリノレン酸（亜麻仁油由来）が挙げられるがこれらに限定されない。その他の好適な食品グレードの脂質としては、上記トリグリセリド由来のモノグリセリド及びジグリセリド、リン脂質及び糖脂質が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0200】

食品グレードの脂質、特に液体形態のものを、脂質材料が、少なくとも大部分、例えば、100%のグルコアミラーゼ粒子の表面の少なくとも一部分を覆うような様式で、粉末形態のグルコアミラーゼ粒子と接触させる。したがって、各グルコアミラーゼ粒子はそれぞれ脂質に封入される。例えば、全て又は実質的に全てのグルコアミラーゼ粒子には、薄く連続的な脂質の封入フィルムが備わっている。これは、最初に大量の脂質を容器に注ぎ入れ、次に脂質が各グルコアミラーゼ粒子の表面を十分に濡らすようグルコアミラーゼ粒子をスラリーにすることによりなすことができる。短時間攪拌した後、相当量の脂質を表面上に保持する封入グルコアミラーゼ粒子を回収する。所望の場合には、グルコアミラーゼ粒子にこのように適用されるコーティングの厚みを、使用する脂質の種類を選択すること、及び、より厚い皮膜を形成するための操作を繰り返すことによって、調節することもできる。

20

【0201】

装填される送達分散媒の保管、取り扱い、及び組み込みは、パッケージ化ミックスを用いて実施できる。パッケージ化ミックスは、封入グルコアミラーゼを含み得る。しかしながら、パッケージミックスは、製造元又は焼成者が必要とする追加的な原材料を更に含むことができる。封入グルコアミラーゼが練り粉に混入された後、焼成者は、製品のための通常の生産プロセスを続ける。

30

【0202】

グルコアミラーゼ粒子の封入による利点は2点ある。第1に、食品グレードの脂質は、熱に不安定な酵素の焼成プロセス中に、これらの酵素を熱分解から保護する。その結果、グルコアミラーゼは、発酵と焼成段階の間は、安定化され、保護されているが、最終的な焼成製品の中では保護コーティングから放出され、ポリグルカンのグルコシド結合を加水分解する。装填される送達分散媒は、活性酵素の焼成食品への持続放出性ももたらす。即ち、焼成プロセス後、活性グルコアミラーゼは、劣化機序に対抗する速度で、保護コーティングから持続的に放出され、それにより、その劣化機序速度を低減する。

【0203】

一般的に、グルコアミラーゼ粒子に適用される脂質の量は、脂質の性質、脂質がグルコアミラーゼ粒子に適用される態様、取り扱う練り粉混合物の組成、関連する練り粉混合操作の強さの程度により、グルコアミラーゼの総重量の数パーセントから、その重量の何倍にも変わり得る。

40

【0204】

装填される送達分散媒、即ち、脂質で被覆された酵素を、焼成食品の貯蔵寿命を延長するのに効果的な量で焼成食品を調製するために使用される原材料に加える。焼成者は、所望の抗劣化効果を得るのに必要とされる、上記の通りに調製された封入αアミラーゼの量を計算する。封入グルコアミラーゼの所要量は、封入される酵素濃度、及び特定の穀粉に対するグルコアミラーゼの割合を元に算出する。幅広い濃度が有効であることが見出されているものの、これまでに議論されている通り、抗劣化において観察可能な改良はグルコ

50

アミラーゼ濃度と直線的には対応せず、但し特定の最低濃度を超えると、グルコアミラーゼ濃度が大幅に上昇するためほとんど追加の改良はない。ベーカリー製品製造者の不注意による測定誤差で、少な目になってしまうことに対処するために、具体的な焼成による生産で実際に使用されるグルコアミラーゼ濃度は、必要最小量よりはるかに高くてもよい。酵素濃度の下限は、焼成者が得ることを望む最低限の抗劣化効果をもとに決定する。

【0205】

焼成食品の調製方法は、a) 脂質でコーティングされたグルコアミラーゼ粒子を調製する工程であって、実質的に全ての該グルコアミラーゼ粒子がコーティングされる、調製する工程と、b) 穀粉を含有する練り粉を混合する工程と、c) 脂質コーティングされた該グルコアミラーゼを、該混合が完了する前に該練り粉へ加え、該脂質コーティングが該グルコアミラーゼから取り除かれる前に該混合を終了する工程と、d) 該練り粉を発酵させる工程と、e) 該練り粉を焼成し、該焼成食品を提供する工程であって、該グルコアミラーゼが該混合段階、該発酵段階及び該焼成段階では不活性であり、該焼成食品中では活性である工程と、を含んでもよい。

10

【0206】

封入グルコアミラーゼは、混合サイクル中、例えば、混合サイクルの終了近くに練り粉に加えることができる。封入グルコアミラーゼは、練り粉中に封入グルコアミラーゼを十分に分散させる混合段階で加えるが、混合段階は、グルコアミラーゼ粒子（1又は複数）から保護コーティングが剥がれ始める前に終了させる。練り粉に、封入グルコアミラーゼを混合するためには、練り粉の種類及び量、並びに混合機の動作及び速度に応じて、1～6分以上が必要とされるであろうが、平均すると2～4分である。したがって、多変数が正確な手順を決定し得る。第1に、封入グルコアミラーゼの量は、封入グルコアミラーゼを練り粉ミックス中に行き渡らせるのに十分な合量を有する必要がある。封入グルコアミラーゼ調製物が高濃度である場合は、この封入グルコアミラーゼが練り粉へ添加される前に、プレミックスに追加の油を添加することが必要な場合がある。処方と生産プロセスには、特定の改変が必要な場合がある。しかしながら、パン練り粉調合物中に指定された油の25%が練り粉に保持されていて、混合サイクルの終了近くに添加されたときに、濃縮封入グルコアミラーゼに対する担体として使用された場合、一般的に良好な結果が達成できる。練り粉に封入グルコアミラーゼを適切に混合するためには、パン又は他の焼成食品（特にフランス式のパンなどの低脂肪含量の製品）では、乾燥穀粉の重量のおよそ1%の封入グルコアミラーゼ混合物で十分である。好適な割合の範囲は広く、調合物、最終製品、及び個々の焼成者に必要とされる生産方法によって異なる。第2に、封入グルコアミラーゼ懸濁液は、練り粉に完全に混合されるのに十分な時間にわたって、但し、過剰な機械作用により封入グルコアミラーゼ粒子から保護脂質コーティングが剥がされるようなものではない時間にわたって、混合物に添加される必要がある。

20

30

【0207】

食品を油、肉、ラード、A f G A T R又はその変異体を含む組成物とする、食品組成物が想到される。この文脈で、用語「[油／肉／ラード]組成物」とは、それぞれ、油、肉、又はラードをもとにする、これからなる及び／又はこれを含有する任意の組成物を意味する。本発明のポリペプチドを油／肉／ラード組成物、及び／又は添加成分と混合することを含む、油、若しくは肉、若しくはラード組成物、及び／又はA f G A T R若しくはその変異体を含む添加剤を調製するための方法が想到される。

40

【0208】

食品組成物は、A f G A T R及びその変異体を含む動物飼料組成物、動物飼料添加剤、並びに／又はペットフードであり得る。A f G A T R及びその変異体を1種以上の動物飼料原材料及び／又は動物飼料添加成分及び／又はペットフード原材料に混合することを含む、そのような動物飼料組成物、動物飼料添加剤組成物及び／又はペットフードの調製方法が想到される。A f G A T R及びその変異体は、動物飼料組成物及び／又は動物飼料添加剤組成物、及び／又はペットフードの調製に使用され得る。

【0209】

50

用語「動物」は、全ての非反芻及び反芻動物を含む。特定の実施形態では、動物は、馬及び単胃動物などの非反芻動物である。単胃動物の例としては、豚及び家畜豚（子豚、育成豚、雌豚など）、鶏（七面鳥、アヒル、鶏、ブロイラー、産卵鶏など）、魚（鮭、鱒、テラピア、ナマズ、及び鯉など）、及び甲殻類（海老及び車海老など）が挙げられるがこれらに限定されない。更なる実施形態では、動物は反芻動物であり、畜牛、幼若牛、ヤギ、羊、キリン、バイソン、ヘラジカ、エルク、ヤク、水牛、シカ、ラクダ、アルパカ、リヤマ、レイヨウ、エダツノレイヨウ、及びニルガイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0210】

この文脈において、用語「ペットフード」は、イヌ、ネコ、スナネズミ、ハムスター、チンチラ、高級ラット、モルモット、飼育用鳥類（カナリア、インコ、及びオウムなど）、飼育用爬虫類（亀、とかげ、及びヘビなど）、並びに飼育用水生生物（熱帯魚、及び蛙など）であるがこれらに限定されない家庭内飼育用動物のための飼料を意味するものと理解されることが意図される。

【0211】

用語「動物用飼料組成物」、「飼料」及び「飼葉」は互換可能に用いられ、かつ a) シリアル類、例えば、小粒穀物（例えば、小麦、大麦、ライ麦、エンバク、及びこれらの組み合わせ）、及び／又は大粒穀物（例えば、コーン又はサトウモロコシなど）など、b) シリアル類を原料とする製品、例えば、コーングルテンミール、蒸留粕（DDGS）（特にコーン系の蒸留粕（cDDGS）、小麦ふすま、粗びき小麦粉、小麦ショート（wheat shorts）、米ぬか、もみ殻、オーツ麦のもみ殻、パーム核、及び柑橘パルプ、c) タンパク質類、例えば、大豆、ヒマワリ、落花生、ルピナス、エンドウ豆、ソラマメ、綿、セイヨウアブラナ、魚粉、乾燥血漿タンパク質、肉骨粉飼料、ポテトタンパク質、乳清、コブラ、ゴマなどの供給源から得られるタンパク質、d) 植物資源及び動物資源から得られる油類及び脂肪類、e) ミネラル類及びビタミン類、からなる群から選択される1種以上の飼料材料を含み得る。

【0212】

6. 織物湯通し組成物及び使用

また、AfGATRを使用した、布地を処理する（例えば、織物の糊抜きなど）組成物及び方法も、想到される。布地の処理方法は当該技術分野において周知である（例えば、米国特許第6,077,316号を参照されたい）。例えば、布地の感触及び外観は、その布地をAfGATRの溶液と接触させる工程を含む方法により改善することができる。布地は、圧力下で溶液により処理され得る。

【0213】

AfGATRは、織物の製織の間に若しくはその後に、又は糊抜き段階若しくは1種以上の追加の布地加工工程中に適用することができる。織物の製織の間、織り糸は相当な機械的な歪に曝される。機械式織機での製織前、縦糸は、引張り強度を向上させ、かつ断裂を防止するために、しばしば糊付けデンプン又はデンプン誘導体により被覆される。製織の間に又はその後にAfGATRを適用して、これらの糊付けデンプン又はデンプン誘導体を取り除くことができる。製織後にAfGATRを使用して、均一かつ耐洗淨的な効果を確保するために布地を更に加工する前に、糊付け用コーティングを取り除くことができる。

【0214】

AfGATRを単体で、又は他の糊抜き用化学試薬及び／若しくは糊抜き用酵素と共に、（例えば、水性組成物中の）洗剤添加剤として使用して、綿含有布地などの布地の糊抜きを行ってよい。また、AfGATRは、インディゴ染色デニム布地及び衣類のストーンウォッシュ加工したような見た目を作り出すための組成物及び方法において使用することもできる。衣服の製造に際し、布地を裁断し、衣服又は衣類に縫製し、その後仕上げることができる。特にデニムジーンズの製造に関し、異なる酵素による仕上げ方法が開発されている。デニム衣類の仕上げは、通常、酵素による湯通し工程により開始され、この間、

10

20

30

40

50

衣類はアミロース分解酵素による作用を受け、布地には柔軟性がもたらされ、木綿は以降の酵素による仕上げ工程による作用を受けやすくなる。A f G A T Rは、デニム衣類の仕上げ方法（例えば、「バイオストーン加工」）、酵素による糊抜き方法及び、布地への柔らかさの付与方法、並びに／又は仕上げ加工にて使用することができる。

【0215】

7. 洗浄用組成物

本組成物及び方法の一態様は、A f G A T R又はその変異体を成分として含む洗浄用組成物である。アミラーゼポリペプチドは、手洗い、洗濯物洗浄、食器洗浄、及び他の硬質表面の洗浄のための洗剤組成物の成分として使用することができる。

【0216】

7. 1. 概略

好ましくは、本A f G A T R又はその変異体は、洗剤中のアミラーゼに対して従来から使用されている濃度にて、又はそれに近い濃度にて、洗剤に混入される。例えば、グルコアミラーゼポリペプチドは、洗浄／食器洗い液1 L当たりアミラーゼ0.00001～1 mg（高純度酵素タンパク質として計算）に相当する量で加えることができる。次に例示する通り、配合例を本明細書において提供する。

【0217】

グルコアミラーゼポリペプチドは、唯一の酵素として、又は他のデンプン分解酵素などの他の酵素と共に、洗剤組成物の成分となり得る。そのため、非散布顆粒、安定化液体、又は保護化酵素の形態で洗剤組成物に含有させることもできる。非散布顆粒は、米国特許第4,106,991号及び同第4,661,452号に開示される通りに生成されてもよく、場合により、当該技術分野において既知の方法によりコーティングされてもよい。ワックスコーティング材料の例は、平均分子量1,000～20,000を有するポリ（エチレンオキシド）製品（ポリエチレングリコール、PEG）、16～50個のエチレンオキシド単位を有するエトキシ化ノニルフェノール、エトキシ化脂肪アルコール（ここで、アルコールは、12～20個の炭素原子を含有し、15～80個のエチレンオキシド単位が存在する）、脂肪アルコール、脂肪酸、及び脂肪酸のモノー及びジー及びトリグリセリドである。流動層技術による適用に適したフィルム形成コーティング材料の例は、例えば、英国特許第1483591号において与えられる。液体酵素調製物は、例えば、確立された方法に従い、ポリオール（プロピレングリコールなど）、糖又は糖アルコール、乳酸又はホウ酸を添加することにより、安定化させてもよい。その他の酵素安定剤は、技術分野において既知である。保護化酵素は、例えば、欧州特許第238216号に開示される方法に従って調製することができる。ポリオールは、長きにわたりタンパク質安定剤として、並びにタンパク質溶解度を改良するとして認識されてきた。

【0218】

洗剤組成物は、例えば、粉末、顆粒、ペースト、又は液体などの任意の有用な形態であってよい。液体洗剤は水性であってよく、典型的には、最大で約70%の水及び0%～約30%の有機溶媒から構成され得る。液体洗剤は、水を約30%含有するコンパクトジェルタイプの形態であってもよい。

【0219】

洗剤組成物は、1種以上の界面活性剤を含み、それぞれアニオン性、非イオン性、カチオン性、又は双極性であり得る。洗剤は、通常、0%～約50%のアニオン性界面活性剤、例えば、線状アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）、 α -オレフィンスルホン酸塩（AOS）、アルキル硫酸塩（脂肪族アルコール硫酸塩）（AS）、アルコールエトキシ硫酸塩（AEOS又はAES）、第二級アルカンスルホン酸塩（SAS）、 α -スルホ脂肪酸メチルエステル、アルキル又はアルケニルコハク酸、又は石鹼を含有し得る。組成物には、0%～約40%の非イオン性界面活性剤、例えば、アルコールエトキシレート（AEOL又はAE）、カルボキシル化アルコールエトキシレート、ノニルフェノールエトキシレート、アルキルポリグリコシド、アルキルジメチルアミノオキシド、エトキシ化脂肪酸モノエタノールアミド、脂肪酸モノエタノールアミド、又はポリヒドロキシルアルキル脂

肪酸アミド（例えば、国際公開第92/06154号に記載のものなど）を含有させることもできる。

【0220】

洗剤組成物には、追加して、1つ以上のその他の酵素、例えば、任意の組み合わせでプロテアーゼ、その他のアミロース分解酵素、クチナーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペルヒドロラーゼ、キシラナーゼ、ペルオキシダーゼ、及び／又はラッカーゼなどを含ませることもできる。

【0221】

洗剤には、約1～約65%の洗剤結合剤、又は錯化剤、例えば、ゼオライト、ニリン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、クエン酸塩、ニトロ三酢酸（NTA）、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTMPA）、アルキル又はアルケニルコハク酸、可溶性ケイ酸塩又は層状ケイ酸塩（例えば、HoechstのSKS-6）を含有させてもよい。洗剤は無ビルダー系であってよく、即ち、洗剤ビルダーを本質的に不含有である。酵素は、酵素の安定性に適合性のある任意の組成物に使用することができる。酵素は、一般的に、既知の形態の封入により、例えば、造粒又はヒドロゲル中への隔離により、有害な成分から保護することができる。酵素、及び具体的にはデンプン結合ドメインを有する又は有さないアミラーゼを、洗濯及び食器洗い用途、表面クリーナー、並びにデンプン又はバイオマスからのエタノール産生用組成物を含む、多様な組成物に使用することができる。

10

【0222】

洗剤は、1種類以上のポリマーを含んでいてもよい。例としては、カルボキシメチルセルロース（CMC）、ポリ（ビニルピロリドン）（PVP）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）、ポリカルボキシレート、例えば、ポリアクリレート、マレイン酸／アクリル酸コポリマー類、及びラウリルメタクリレート／アクリル酸コポリマー類が挙げられる。

20

【0223】

洗剤は、 H_2O_2 供給源、例えば、過ホウ酸塩又は過炭酸塩（過酸を形成する漂白活性化剤、例えば、テトラアセチルエチレンジアミン（TAED）又はノナノイルオキシベンゼンスルホン酸塩（NBS）と組み合わせてもよい）を含む漂白系を含有し得る。あるいは、漂白系は、ペルオキシ酸（例えば、アミド、イミド、又はスルホン型ペルオキシ酸）を含むものであってもよい。漂白系は、酵素系漂白系、例えば、国際公開第2005/056783号に記載されるものなどのペルヒドロラーゼであってもよい。

30

【0224】

洗剤組成物の酵素は、従来の安定化剤、例えば、プロピレングリコール又はグリセロールなどのポリオール、糖又は糖アルコール、乳酸、ホウ酸又はホウ酸誘導体、例えば、芳香族ホウ酸塩エステルを用いて安定化されてもよく、組成物は、例えば、国際公開第92/19709号及び国際公開第92/19708号に記載される通りに配合することもできる。

【0225】

洗剤には、他の従来の洗剤成分、例えば、クレイを含む布地コンディショナー、起泡促進剤、抑泡剤、防食剤、汚れ懸濁化剤、汚れ再付着防止剤、染料、殺菌剤、変色防止剤、光学的光沢剤、又は香料を含有させてもよい。

40

【0226】

pH（使用濃度の水溶液で測定）は通常、中性又はアルカリ性であり、例えば、pH約7.0～約11.0である。

【0227】

本グルコアミラーゼを含有させるための特定の形態の洗剤組成物を以降に記載する。

【0228】

7.2. 重質液体（HDL）洗濯洗剤組成物

HDL洗濯洗剤組成物例には、アニオン性洗浄界面活性剤（線状又は分岐状又はランダ

50

ム鎖、置換又は非置換アルキル硫酸塩、アルキルスルホン酸塩、アルキルアルコキシ化硫酸塩、アルキルリン酸塩、アルキルホスホン酸塩、アルキルカルボン酸塩、及び／又はこれらの混合物からなる群から選択される）、及び場合により非イオン性界面活性剤（線状又は分岐状又はランダム鎖、置換又は非置換アルキルアルコキシ化アルコール、例えば、 $C_8 \sim C_{18}$ アルキルエトキシ化アルコール及び／又は $C_6 \sim C_{12}$ アルキルフェノールアルコキシレートからなる群から選択される）を含有する、洗浄界面活性剤（10～40 % w t / w t）が含まれ、非イオン性洗浄界面活性剤に対するアニオン性洗浄界面活性剤（6.0～9の親水性指数（H I c）を有する）の重量比は1：1超である。好適な洗浄界面活性剤には、カチオン性洗浄界面活性剤（アルキルピリジニウム化合物、アルキル第四級アンモニウム化合物、アルキル第四級ホスホニウム化合物、アルキル第三級スルホニウム化合物、及び／又はこれらの混合物からなる群から選択される）、双極性及び／又は両性洗浄界面活性剤（アルカノールアミンスルホベタインからなる群から選択される）、両性界面活性剤、半極性非イオン性界面活性剤、並びにこれらの混合物も含まれる。

【0229】

組成物には、場合により、両親媒性アルコキシ化グリース洗浄ポリマー（アルコキシ化ポリアルキレンイミンなどの、分岐状親水及び疎水特性を有するアルコキシ化ポリマーからなる群から0.05重量%～10重量%の範囲で選択される）、及び／又はランダムグラフトポリマー（典型的には、不飽和 $C_1 \sim C_6$ カルボン酸、エーテル、アルコール、アルデヒド、ケトン、エステル、糖単位、アルコキシ単位、マレイン酸無水物、グリセロールなどの飽和多価アルコール、及びこれらの混合物からなる群から選択されるモノマーを含む、親水性主鎖、 $C_4 \sim C_{25}$ アルキル基、ポリプロピレン、ポリブチレン、飽和 $C_1 \sim C_6$ モノカルボン酸のビニルエステル、アクリル酸又はメタクリル酸の $C_1 \sim C_6$ アルキルエステル、及びこれらの混合物からなる群から選択される疎水性側鎖（1種又は複数種）を含む）からなる界面活性増強ポリマーを含ませることもできる。

【0230】

組成物には、汚れ放出ポリマー（アニオン性末端保護ポリエステル、例えば、SRP1、糖、ジカルボン酸、ポリオール及びこれらの組み合わせから選択される少なくとも1つのモノマー単位をランダム又はブロック構成で含むポリマー、ランダム又はブロック構成のエチレンテレフタレート系ポリマー及びそれらのコポリマー、例えば、Repeleotex SF、SF-2及びSRP6、Texcare SRA100、SRA300、SRN100、SRN170、SRN240、SRN300及びSRN325、Marlloquest SLを含む）、再付着防止ポリマー（分子量500～100,000Daの範囲の、アクリル酸、マイレン酸（若しくはマレイン酸無水物）、フマル酸、イタコン酸、アコニット酸、メサコン酸、シトラコン酸、メチレンマロン酸、及びこれらの任意の混合物から選択される少なくとも1種のモノマーを含むポリマー、ビニルピロリドンホモポリマー、及び／又はポリエチレングリコールなどのカルボキシレートポリマーを0.1重量%～10重量%含む）、セルロースポリマー（アルキルセルロース、アルキルアルコキシアルキルセルロース、カルボキシアルキルセルロース、アルキルカルボキシアルキルセルロース、例えば、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、メチルカルボキシメチルセルロース、及びこれらの混合物など、から選択されるものを含む）、並びに高分子カルボキシレート（マレエート／アクリレートランダムコポリマー又はポリアクリレートホモポリマーなど）などの追加のポリマーを含有させることもできる。

【0231】

組成物は、飽和又は不飽和脂肪酸、好ましくは飽和又は不飽和 $C_{12} \sim C_{24}$ 脂肪酸（0重量%～10重量%）；付着補助剤（例としては、多糖類、好ましくはセルロース系ポリマー、ポリジアリルジメチルアンモニウムハロゲン化物（DADMAC）、及びランダム又はブロック構成の、DADMACとビニルピロリドン、アクリルアミド、イミダゾール、ハロゲン化イミダゾリニウム、及びそれらの混合物とのコポリマー、カチオン性グアーガム、カチオン性セルロース（カチオン性ヒドロキシエチル（hydroxyethyl）セルロー

スなど)、カチオン性デンプン、カチオン性ポリアシルアミド、及びそれらの混合物)を更に含んでもよい。

【0232】

組成物には、更に移染防止剤、例えば、マンガンフタロシアニン、ペルオキシダーゼ、ポリビニルピロリドンポリマー、ポリアミンN-オキシドポリマー、N-ビニルピロリドン及びN-ビニルイミダゾールのコポリマー、ポリビニルオキサゾリドン及びポリビニルイミダゾール、及び/又はこれらの混合物、キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミンペンタメチレンホスホン酸(DTPMP)、ヒドロキシーエタンジホスホン酸(HEDP)、エチレンジアミンN,N'-ニコハク酸(EDDS)、メチルグリシン二酢酸(MGDA)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)、プロピレンジアミン四酢酸(PDTA)、2-ヒドロキシピリジン-N-オキシド(HPNO)、又はメチルグリシン二酢酸(MGDA)、グルタミン酸-N,N-二酢酸(N,N-ジカルボキシメチルグルタミン酸テトラナトリウム塩(GLDA)、ニトリロ三酢酸(NTA)、4,5-ジヒドロキシ-m-ベンゼンジスルホン酸、クエン酸及びそれらの塩、N-ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸(HEDTA)、トリエチレントetraアミン六酢酸(TTHA)、N-ヒドロキシエチルイミノジ酢酸(HEIDA)、ジヒドロキシエチルグリシン(DHEG)、エチレンジアミンテトラプロピオン酸(EDTP)、及びこれらの誘導体、を含ませることもできる。

10

【0233】

組成物に好ましく含有される酵素(一般的に、約0.01重量%活性酵素~0.03重量%活性酵素)は、プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ/オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナナーゼ、クチナーゼ、ラッカーゼ、ホスホリパーゼ、リゾホスホリパーゼ、アシル基転移酵素、ペルヒドロラーゼ、アリアルエステラーゼ、及びこれらの任意の混合物から選択される。組成物には酵素安定剤を含ませることもできる(例えば、プロピレングリコール又はグリセロールなどのポリオール、糖又は糖アルコール、乳酸、可逆性プロテアーゼ阻害剤、ホウ酸、又はホウ酸誘導体、例えば、芳香族ホウ酸エステル、あるいはフェニルボロン酸誘導体、例えば、4-ホルミルフェニルボロン酸などを含む)。

20

【0234】

組成物は、場合により、シリコン又は脂肪酸系抑泡剤、色相染料、カルシウム及びマグネシウムカチオン、視覚的シグナル成分、消泡剤(0.001重量%~約4.0重量%)、及び/又は構造剤/増粘剤(0.01重量%~5重量%、ジグリセリド及びトリグリセリド、エチレングリコールジステアレート、微小結晶セルロース、セルロース系材料、微小繊維セルロース、バイオポリマー、キサンタンガム、ジェランガム、及びこれらの混合物からなる群から選択される)を含む。

30

【0235】

組成物は任意の液体形態であってよく、例えば、液体又はジェル形態、あるいはこれらの組み合わせであってよい。組成物は、任意の単回用量形態であってよく、例えば、パウチであってよい。

【0236】

40

7. 3. 重質乾燥/固形分(HDD)洗濯洗剤組成物

例示的なHDD洗濯用洗剤組成物は、アニオン性洗浄用界面活性剤(例えば、直鎖状又は分岐鎖状又は不規則鎖状の、置換又は非置換のアルキル硫酸塩、アルキルスルホン酸塩、アルキルアルコキシ化硫酸塩、アルキルリン酸塩、アルキルホスホン酸塩、アルキルカルボン酸塩、及び/又はそれらの混合物)、非イオン性洗浄用界面活性剤(例えば、直鎖状又は分岐鎖状又は不規則鎖状の、置換又は非置換のC₈~C₁₈アルキルエトキシレート、及び/又はC₆~C₁₂アルキルフェノールアルコキシレート)、カチオン性洗浄用界面活性剤(例えば、アルキルピリジニウム化合物、アルキル四級アンモニウム化合物、アルキル四級ホスホニウム化合物、アルキル三級スルホニウム化合物、及びそれらの混合物)、双性イオン性及び/又は両性洗浄用界面活性剤(例えば、アルカノールアミンス

50

ルホベタイン)、両性(ampholytic)界面活性剤、半極性非イオン性界面活性剤、及びそれらの混合物などの洗浄界面活性剤;リン酸塩非含有ビルダー(例えば、0wt%~10wt%未満の範囲のゼオライトビルダー、例としては、ゼオライトA、ゼオライトX、ゼオライトP及びゼオライトMAPなど)、リン酸塩ビルダー(例えば、0wt%~10wt%未満の範囲のトリポリリン酸ナトリウム)、クエン酸、クエン酸塩、及びニトリロ三酢酸、ケイ酸塩(例えば、0wt%~10wt%未満の範囲のケイ酸ナトリウム若しくはケイ酸カリウム若しくはメタケイ酸ナトリウム、又は層状ケイ酸塩(SKS-6));炭酸塩(例えば、0wt%~80wt%未満の範囲の炭酸ナトリウム及び/又は重炭酸ナトリウム)などのビルダー;光漂白剤(例えば、スルホン化亜鉛フタロシアニン、スルホン化アルミニウムフタロシアニン、キサンテン染料、及びそれらの混合物)、疎水性若しくは親水性の漂白活性剤(例えば、ドデカノイルオキシベンゼンスルホン酸塩、デカノイルオキシベンゼンスルホン酸塩、デカノイルオキシ安息香酸若しくはその塩、3,5,5-トリメチルヘキサノイルオキシベンゼンスルホン酸塩(3,5,5-trimethylhexanoyl oxybenzene sulfonate)、テトラアセチルエチレンジアミン(TAED)、ノナノイルオキシベンゼンスルホン酸塩(NOB S)、ニトリル第4級アンモニウム化合物(nitrile quat)、及びそれらの混合物)、過酸化水素源(例えば、例として、過ホウ酸、過炭酸、過硫酸、過リン酸、又は過ケイ酸の1水和物ナトリウム塩又は4水和物ナトリウム塩などの、無機過水和物塩)、予備形成済の親水性及び/若しくは疎水性の過酸(例えば、過カルボン酸及び塩、過炭酸及び塩、過イミド酸及び塩、ペルオキシ1硫酸及び塩、並びにそれらの混合物)などの漂白剤、並びに/又は漂白触媒(例えば、イミン漂白促進剤(例としては、イミニウムカチオン及びポリイオン)、イミニウム双性イオン、変性アミン、変性アミンオキシド、N-スルホニルイミン、N-ホスホニルイミン、N-アシルイミン、チアジアゾールジオキシド、全フッ素化イミン、環状糖ケトン、及びそれらの混合物など、並びに金属含有漂白触媒(例えば、亜鉛又はアルミニウムなどの補助的な金属カチオンと、エチレンジアミン四酢酸、エチレンジアミンテトラ(メチレンホスホン酸)及びその水溶性の塩などの金属イオン封鎖剤とを伴う、銅、鉄、チタン、ルテニウム、タングステン、モリブデン、又はマンガンのカチオン)を含む。

【0237】

組成物は、好ましくは酵素、例えば、プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ/オキシダーゼ、ペクチン酸リパーゼ、マンナナーゼ、クチナーゼ、ラッカーゼ、ホスホリパーゼ、リゾホスホリパーゼ、アシル基転移酵素、ペルヒドロラーゼ、アリアルエステラーゼ、及びこれらの任意の混合物を含む。

【0238】

組成物は、任意選択で、追加の洗剤成分、例えば、香料マイクロカプセル、デンプンカプセル化香料アコード、色調剤、追加のポリマー(布地一体性(fabric integrity)かつカチオン性のポリマーなど)、染料固定成分(dye-lock ingredient)、布地柔軟化剤、光沢剤(例えば、C. I. 蛍光増白剤)、凝集剤、キレート剤、アルコキシル化ポリアミン、布地付着補助剤、及び/又はシクロデキストリンを含んでもよい。

【0239】

7. 4. 自動食器洗い(ADW)洗剤組成物

例示的なADW洗剤組成物は、0~10重量%の量で存在する非イオン性界面活性剤(エトキシル化非イオン性界面活性剤、アルコールアルコキシル化界面活性剤、エポキシキャップされたポリ(オキシアルキル化)アルコール、又はアミンオキシド界面活性剤など);5~60%の範囲のビルダー[リン酸塩ビルダー(例えば、一リン酸塩、二リン酸塩、トリポリリン酸塩、他のオリゴマー性ポリリン酸塩(oligomeric-polyphosphate)、トリポリリン酸ナトリウム(STPP))、及びリン酸塩非含有ビルダー(例えば、メチルグリシン二酢酸(MGDA)並びにそれらの塩及び誘導体、グルタミン酸-N, N-二酢酸(GLDA)並びにそれらの塩及び誘導体、イミノジコハク酸(IDS)並びにそれらの塩及び誘導体、カルボキシメチルイヌリン並びにそれらの塩及び誘導体、ニトリロ三酢酸(NTA)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)、B-アラニン二酢酸(B

ーADA)、及びそれらの塩などのアミノ酸系化合物、0.5%~50重量%の範囲のポリカルボン酸のホモポリマー及びコポリマー並びにそれらの部分中和した又は完全中和した塩、単量体ポリカルボン酸及びヒドロキシカルボン酸、及びそれらの塩など)] ; 寸法安定性を付与するための、約0.1重量%~約50重量%の範囲のスルホン化/カルボキシ化ポリマー; 約0.1重量%~約10重量%の範囲の乾燥補助剤 [例えば、ポリエステル、特にアニオン性ポリエステルであって、任意選択で3~6個の官能基(典型的には、重縮合を促す酸、アルコール又はエステル官能基)を有する更なるモノマーを伴うもの、ポリカーボネート、ポリウレタン、及び/又はポリ尿素-ポリオルガノシロキサン化合物又はそれらの前駆化合物(特に反応性環状カーボネート及び尿素タイプのもの)] ; 約1重量%~約20重量%の範囲のケイ酸塩(例えば、二ケイ酸ナトリウム、メタケイ酸ナトリウム及び結晶質フィロケイ酸塩などのケイ酸ナトリウム又はケイ酸カリウム); 無機漂白剤(例えば、過ホウ酸塩、過炭酸塩、過リン酸塩、過硫酸塩、及び過ケイ酸塩などの過水和物塩)及び有機漂白剤(例えば、過酸化ジアシル及び過酸化テトラアシル、例えば、ジペルオキシドデカン二酸(diperoxydodecanedioic acid)、ジペルオキシテトラデカン二酸(diperoxytetradecanedioic acid)、及びジペルオキシヘキサデカン二酸(diperoxyhexadecanedioic acid)のような有機過酸); 漂白活性剤(即ち、約0.1重量%~約10重量%の範囲の有機過酸前駆物質); 漂白触媒(例えば、マンガントリアザシクロノナン及び関連する錯体、Co、Cu、Mn、及びFeビスピリジルアミン及び関連する錯体、並びにペンタミンアセタートコバルト(III)及び関連する錯体); 約0.1重量%~5重量%の範囲の金属処理剤(例えば、ベンゾトリアゾール(benzotriazole)、金属塩及び錯体、並びに/又はケイ酸塩); 自動食器洗浄用洗剤組成物1グラム当たり活性酵素約0.01~5.0mgの範囲の酵素(例えば、プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ/オキシダーゼ、ペクタートリアーゼ、マンナーゼ、クチナーゼ、ラッカーゼ、ホスホリパーゼ、リゾホスホリパーゼ、アシルトランスフェラーゼ、ペルヒドロラーゼ、アリアルエステラーゼ、及びそれらの混合物など); 並びに酵素安定剤成分(例えば、オリゴ糖、多糖類、及び無機二価金属塩など)を含む。

【0240】

7. 5. 追加の洗剤組成物

本発明のアミラーゼを加えることができる追加の洗剤配合物例を、以降の付番した段落に記載する。

【0241】

1) 少なくとも600g/Lのかさ密度を有する顆粒として配合される洗剤組成物であって、線状アルキルベンゼンスルホン酸塩(酸として計算)約7%~約12%と; アルコールエトキシ硫酸塩(例えば、 $C_{12} \sim 18$ アルコール、1-2エチレンオキシド(EO))又はアルキル硫酸塩(例えば、 $C_{16} \sim 18$)約1%~約4%と; アルコールエトキシシレート(例えば、 $C_{14} \sim 15$ アルコール、7EO)約5%~約9%と; 炭酸ナトリウム(例えば、 Na_2CO_3)約14%~約20%と; 可溶性ケイ酸塩(例えば、 Na_2O 、 $2SiO_2$)約2~約6%と; ゼオライト(例えば、 $NaAlSiO_4$)約15%~約22%と; 硫酸ナトリウム(例えば、 Na_2SO_4)0%~約6%と; クエン酸ナトリウム/クエン酸(例えば、 $C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$)約0%~約15%と; ナトリウム過ホウ酸塩(例えば、 $NaBO_3H_2O$)約11%~約18%と; T A E D約2%~約6%と; カルボキシメチルセルロース(CMC)及び0%~約2%と; ポリマー(例えば、マレイン酸/アクリル酸、コポリマー、PVP、PEG)0~3%と; 酵素(純粋な酵素として計算)0.0001~0.1%タンパク質と; 微量成分(例えば、抑泡剤、香料、光学的光沢剤、光漂白剤)0~5%とを含む、洗剤組成物。

【0242】

2) 少なくとも600g/Lのかさ密度を有する顆粒として配合される洗剤組成物であって、線状アルキルベンゼンスルホン酸塩(酸として計算)約6%~約11%と; アルコールエトキシ硫酸塩(例えば、 $C_{12} \sim 18$ アルコール、1-2EO)又はアルキル硫酸

塩（例えば、 $C_{16} \sim C_{18}$ ）約１％～約３％と；アルコールエトキシレート（例えば、 $C_{14} \sim C_{15}$ アルコール、７ＥＯ）約５％～約９％と；炭酸ナトリウム（例えば、 Na_2CO_3 ）約１５％～約２１％と；可溶性ケイ酸塩（例えば、 Na_2O 、 $2SiO_2$ ）約１％～約４％と；ゼオライト（例えば、 $NaAlSiO_4$ ）約２４％～約３４％と；硫酸ナトリウム（例えば、 Na_2SO_4 ）約４％～約１０％と；クエン酸ナトリウム／クエン酸（例えば、 $C_6H_5Na_3O_7 / C_6H_8O_7$ ）０％～約１５％と；カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）０％～約２％と；ポリマー（例えば、マレイン酸／アクリル酸コポリマー、ＰＶＰ、ＰＥＧ）１～６％と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）０．０００１～０．１％と；微量成分（例えば、抑泡剤、香料）０～５％とを含む、洗剤組成物。

【０２４３】

３）少なくとも６００ｇ／Ｌのかさ密度を有する顆粒として配合される洗剤組成物であって、直鎖状アルキルベンゼンスルホン酸塩（酸として計算）約５％～約９％と；アルコールエトキシレート（例えば、 $C_{12} \sim C_{15}$ アルコール、７ＥＯ）約７％～約１４％と；脂肪酸としての石鹼（例えば、 $C_{16} \sim C_{22}$ 脂肪酸）約１～約３％と；炭酸ナトリウム（ Na_2CO_3 として）約１０％～約１７％と；可溶性ケイ酸塩（例えば、 Na_2O 、 $2SiO_2$ ）約３％～約９％と；ゼオライト（ $NaAlSiO_4$ として）約２３％～約３３％と；硫酸ナトリウム（例えば、 Na_2SO_4 ）０％～約４％と；過ホウ酸ナトリウム（例えば、 $NaBO_3 \cdot H_2O$ ）約８％～約１６％と；ＴＡＥＤ約２％～約８％と；ホスホン酸塩（例えば、ＥＤＴＭＰＡ）０％～約１％と；カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）０％～約２％と；ポリマー（例えば、マレイン酸／アクリル酸コポリマー、ＰＶＰ、ＰＥＧ）０～３％と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）０．０００１～０．１％と；微量成分（例えば、抑泡剤、香料、光学的光沢剤）０～５％とを含む、洗剤組成物。

【０２４４】

４）少なくとも６００ｇ／Ｌのかさ密度を有する顆粒として配合される洗剤組成物であって、直鎖状アルキルベンゼンスルホン酸塩（酸として計算）約８％～約１２％と；アルコールエトキシレート（例えば、 $C_{12} \sim C_{15}$ アルコール、７ＥＯ）約１０％～約２５％と；炭酸ナトリウム（ Na_2CO_3 として）約１４％～約２２％と；可溶性ケイ酸塩（例えば、 Na_2O 、 $2SiO_2$ ）約１％～約５％と；ゼオライト（例えば、 $NaAlSiO_4$ ）約２５％～約３５％と；硫酸ナトリウム（例えば、 Na_2SO_4 ）０％～約１０％と；カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）０％～約２％と；ポリマー（例えば、マレイン酸／アクリル酸コポリマー、ＰＶＰ、ＰＥＧ）１～３％と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）０．０００１～０．１％と；微量成分（例えば、抑泡剤、香料）０～５％とを含む洗剤組成物。

【０２４５】

５）水性液体洗剤組成物であって、線状アルキルベンゼンスルホン酸塩（酸として計算）約１５％～約２１％と；アルコールエトキシレート（例えば、 $C_{12} \sim C_{15}$ アルコール、７ＥＯ又は $C_{12} \sim C_{15}$ アルコール、５ＥＯ）約１２％～約１８％と；脂肪酸としての石鹼（例えば、オレイン酸）約３％～約１３％と；アルケニルコハク酸（ $C_{12} \sim C_{14}$ ）０％～約１３％と；アミノエタノール約８％～約１８％と；クエン酸約２％～約８％と；ホスホン酸塩０％～約３％と；ポリマー（例えば、ＰＶＰ、ＰＥＧ）０％～約３％と；ホウ酸（例えば、 B_4O_7 ）０％～約２％と；エタノール０％～約３％と；プロピレングリコール約８％～約１４％と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）０．０００１～０．１％と；微量成分（例えば、懸濁剤、抑泡剤、香料、光学的光沢剤）０～５％とを含む、水性液体洗剤組成物。

【０２４６】

６）水性構成液体洗剤組成物であって、直鎖状アルキルベンゼンスルホン酸塩（酸として計算）約１５％～約２１％と；アルコールエトキシレート（例えば、 $C_{12} \sim C_{15}$ アルコール、７ＥＯ、又は $C_{12} \sim C_{15}$ アルコール、５ＥＯ）３～９％と；脂肪酸としての石鹼（例えば、オレイン酸）約３％～約１０％と；ゼオライト（ $NaAlSiO_4$ として）約１４％～約２２％と；クエン酸カリウム約９％～約１８％と；ホウ酸（例えば、 B_4O

10

20

30

40

50

7) 0%～約2%と；カルボキシメチルセルロース（CMC）0%～約2%と；ポリマー（例えば、PEG、PVP）0%～約3%と；固着ポリマー（例えば、ラウリルメタクリレート／アクリル酸コポリマー；モル比25：1、MW 3800など）0%～約3%と；グリセロール0%～約5%と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）0.0001～0.1%と；微量成分（例えば、分散剤、抑泡剤、香料、光学的光沢剤）0～5%とを含む、水性構成液体洗剤組成物。

【0247】

7) 少なくとも600g/Lのかさ密度を有する顆粒として配合される洗剤組成物であって、脂肪アルコール硫酸塩約5%～約10%と；エトキシ化脂肪酸モノエタノールアミド約3%～約9%と；脂肪酸としての石鹼0～3%と；炭酸ナトリウム（例えば、 Na_2CO_3 ）約5%～約10%と；可溶性ケイ酸塩（例えば、 Na_2O 、 2SiO_2 ）約1%～約4%と；ゼオライト（例えば、 NaAlSiO_4 ）約20%～約40%と；硫酸ナトリウム（例えば、 Na_2SO_4 ）約2%～約8%と；過ホウ酸ナトリウム（例えば、 $\text{NaBO}_3\text{H}_2\text{O}$ ）約12%～約18%と；TAED約2%～約7%と；ポリマー（例えば、マレイン酸／アクリル酸コポリマー、PEG）約1%～約5%と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）0.0001～0.1%と；微量成分（例えば、光学的光沢剤、抑泡剤、香料）0～5%と、を含む洗剤組成物。

【0248】

8) 顆粒として配合される洗剤組成物であって、直鎖状アルキルベンゼンスルホン酸塩（酸として計算）約8%～約14%と；エトキシ化脂肪酸モノエタノールアミド約5%～約11%と；脂肪酸としての石鹼0%～約3%と；炭酸ナトリウム（例えば、 Na_2CO_3 ）約4%～約10%と；可溶性ケイ酸塩（ Na_2O 、 2SiO_2 ）約1%～約4%と；ゼオライト（例えば、 NaAlSiO_4 ）約30%～約50%と；硫酸ナトリウム（例えば、 Na_2SO_4 ）約3%～約11%と；クエン酸ナトリウム（例えば、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ）約5%～約12%と；ポリマー（例えば、PVP、マレイン酸／アクリル酸コポリマー、PEG）約1%～約5%と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）0.0001～0.1%と；微量成分（例えば、抑泡剤、香料）0～5%と、を含む洗剤組成物。

【0249】

9) 顆粒として配合される洗剤組成物であって、線状アルキルベンゼンスルホン酸塩（酸として計算）約6%～約12%と；非イオン性界面活性剤約1%～約4%と；脂肪酸としての石鹼約2%～約6%と；炭酸ナトリウム（例えば、 Na_2CO_3 ）約14%～約22%と；ゼオライト（例えば、 NaAlSiO_4 ）約18%～約32%と；硫酸ナトリウム（例えば、 Na_2SO_4 ）約5%～約20%と；クエン酸ナトリウム（例えば、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ）約3%～約8%と；過ホウ酸ナトリウム（例えば、 $\text{NaBO}_3\text{H}_2\text{O}$ ）約4%～約9%と；漂白活性化剤（例えば、NOBS又はTAED）約1%～約5%と；カルボキシメチルセルロース（CMC）0%～約2%と；ポリマー（例えば、ポリカルボキシレート、又はPEG）約1%～約5%と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）0.0001～0.1%と；微量成分（例えば、光学的光沢剤、香料）0～5%とを含む、洗剤組成物。

【0250】

10) 水性液体洗剤組成物であって、直鎖状アルキルベンゼンスルホン酸塩（酸として計算）約15%～約23%と；アルコールエトキシ硫酸塩（例えば、 $\text{C}_{12\sim15}$ アルコール、2-3EO）約8%～約15%と；アルコールエトキシレート（例えば、 $\text{C}_{12\sim15}$ アルコール、7EO、又は $\text{C}_{12\sim15}$ アルコール、5EO）約3%～約9%と；脂肪酸としての石鹼（例えば、ラウリン酸）0%～約3%と；アミノエタノール約1%～約5%と；クエン酸ナトリウム約5%～約10%と；ヒドロトロップ（例えば、トルエンスルホン酸ナトリウム）約2%～約6%と；ホウ酸（例えば、 B_4O_7 ）0%～約2%と；カルボキシメチルセルロース0%～約1%と；エタノール約1%～約3%と；プロピレングリコール約2%～約5%と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）0.0001～0.1%と；微量成分（例えば、ポリマー、分散剤、香料、光学的光沢剤）0～5%とを

10

20

30

40

50

含む、水性液体洗剤組成物。

【0251】

11) 水性液体洗剤組成物であって、線状アルキルベンゼンスルホン酸塩（酸として計算）約20%～約32%と；アルコールエトキシレート（例えば、 $C_{12} \sim C_{15}$ アルコール、7EO、又は $C_{12} \sim C_{15}$ アルコール、5EO）6～12%と；アミノエタノール約2%～約6%と；クエン酸約8%～約14%と；ホウ酸（例えば、 B_4O_7 ）約1%～約3%と；ポリマー（例えば、マレイン酸／アクリル酸コポリマー、アンカリングポリマー、例えば、ラウリルメタクリレート／アクリル酸コポリマーなど）0%～約3%と；グリセロール約3%～約8%と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）0.0001～0.1%と；微量成分（例えば、ヒドロトロップ、懸濁剤、香料、光学的光沢剤）0～5%とを含む、水性液体洗剤組成物。

10

【0252】

12) 少なくとも600g/Lのかさ密度を有する顆粒として配合される洗剤組成物であって、アニオン性界面活性剤（線状アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキル硫酸塩、 α -オレフィンスルホン酸塩、 α -スルホ脂肪酸メチルエステル、アルカンスルホン酸塩、石鹼）約25%～約40%と；非イオン性界面活性剤（例えば、アルコールエトキシレート）約1%～約10%と；炭酸ナトリウム（例えば、 Na_2CO_3 ）約8%～約25%と；可溶性ケイ酸塩（例えば、 Na_2O 、 $2SiO_2$ ）約5%～約15%と；硫酸ナトリウム（例えば、 Na_2SO_4 ）0%～約5%と；ゼオライト（ $NaAlSiO_4$ ）約15%～約28%と；過ホウ酸ナトリウム（例えば、 $NaBO_3 \cdot 4H_2O$ ）0%～約20%と；漂白活性化剤（TAED又はNOBS）約0%～約5%と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）0.0001～0.1%と；微量成分（例えば、香料、光学的光沢剤）0～3%とを含む、洗剤組成物。

20

【0253】

13) 直鎖状アルキルベンゼンスルホン酸塩の全て、又は一部が、（ $C_{12} \sim C_{18}$ ）アルキル硫酸塩によって置換されている、上記組成物1)～12)に記載した、洗剤組成物。

【0254】

14) 少なくとも600g/Lのかさ密度を有する顆粒として配合される洗剤組成物であって、（ $C_{12} \sim C_{18}$ ）アルキル硫酸塩約9%～約15%と；アルコールエトキシレート約3%～約6%と；ポリヒドロキシアルキル脂肪酸アミド約1%～約5%と；ゼオライト（例えば、 $NaAlSiO_4$ ）約10%～約20%と；層状二ケイ酸塩（例えば、Hoechst製SK56）約10%～約20%と；炭酸ナトリウム（例えば、 Na_2CO_3 ）約3%～約12%と；可溶性ケイ酸塩（例えば、 Na_2O 、 $2SiO_2$ ）0%～約6%と；クエン酸ナトリウム約4%～約8%と；過炭酸ナトリウム約13%～約22%と；TAED約3%～約8%と；ポリマー（例えば、ポリカルボン酸塩及びPVP）0%～約5%と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）0.0001～0.1%と；微量成分（例えば、光学的光沢剤、光漂白剤、香料、抑泡剤）0～5%とを含む、洗剤組成物。

30

【0255】

15) 少なくとも600g/Lのかさ密度を有する顆粒として配合される洗剤組成物であって、（ $C_{12} \sim C_{18}$ ）アルキル硫酸塩約4%～約8%と；アルコールエトキシレート約11%～約15%と；石鹼約1%～約4%と；ゼオライトMAP又はゼオライトA約35%～約45%と；炭酸ナトリウム（ Na_2CO_3 として）約2%～約8%と；可溶性ケイ酸塩（例えば、 Na_2O 、 $2SiO_2$ ）0%～約4%と；過炭酸ナトリウム約13%～約22%と；TAED 1～8%と；カルボキシメチルセルロース（CMC）0%～約3%と；ポリマー（例えば、ポリカルボン酸塩及びPVP）0%～約3%と；酵素（純粋な酵素タンパク質として計算）0.0001～0.1%と；微量成分（例えば、光学的光沢剤、ホスホン酸塩、香料）0～3%とを含む、洗剤組成物。

40

【0256】

16) 上記1)～15)に記載される通りの洗剤配合物であって、追加成分として、又

50

はすでに記載されている漂白系の代替として、安定化又は封入された過酸を含有する配合物。

【0257】

17) 上記1)、3)、7)、9)、及び12)に記載される通りの洗剤配合物であって、過ホウ酸塩が過炭酸塩により置き換えられている、配合物。

【0258】

18) 上記1)、3)、7)、9)、12)、14)、及び15)に記載される通りの洗剤配合物であって、マンガン触媒を更に含有する、配合物。マンガン触媒は、例えば、「Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching,」Nature 369:637~639 (1994)に記載の化合物のうちの1つである。

10

【0259】

19) 液体非イオン性界面活性剤、例えば、線状アルコキシル化一級アルコールなど、ビルダー系（例えば、リン酸）、及び酵素（1種又は複数種）、及びアルカリを含む非水性洗剤液体として配合された洗剤組成物。洗剤には、アニオン性界面活性剤及び／又は漂白系を含ませることもできる。

【0260】

上記の通り、本発明のアミラーゼポリペプチドは、従来洗剤において採用されていた濃度で組み込むことができる。本発明では、洗剤組成物において、酵素は、洗浄液1L当たり0.00001~1.0mg（純粋な酵素タンパク質として計算）のアミラーゼポリペ

20

【0261】

洗剤組成物には、その他の従来の洗剤原材料、例えば、解膠剤、充填材、消泡剤、抗腐食剤、汚れ懸濁剤、金属イオン封鎖剤、抗汚れ再付着剤、脱水剤、染料、殺菌剤、蛍光剤、増粘剤、及び香料も含有させることができる。

【0262】

洗剤組成物は、染みの付着した布地の前処理剤、及びすすぎ時添加型布地柔軟剤組成物に好適な洗濯添加剤組成物を含む、手洗い（手動）又は機械（自動）洗濯洗剤組成物として配合することもでき、あるいは一般的な家庭用硬質表面洗浄操作で使用するための洗剤組成物として配合することもでき、あるいは手動又は自動食器洗い操作のために配合することもできる。

30

【0263】

本明細書に記載の任意の洗浄組成物には任意の数の追加の酵素を含有させることもできる。一般的には、酵素（1種又は複数種）は選択された洗剤と適合する必要がある（例えば、最適pHが適合する、その他の酵素及び非酵素成分と適合するなど）、並びに酵素（1種又は複数種）は有効な量で存在させる必要がある。次の酵素が例として提供される。

【0264】

プロテアーゼ：好適なプロテアーゼとしては、動物、野菜又は微生物起源のものが挙げられる。化学修飾した又はタンパク質を遺伝子操作した変異体、並びに天然にプロセシングを受けたタンパク質が含まれる。プロテアーゼは、セリンプロテアーゼ又はメタロプロテアーゼ、アルカリ性微生物プロテアーゼ、トリプシン様プロテアーゼ、又はキモトリプシン様プロテアーゼであってよい。アルカリプロテアーゼの例は、例えばバチルス（Bacillus）由来のサブチリシン、例えば、サブチリシンNovo、サブチリシンCarlsberg、サブチリシン309、サブチリシン147及びサブチリシン168である（例えば、国際公開第89/06279号を参照）。トリプシン様プロテアーゼの例は、トリプシン（例えば、ブタ又はウシ起源のもの）、フザリウム（Fusarium）プロテアーゼ（例えば、国際公開第89/06270号及び国際公開第94/25583号を参照）である。有用プロテアーゼの例としては、国際公開第92/19729号、国際公開第98/20115号、国際公開第98/20116号、及び国際公開第98/34946号に記載の変異体も挙げられるがこれらに限定されない。市販のプロテアーゼ酵素としては、ALC

40

50

ALASE (登録商標)、SAVINASE (登録商標)、PRIMASE (商標)、DURALASE (商標)、ESPERASE (登録商標)、KANNAASE (商標)、及びBLAZE (商標) (Novo Nordisk A/S及びNovozymes A/S)、MAXATASE (登録商標)、MAXACAL (商標)、MAXAPEM (商標)、PROPERASE (登録商標)、PURAFECT (登録商標)、PURAFECT OXP (商標)、FN2 (商標)、及びFN3 (商標) (Danisco US Inc.) が挙げられるがこれらに限定されない。その他のプロテアーゼの例としては、バチルス・アミロリキファシエンス (*Bacillus amylo liquifaciens*) 由来のNp r E、及びセルロモナス種 (*Cellulomonas* sp.) 株69B4由来のASPが挙げられる。

【0265】

リパーゼ：好適なリパーゼとしては、細菌又は真菌由来のものが挙げられる。化学修飾した、若しくはタンパク質分解により修飾された、又はタンパク質を遺伝子操作した変異体が含まれる。有用なリパーゼの例としては、フミコラ (*Humicola*) 由来のリパーゼ (異名：サーモマイセス (*Thermomyces*)) 例えば、H. ラヌギノーサ由来 (H. lanuginosa) (T. ラヌギノサス (*T. lanuginosus*)) (例えば、欧州特許第258068号及び欧州特許第305216号を参照されたい)、H. インソレン (*H. insolens*) 由来 (例えば、国際公開第96/13580号を参照されたい)、シュードモナス (*Pseudomonas*) リパーゼ (例えば、P. アルカリゲネス (*P. alcaligenes*) 又はP. シュードアルカリゲネス (*P. pseudoalcaligenes*))、例えば、欧州特許第218 272号を参照されたい)、P. セパシア (*P. cepacia*) (例えば、欧州特許第331 376号を参照されたい)、P. スツツェリ (*P. stutzeri*) (例えば、英国特許第1, 372, 034号を参照されたい)、P. フルオレセンス (*P. fluorescens*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) 種の株SD 705 (例えば、国際公開第95/06720号及び国際公開第96/27002号を参照されたい)、P. ウィスコンシンシ (*P. wisconsinensis*) (例えば、国際公開第96/12012号を参照されたい)、バチルス (*Bacillus*) リパーゼ (例えば、B. スブチリシン (*B. subtilis*))、例えば、Dartois et al. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131: 253~360 (1993) を参照されたい)、B. ステアロサーモフィル (*B. stearothermophilus*) (例えば、日本特許第64/744992号を参照されたい)、又はB. プミル (*B. pumilus*) (例えば、国際公開第91/16422号を参照されたい) が挙げられるがこれらに限定されない。配合物に用いることが考えられる追加のリパーゼ変異体としては、例えば、国際公開第92/05249号、国際公開第94/01541号、国際公開第95/35381号、国際公開第96/00292号、国際公開第95/30744号、国際公開第94/25578号、国際公開第95/14783号、国際公開第95/22615号、国際公開第97/04079号、国際公開第97/07202号、欧州特許第407225号、及び欧州特許第260105号、に記載のものが挙げられる。幾つかの市販のリパーゼ酵素としては、Lipolase (登録商標) 及びLipolase Ultra (商標) (Novo Nordisk A/S及びNovozymes A/S) が挙げられる。

【0266】

ポリエステラーゼ：例えば、国際公開第01/34899号、国際公開第01/14629号、及び米国特許第6933140号に記載のものなどの好適なポリエステラーゼを組成物に含有させることができる。

【0267】

アミラーゼ：この組成物は、生産性を増強させるものではないアミラーゼなどの、アミラーゼと組み合わせることができる。これらとしては、STAINZYME (登録商標)、NATALASE (登録商標)、DURAMYL (登録商標)、TERMAMYL (登録商標)、FUNGAMYL (登録商標) 及びBAN (商標) (Novo Nordisk A/S及びNovozymes A/S) ; RAPIDASE (登録商標)、POWERASE (登録商標)、及びPURASTAR (登録商標) (Danisco US Inc.) などの市販のアミラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【0268】

セルラーゼ：セルラーゼを組成物に加えることができる。好適なセルラーゼには、細菌又は真菌由来のものが含まれる。化学修飾した突然変異体又はタンパク質を遺伝子操作した突然変異体が含まれる。好適なセルラーゼとしては、バチルス (*Bacillus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、フミコラ (*Humicola*) 属、フザリウム (*Fusarium*) 属、チエラビア (*Thielavia*) 属、アクレモニウム (*Acremonium*) 属由来のセルラーゼ、例えば、米国特許第 4, 435, 307 号、米国特許第 5, 648, 263 号、米国特許第 5, 691, 178 号、米国特許第 5, 776, 757 号、及び国際公開第 89/09259 号などに開示される、フミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、ミセリオフトラ・テルモフィラ (*Myceliophthora thermophila*) 及びフザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) から生成される真菌セルラーゼが挙げられる。用いることが企図された典型的なセルラーゼは、布に対し有益な色ケア効果を有するものである。このようなセルラーゼの例は、例えば、欧州特許第 0495257 号、欧州特許第 0531372 号、国際公開第 96/11262 号、国際公開第 96/29397 号、及び国際公開第 98/08940 号に記載のセルラーゼである。その他の例は、国際公開第 94/07998 号、国際公開第 98/12307 号、国際公開第 95/24471 号、国際出願 PCT/DK98/00299 号、欧州特許第 531315 号、米国特許第 5, 457, 046 号、米国特許第 5, 686, 593 号、及び米国特許第 5, 763, 254 号に記載のものなどのセルラーゼ変異体である。市販のセルラーゼとしては、CELLULZYME (登録商標) 及び CAREZYME (登録商標) (Novo Nordisk A/S 及び Novozymes A/S); CLAZINASE (登録商標) 及び PURADAX HA (登録商標) (Danisco US Inc.); 及び KAC-500 (B) (商標) (Kao Corporation) が挙げられる。

10

20

【0269】

ペルオキシダーゼ／オキシダーゼ：上記組成物に用いることが考えられる好適なペルオキシダーゼ／オキシダーゼには、植物、細菌又は真菌起源のものが含まれる。化学修飾した突然変異体又はタンパク質を遺伝子操作した突然変異体が含まれる。有用なペルオキシダーゼの例としては、国際公開第 93/24618 号、国際公開第 95/10602 号、及び国際公開第 98/15257 号に記載される、コプリナス由来、例えば、C. シネレウス (*C. cinereus*) 由来のペルオキシダーゼ、及びそれらの変異体が挙げられる。市販のペルオキシダーゼとしては、例えば、Guardzyme (商標) (Novo Nordisk A/S 及び Novozymes A/S) が挙げられる。

30

【0270】

洗剤組成物には、2, 6- β -D-フルクタン加水分解酵素を含ませてもよく、これは、家庭用及び／又は工業用織物／洗濯物上に存在するバイオフィルムの除去／洗浄に有効である。

【0271】

洗剤酵素 (1 種又は複数種) は、1 種以上の酵素を含有する別個の添加剤を加えることにより、又はこれらの酵素の全てを含む組み合わせた添加剤を加えることにより、洗剤組成物に含有させることもできる。洗剤添加剤、即ち、別個の添加剤又は組み合わせた添加剤は、例えば、顆粒剤、液体、及びスラリーなどとして配合することができる。洗剤添加剤配合物の例としては、顆粒、特に非散布顆粒、液体、特に安定化された液体又はスラリーが挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0272】

非散布顆粒は、米国特許第 4, 106, 991 号及び同第 4, 661, 452 号に開示される通りに生成されてもよく、場合により、当該技術分野において既知の方法によりコーティングされてもよい。ワックスコーティング材料の例は、平均分子量 1, 000~20, 000 を有するポリ (エチレンオキシド) 製品 (例えば、ポリエチレングリコール、PEG)、16~50 個のエチレンオキシド単位を有するエトキシ化ノニルフェノール、エトキシ化脂肪アルコール (ここで、アルコールは、12~20 個の炭素原子を含有し、

50

15～80個のエチレンオキシド単位が存在する)、脂肪アルコール、脂肪酸、及び脂肪酸のモノ及びジ及びトリグリセリドである。流動層技術による適用に適したフィルム形成コーティング材料の例は、例えば、英国特許第1483591号において与えられる。液体酵素調製物は、例えば、確立された方法に従い、ポリオール(プロピレングリコールなど)、糖又は糖アルコール、乳酸又はホウ酸を添加することにより、安定化させてもよい。保護化酵素(Protected enzyme)を、欧州特許第238,216号に開示される方法に従い調製してもよい。

【0273】

洗剤組成物は、任意の便利な形態であってよく、例えば、バー、錠剤、粉末、顆粒、ペースト、又は液体であってよい。液体洗剤は水性であってよく、典型的には、最大で約70%の水及び0%～約30%の有機溶媒を含有する。約30%以下の水を含有するコンパクト洗剤ジェルも想到される。洗剤組成物には、場合により1種以上の界面活性剤を含ませることができ、界面活性剤は、半極性などの非イオン性及び／又はアニオン性及び／又はカチオン性及び／又は双極性であってよい。界面活性剤は、約0.1重量%～約60%重量%の広範な範囲で存在させることができる。

10

【0274】

含有させる際、洗剤には、典型的には、約1%～約40%でアニオン性界面活性剤、例えば、線状アルキルベンゼンスルホン酸塩、 α -オレフィンスルホン酸塩、アルキル硫酸塩(脂肪族アルコール硫酸塩)、アルコールエトキシ硫酸塩、第二級アルカンスルホン酸塩、 α -スルホ脂肪酸メチルエステル、アルキル又はアルケニルコハク酸、又は石鹼などを含有させる。

20

【0275】

含有させる際、洗剤には、通常、約0.2%～約40%で非イオン性界面活性剤、例えば、アルコールエトキシレート、ノニルフェノールエトキシレート、アルキルポリグリコシド、アルキルジメチルアミノオキシド、エトキシ化脂肪酸モノエタノールアミド、脂肪酸モノエタノールアミド、ポリヒドロキシアルキル脂肪酸アミド、又はグルコサミンのN-アシル-N-アルキル誘導体(「グルカミド」)を含有させる。

【0276】

洗剤には、0～約65%で洗剤ビルダー、又は錯化剤、例えば、ゼオライト、二リン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、ニトロ三酢酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸、アルキル又はアルケニルコハク酸、可溶性ケイ酸塩又は層状ケイ酸塩(例えば、HoechstのSKS-6)を含有させてもよい。

30

【0277】

前記洗剤は、1種類以上のポリマーを含んでいてもよい。ポリマーの例としては、カルボキシメチルセルロース(CMC)、ポリ(ビニルピロリドン)(PVP)、ポリ(エチレングリコール)(PEG)、ポリ(ビニルアルコール)(PVA)、ポリ(ビニルピリジン-N-オキシド)、ポリ(ビニルイミダゾール)、ポリカルボキシレート、例えば、ポリアクリレート、マレイン酸/アクリル酸コポリマー類)、及びラウリルメタクリレート/アクリル酸コポリマー類が挙げられる。

40

【0278】

洗剤組成物の酵素(1種又は複数種)は、従来の安定化剤、例えば、ポリオール(例えば、プロピレングリコール又はグリセロール)、糖又は糖アルコール、乳酸、ホウ酸、又はホウ酸誘導体(例えば、芳香族ホウ酸エステル)、又はフェニルボロン酸誘導体(例えば、4-ホルミルフェニルボロン酸)を使用して安定化することもできる。組成物は、国際公開第92/19709号及び国際公開第92/19708号に記載の通りに配合することができる。

【0279】

洗剤組成物には、特に酵素変異体を、洗浄液1L当たり酵素タンパク質約0.01～約100mgに相当する量で加えることができるものと想到される(例えば、洗浄液1L当

50

たり約0.05～約5.0mgの酵素タンパク質、又は洗浄液1L当たり0.1～約1.0mgの酵素タンパク質)。

【0280】

本発明の組成物及び方法は以降の詳細を参照して記載されているものの、多様な変更をなすことができることは理解されたい。

【0281】

7. 6. 洗剤組成物中のアミラーゼ活性を評価する方法

見本及び微小見本によるアッセイなど、数多くのグルコアミラーゼ洗浄アッセイが当該技術分野において既知である。添付の実施例は、このようなアッセイをほんの僅かに記載する。

【0282】

8. 醸造組成物

A f G A T R又はその変異体は、醸造物などの発酵飲料を提供するプロセスにおいて使用される醸造組成物の成分であってもよい。非発酵性炭水化物は、最終的なビール中に溶解している固体の大部分を占めると考えられる。この残留物は、デンプンの $\alpha-1, 6$ 結合を加水分解する麦芽アミラーゼが作用しないために残留する。非発酵性炭水化物は、約340グラム(12オンス)のビール当たり約50カロリーをもたらす。通常、A f G A T R又はその変異体を、グルコアミラーゼ、並びに任意選択でプルラナーゼ、及び／又はイソアミラーゼと組み合わせることで、デンプンのデキストリン及び発酵性の糖への変換が補助され、最終的なビール中の残存非発酵性炭水化物が減少する。

【0283】

これらの飲料の製造に使用される主要な原材料は、水、ホップ、及び麦芽である。加えて、限定するものではないが、一般的なコーングリッツ、精製コーングリッツ、醸造者により粉碎された酵母、米、ソルガム、精製コーンデンプン、大麦、大麦デンプン、脱穀された大麦、小麦、小麦デンプン、炒って加熱処理された穀草、穀草フレーク、ライ麦、オーツ麦、ジャガイモ、タピオカ、及びシロップ、例えばトウモロコシシロップ、サトウキビシロップ、反転型糖シロップ、大麦及び／又は小麦シロップ、並びに同様物などの補助剤をデンプン源として使用することもできる。

【0284】

数多くの理由により、選別された大麦品種から主として生産される麦芽は、ビールの一般的な特徴及び品質に重要な影響を与える。第1に、麦芽はビールにおける主要な風味剤である。第2に、麦芽は発酵性糖の大部分を提供する。第3に、麦芽はビールのボディ及び泡の特徴に寄与するタンパク質を提供する。第4に、麦芽はマッシュ中に必要な酵素活性を提供する。ホップも、風味を含むビールの品質に大きく寄与する。具体的には、ホップ(又はホップ構成成分)は、好ましい苦味物質をビールに加える。加えて、ホップはタンパク質沈殿剤として作用し、防腐剤となり、泡の形成及び安定化を補助し得る。

【0285】

工業醸造のため、及び家庭内醸造のための両方の醸造に関し、大麦、オーツ麦、小麦などの穀草(穀物)だけでなく、多くの場合、トウモロコシ及び米もまた使用され、ホップなどのその他の植物成分が加えられることも多い。醸造に使用される成分は、麦芽生成されていなくてもよく、あるいは麦芽生成されていてよく、即ち、部分的に発芽させ、結果として、 α アミラーゼを含む酵素濃度を上昇させることもできる。首尾よく醸造するため、発酵に適切な濃度の糖を保証するため、 α アミラーゼ酵素の活性レベルは適切である必要がある。A f G A T R又はその変異体はまた、醸造に使用される成分に添加され得る。

【0286】

本明細書において用いられている用語「ストック」とは、圧搾又は破壊された穀物及び植物成分を意味する。例えば、ビールの生産に使用される大麦は、発酵用マッシュの生産に適切な稠度を得るため、粗く磨砕し又は破碎した穀粒である。本明細書において用いられている用語「ストック」は、破碎又は粗く磨砕された形態の、前述の種類の植物又は穀物のいずれかを含む。本明細書に記載の方法を使用して、製粉穀物及びストックの両方に

おける α アミラーゼ活性のレベルを判定することもできる。

【0287】

ビールの製造プロセスは当該技術分野において周知である。例えば、Wolfgang Kunze (2004) 「Technology Brewing and Malting」, Research and Teaching Institute of Brewing, Berlin (VLB), 3rd edition. を参照されたい。簡潔に述べると、プロセスは、(a) マッシュを調製すること、(b) マッシュを濾過して糖化液を調製すること、及び(c) 糖化液を発酵させて、ビールなどの発酵飲料を得ること、を包含する。典型的には、粉碎若しくは破碎麦芽、麦芽及び補助剤、又は補助剤を水と混合し、調節温度下で一定時間保持して、麦芽中に存在する酵素及び／又は補助剤に、麦芽中に存在するデンプンを発酵性糖類に変換させる。次にマッシュをマッシュフィルタに移し、穀物残渣から液体を分離する。この甘い液体は「糖化液」と呼ばれ、残りの穀粒残基は「消費済み穀粒」と呼ばれる。典型的には、マッシュに水を加えて消費済み穀粒から残留可溶抽出物を回収することを含む、マッシュの抽出を行う。次に糖化液を激しく沸騰させて糖化液を滅菌し、色、風味及び匂いの展開を補助する。沸騰中のどこかの時点でホップを加える。糖化液を冷却し、発酵層に移す。

10

【0288】

次に、発酵槽内で糖化液を酵母と接触させる。発酵槽を冷却し、発酵を停止させてもよい。凝集し得る酵母は除去する。最後に、ビールを冷却して一定時間貯蔵する。貯蔵中に、ビールが澄明になり、ビールの風味が生じ、ビールの見た目、風味及び貯蔵寿命を損なう可能性のある任意の物質が沈降する。ビールは、通常、約2%～約10% v/vのアルコールを含有するものの、高アルコール含量（例えば、18% v/v）のビールを得ることもできる。充填前、ビールには炭酸を加え、所望により、濾過及び低温殺菌する。

20

【0289】

α アミラーゼを、グルコアミラーゼ（類）（例えば、AfGATR又はその変異体）、プルラン（類）及び／又はイソアミラーゼ（類）、並びにそれらの任意の組み合わせなどの1種以上の外因性酵素と併せて含む場合が多い（必ずしもそうでなくともよい）醸造組成物は、上記工程(a)のマッシュに、即ち、マッシュの調製中に添加されてもよい。代わりに又は加えて、醸造組成物を、マッシュの濾過中などに、上記工程(b)のマッシュに加えることもできる。あるいは、又は加えて、醸造組成物を、糖化液の発酵中などに、上記工程(c)の糖化液に加えることもできる。

30

【0290】

個々の実施形態は、上記の使用、方法、又は発酵飲料のいずれかに関し、上記発酵飲料は、フルモルトビール、「ビール純粋令」に従って醸造されたビール、エール、IPA、ラガー、ピター、発泡酒（第二のビール）、第三のビール、ドライビール、ニアビール、ライトビール、低アルコールビール、低カロリービール、ポーター、ボックビール、スタウト、麦芽酒、ノンアルコールビール、及びノンアルコール麦芽酒などのビールだけでなく、別の穀草及び麦芽飲料、例えば、果実風味の麦芽飲料（例えば、レモン、オレンジ、ライムなどのシトラス風味、若しくはベリー風味の麦芽飲料）、蒸留酒風味の麦芽飲料（例えば、ウォッカ、ラム、又はテキーラ風味の麦芽酒）、又はコーヒー風味の麦芽飲料（カフェイン風味の麦芽酒など）、及びこれらに類するものである。

40

【0291】

9. ヨウ素陽性デンプンの減少

AfGATR及びその変異体は、液化及び／又は糖化方法において使用された場合、ヨウ素陽性デンプン（IPS）を減少させ得る。IPSの供給源の1つは、加水分解を逃れたアミロースに由来し、及び／又はデンプンポリマーの老化に由来する。デンプン分子には、別の分子に結合し、結晶化度を増加させる傾向があるため、時間経過とともに、デンプンの老化はデンプンペースト、又はジェルに自然に生じる。低濃度の溶液は、デンプン分子が積極的により大きな物体へと会合するため、濁度が増加する。沈殿が自然発生した場合、沈殿したデンプンは、その元来の冷水不溶性の状態を取り戻しているように思われ

50

る。高濃度のペーストは、冷却によりジェルに変化し、時間経過とともに、デンプン分子の会合が増加することにより着実に堅固さを増す。これは、近接するデンプン分子上のヒドロキシ基間に水素結合が形成される傾向が強くあることから生じる。J. A. Radley, ed., STARCH AND ITS DERIVATIVES 194~201 (Chapman and Hall, London (1968)) を参照のこと。

【0292】

糖液中にIPSが存在すると、最終生成物の品質に悪影響が生じ、下流の加工で重要な問題となる。IPSは濾過系に詰まり又は減速させ、精製に使用される炭素カラムを塞ぐ。IPSが十分な高濃度に達すると、IPSは炭素カラムを通過して漏れだし、生産効率を低下させる。加えて貯蔵時に、最終生成物に、最終生成物の品質に望ましくない濁りを生じさせる恐れがある。IPSの量は、糖化槽を隔離し、内容物を戻し混合することにより減少させることができる。それでも尚、IPSは、とりわけ炭素カラム及び濾過系に蓄積する。したがって、AfGATR又はその変異体の使用は、IPSの量を減少させることにより全体としてのプロセスの性能を向上させるものと見込まれる。

10

【0293】

組成物及び方法、並びにそれらの利点を更に例示するために、後述の具体的な実施例が、これらの実施例が限定的なものではなく例示的なものであるとの理解の下に提供される。

【実施例】

【0294】

20

実施例1：AfGA1のクローニング

アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) Af293のゲノムDNAは、Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, MO (FGSC A1100) から購入された。アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) のゲノムを配列決定した。NCBIデータベースで、AfGA1遺伝子 (NCBI参照配列NC_007195において開示されているゲノム内) の核酸配列、及びAfGA1遺伝子でコードされた予測済みグルカン1, 4- α -グルコシダーゼ (NCBI受託番号: XP_749206) のアミノ酸配列を取得した。AfGA1は、BLAST検索から決定された他の真菌グルコアミラーゼに対して相同であった。図1を参照されたい。3個のイントロンを含むAfGA1遺伝子のヌクレオチド配列が、配列番号8に示される。

30

【0295】

次のプライマー、即ち、プライマー1：AfGA1-Fw 5'-GCG GCGGC CGC ACC atg cct c g c c t t t c c t a c g c-3' (配列番号9)、及びプライマー2：AfGA1-Rv 5'-cc g g c g c g c c c TTA t c a c t g c c a a g t a t c a t t c t c g-3' (配列番号10) を使用して、AfGA1遺伝子をアスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) ゲノムDNAから増幅させた。順方向プライマーはNotI制限部位を含み、逆方向プライマーはAscI制限部位を含む。NotI及びAscIを用いた分解後、PCR産物は、同じ制限酵素によって分解される、pTrex3gM発現ベクター (米国特許出願公開第2011/0136197 (A1) 号に記載されている) にクローニングされ、結果として得られたプラスミドは、pJG222と標識された。pJG222のプラスミドマップは、図2に与えられている。AfGA1遺伝子の配列をDNA配列決定により確認した。

40

【0296】

実施例2：AfGA1TRの発現及び精製

遺伝子銃法 (Te'o et al., J. Microbiol. Methods 51: 393~99, 2002) を使用して、プラスミドpJG222 (Trex3gM-AfGA1) を、4つの遺伝子を欠失させたトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 株 (国際公開第05/001036号に記載) に形質転換させた。形質転換されたコロニー (約50) は約1週間で出現した。アセトアミドプレートに5日間生育させた後、タ

50

ンパク質発現のための30mlのグルコース／セファロース規定培地を含む250mlの振盪フラスコに、コロニーを接種した。タンパク質、AfGA1TRを、細胞外培地に分泌させ、酵素の発現を確認するために、濾過した培養培地を使用して、DP7に対するSDS-PAGE及びグルコアミラーゼ活性のアッセイを行った。

【0297】

その後、安定した株を7Lの発酵槽内の規定培地で生育させた。発酵ブロスを経心分離により収穫した。遠心分離、濾過及び濃縮に続いて、450mLの濃縮試料が得られた。試料中の総タンパク質の濃度は、BCA方法（タンパク質定量キット（Shanghai Generay Biotech CO., Ltd））を用いて、83.70g/Lと値付けされた。SDS-PAGE解析により、総タンパク質の80%が標的タンパク質であることが示唆された。よって、濃縮試料中の標的タンパク質の濃度は、66.96g/Lであると推定された。

【0298】

AKTA Explorer 100 FPLCシステム（GE Healthcare）を用いて、AfGA1TRを親和性クロマトグラフィーで精製した。βシクロデキストリン（Sigma-Aldrich, 856088）をエポキシ活性セファロースビーズ（GE Healthcare, 17-0480-01）にカップリングし、精製に用いた。7L発酵槽からの濃縮済み発酵ブロス40mLのpHを4.3になるように調整し、25nM（pH 4.3）の酢酸ナトリウム（バッファA）で予め平衡化した溶液を、30mLのβ-CD-セファロースカラムに充填した。カラムを2カラム体積のバッファAで洗浄した。標的タンパク質を、バッファA及び10mMのαシクロデキストリン（Sigma-Aldrich, C4642）含有の3カラム体積のバッファBで溶出させた。画分をSDS-PAGEゲルにより解析し、グルコアミラーゼ活性についてアッセイした。標的タンパク質を含有する画分をプールし、HiPrep 26×10脱塩カラムに流して、βシクロデキストリンを除去した。得られた試料は純度95%超のものであった。その溶液を濃縮し、10K Amicon Ultra-15デバイスを用いて、40%グリセロール中で-80℃にて保管した。

【0299】

実施例3：AfGA1TR基質特異性の値付け

マルトース、イソマルトース、マルトヘプタオース（DP7）、マルトデキストリン（DE4～DE10）、ジャガイモアミロペクチン、及び可溶性デンプンを含む様々な基質に由来するグルコアミラーゼ、AfGA1TR、AnGA又は野生型AfGAを介したグルコースの放出に基づいて、グルコアミラーゼ活性をアッセイした。カップリング済みグルコースオキシダーゼ／ペルオキシダーゼ（GOX／HR）法を用い、グルコースの放出速度を測定した（Anal. Biochem. 105（1980），389～397）。グルコースと反応するカップリング済みGOX／HRP酵素から生成された過酸化物を介した、2,2'-アジノービス3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸（ABTS）の酸化の速度として、グルコースを定量した。

【0300】

15mLのコニカルチューブで、9mLの各基質（1%水溶液、w/w）、及び1mL（0.5M、pH 5.0）の酢酸ナトリウム緩衝液を混合して、基質溶液を調製した。GOX／HRPを50mMの酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）中に溶解し、最終濃度2.74mg/mL ABTS、0.1U/mL HRP、及び1U/mL GOXにて、ABTSを含むカップリング済み酵素（GOX／HRP）溶液を調製した。

【0301】

連続希釈のグルコアミラーゼサンプル、ベンチマークAnGA（Genencor製、Optidex L-400）、野生型AfGA、及びグルコース標準液もまた、50mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）で調製した。50℃で5分間600rpmにて事前にインキュベートした90μLの基質溶液を含有する新しいマイクロタイタープレート（Corning 3641）に、各グルコアミラーゼサンプル（10μL）を移した

。サーモミキサー（Eppendorf）で振盪させながら（600 rpm）50℃で10分間反応を実施し、10 μLの反応混合物及び10 μLの連続希釈のグルコース標準液を新しいマイクロタイタープレート（Corning 9017）に、それぞれ速やかに移し、続いて、100 μLのABTS／GOX／HRP溶液を加えた。SoftMaxプロプレートリーダー（Molecular Device）で、405 nmで11秒間隔にて5分間、反応混合物を含有するマイクロタイタープレートを直ちに測定した。出力を各酵素濃度に対する反応速度V_oとした。直線回帰を用い、酵素用量に対するプロット（V_o）の勾配を値付けした。下記の式1を用い、グルコース標準曲線に基づいてグルコアミラーゼ活性の比活性を計算した。

$$\text{比活性 (単位/mg)} = \text{スロープ (酵素)} / \text{スロープ (std)} \times 100 \quad (1)、$$

式中、1単位=1 μmolグルコース/minである。

【0302】

AfGA1TR、並びにベンチマークグルコアミラーゼであるAnGA及び野生型AfGAの、典型的な比活性を、表1に示す。

【0303】

【表3】

表1. 様々な基質に対する精製グルコアミラーゼの比活性

基質	比活性 (U/mg)		
	AnGA	野生型AfGA	AfGA1TR
マルトース (DP2)	29.2	29.2	42.7
イソマルトース	0	0.6	0.9
マルトヘプタオース (DP7)	159.9	180.3	254.8
マルトデキストリン (DE4-10DE)	128.8	127.8	211.5
ジャガイモ由来のアミロペクチン	142.5	146.5	197.8
可溶性デンプン	137.5	128.0	213.4
プルラン	29.2	25.6	31.1

【0304】

実施例4：pHがAfGA1TRグルコアミラーゼ活性に及ぼす影響

実施例3に記載されているABTSアッセイのプロトコルを用いて、pH（3.0～10.0）がAfGA1TR活性に及ぼす影響をモニターした。バッファ使用溶液（Buffer working solutions）は、グリシン／酢酸ナトリウム／HEPES（250 mM）の混合物からなるもの（pHの変動：3.0～10.0）であった。可溶性デンプン（1%水溶液、w/w）を250 mMバッファ溶液と9：1の比で混合して、基質溶液を調製した。酵素使用溶液を水に一定の用量で溶かして調製した（線形範囲内のシグナルは、用量反応曲線に準ずることを示す）。実施例3においてグルコアミラーゼ活性アッセイに関して記述したように、同じプロトコルに従って、全てのインキュベーションを50℃にて10分間行った。各pHにおける酵素活性を、最適なpHにおける酵素活性と比較した相対活量としてレポートした。AfGA1TRのpHプロファイルを表2及び図3に示す。AfGA1TRは、約5.0にて最適なpHを有し、かつpH 3.5～7.5にて70%超の最大活性を保持することが見出された。

【0305】

【表 4】

表 2. 精製グルコアミラーゼの pH プロファイル

pH	相対活量 (%)		
	AnGA	天然のAfGA	AfGA1TR
3	73.5	54.9	52.6
4	94.9	92.5	88.3
5	100	97.6	100
6	95.2	100	99.3
7	66.5	79.2	87.9
8	23.8	43	42.1
9	9.9	11	11.7
10	5.3	8.4	5.3

10

【0306】

実施例 5：温度が AfGA1TR グルコアミラーゼ活性に及ぼす影響

実施例 3 に記載されている ABTS アッセイのプロトコルを用いて、温度（40℃～84℃）が AfGA1TR 活性に及ぼす影響をモニターした。3.6 mL の可溶性デンプン（1%水溶液、w/w）及び 0.4 mL の 0.5 M 緩衝液（pH 5.0 の酢酸ナトリウム）を混合して 1.5 mL のコニカルチューブに入れ、基質溶液を調製した。酵素使用溶液を水に一定の用量で溶かして調製した（線形範囲内のシグナルは、用量反応曲線に準ずることを示す）。実施例 3 のグルコアミラーゼ活性アッセイに関して記述されているのと同じプロトコルに従って、40℃～84℃の温度にてそれぞれ 10 分間インキュベーションを行った。各温度における酵素活性を、至適温度における酵素活性と比較した相対活量としてレポートした。AfGA1TR の温度プロファイルを表 3 及び図 4 に示す。AfGA1TR は、68℃の至適温度を有し、56℃～74℃の間で 70% 超の最大活性を保持することが見出された。

20

【0307】

【表 5】

表 3. グルコアミラーゼの温度プロファイル

温度 (℃)	相対活量 (%)		
	AnGA	天然のAfGA	AfGA1TR
40	33.9	36.6	32.7
42.1	36	38.2	37.6
46.5	46.1	49.4	45
54	57.2	66.3	61.9
60	85.1	91.9	87.1
66.6	100	100	100
74.1	31.1	39.4	70.4
80.2	11.8	10.9	11.2
83.5	8.8	9.6	8.8

30

40

【0308】

実施例 6：AfGA1TR 生成物プロファイル解析

多糖類の真菌グルコアミラーゼ触媒作用の産物をアッセイするため、グルコアミラーゼ、AnGA（0.118 mg/gds のデンプン）及び AfGA1TR（0.118 mg/gds 又は 0.059 mg/gds）を 60℃、pH 4.2～4.5 にて 34% D S の LIQUOZYME（登録商標）Supra 液化デンプン（CPI, Stockton, CA）で 2 日間インキュベートした。プルラナーゼ（PU）、及びアスペルギルス・

50

カワチイ (*Aspergillus kawachii*)、GC626 (登録商標) (AkAA) 由来の酸安定性 α アミラーゼ (それぞれ 0.256 ASPU/gds、及び 0.35 SSU/gds) を、精製 AfGA1TR と共に投与した。試料をそれぞれ異なる時間間隔で採取し、HPLC で糖組成物の解析を行った。

【0309】

表4は、100%及び50%濃度のAnGAにてAnGA/PU/AkAA及びAfGA1TR/PU/AkAAにより糖化されたオリゴ糖のプロファイルを示す。(図6は、100%、50%及び40%濃度のAnGA、PU及びAkAA有り又は無しでAnGA及びAfGA1TRにより糖化されたオリゴ糖のプロファイルを示す。) DP1、DP2、DP3及びHSを含むオリゴ糖のみを示してある。表4中の数字には、DP1、DP2、DP3、及びHSの総量の分率としての各DPnの重量パーセントが反映されている。

【0310】

【表6】

表4. 液化デンプンに対する真菌グルコアミラーゼの製品プロファイル

フラスコ	酵素	用量:/gds	(時間)	% DP1	% DP2	% DP3	% HS
1	An-GA+ PU+GC626	0.118mg+ 0.256ASPU+ 0.35SSU	8	69.75	9.29	0.66	20.30
			24	93.40	2.21	0.71	3.68
			31	95.40	2.15	0.67	1.79
			37	95.90	2.22	0.60	1.27
			48.5	96.10	2.48	0.53	0.89
			55	96.09	2.64	0.49	0.78
			70	95.95	2.99	0.45	0.62
2	AfGA1TR+ PU+GC626	0.118mg+ 0.256ASPU+ 0.35SSU	8	86.34	2.35	0.47	10.84
			24	96.01	2.29	0.49	1.21
			31	96.11	2.58	0.44	0.88
			37	96.03	2.84	0.42	0.71
			48.5	95.70	3.33	0.43	0.54
			55	95.52	3.56	0.44	0.48
			70	94.97	4.12	0.49	0.42
3	AfGA1TR+ PU+GC626	0.059mg+ 0.256ASPU+ 0.35SSU	8	71.27	9.07	0.61	19.05
			24	93.80	2.19	0.72	3.29
			31	95.61	2.06	0.68	1.65
			37	96.06	2.09	0.63	1.22
			48.5	96.29	2.31	0.54	0.86
			55	96.31	2.43	0.50	0.76
			70	96.21	2.74	0.45	0.59

【0311】

表4は、等しいタンパク質用量において、AfGA1TRは24時間でDP1が95.5%を超過したのに対して、AnGAは48.5時間を要したことを、比較対照して示している。表4中のデータから判るように、タンパク質を基準とした50%の用量等量にて(補助酵素用量が同一であるという条件下で)AfGA1TRによる性能改善がAnGAを凌いだことが実証された。

【0312】

実施例7: DP2レベルの比較

AfGA1TRで処理された液化デンプンのDP2レベルを、同じDP1レベル(96%)を基準に、GAで処理された液化デンプンのDP2レベルと比較した。比較により、同等なDP1レベルにておよそ0.2%だけ、DP2レベルが統計的に有意に低減したことが判った。この理由としては、グルコアミラーゼ用量の低減が考えられる。イオンクロ

マトグラフィによりイソマルトース／マルトース比を計算して、（トリプルブレンドとしての）A n G A 及び A f G A 1 T R による転換反応を測定した。

【0313】

【表7】

表5. 液化デンプンに対する真菌グルコアミラーゼの製品プロファイル

	時間	グルコアミラーゼ反応後の総組成物の割合 (%)		グルコアミラーゼ反応後の総DP2の割合 (%)		転換反応	Δ比
		% DP 1	% DP 2	%イソマルトース	%マルトース	比 (I s o M / M)	
A n G A	48	96.08	2.26	55.6	44.4	1.25	
	70	95.91	2.77	64.9	35.1	1.85	
A f G A 1 T R	48	96.16	2.13	54.8	45.2	1.21	0.04
	70	96.10	2.60	63.4	36.6	1.73	0.13

Δ比= [A n G A比-A f G A 1 T R比] (48及び70時間目)

【0314】

表5は、イソマルトース：マルトース比の増大につれて、両方のグルコアミラーゼについてイソマルトースが経時的に累積したことを示す。一方、A f G A 1 T R 有りの場合に、48時間～70時間の間でA n G A 及びA f G A 1 T R の比の差が増大したため、イソマルトースの形成が僅かに抑制されるように思われた。このことは、A f G A 1 T R による転換反応の抑制の裏付けとなり得る。

【0315】

実施例8：A k A A の滴定

可変用量の付属αアミラーゼを用いて多糖類の真菌グルコアミラーゼ触媒作用の製品をアッセイするため、A f G A 1 T R (0.059mg/gds) 及びプルラナーゼ (PU、OPTIMAX (登録商標) L-1000) (0.256ASPU/gds) を様々な濃度の酸安定性αアミラーゼ、アスペルギルス・カワチイ (Aspergillus kawachii) 由来のGC626 (登録商標) (A k A A) でインキュベートした。60℃でpH 4.5にてA k A A を (0～0.3SSU/ds、増分; 0.1SSU、34% DSのLIQUOZYME (登録商標) Supra 液化デンプン (CPI, Stockton, CA)) 2日間加えた。プルラナーゼ (PU) 及びGC626 (登録商標) (A k A A) をそれぞれ0.256ASPU/gds及び0.35SSU/gdsにて、精製A f G A 1 T R と共に投与した。試料をそれぞれ異なる時間間隔で採取し、HPLCで糖組成物の解析を行った。

【0316】

表6及び図7は、A f G A 1 T R、PU及び可変用量のA k A A により糖化されたオリゴ糖のプロファイルを開示している。DP1、DP2、DP3及びHSを含むオリゴ糖のみを示してある。表6中の数字には、DP1、DP2、DP3、及びHSの総量の分率としての各DPnの重量パーセントが反映されている。

【0317】

【表 8】

表 6. A f G A 1 T R による酵素液化 (enzyme liquefied) デンプンの糖化中に、A k A A が及ぼす影響

フラスコ	AkAA(GC626(登録商標)) 用量: /gds	(時間)	% DP1	% DP2	% DP3	% HS
1	0	6	64.43	8.51	0.68	26.37
		21	88.93	1.60	0.46	9.01
		29	92.19	1.80	0.45	5.56
		45	94.60	2.22	0.40	2.78
		53	94.99	2.40	0.38	2.23
		68	95.55	2.77	0.37	1.30
2	0.1SSU	6	63.10	10.00	0.77	26.12
		21	91.07	2.01	0.59	6.33
		29	94.33	2.01	0.58	3.09
		45	96.13	2.23	0.49	1.15
		53	96.24	2.39	0.46	0.91
		68	96.20	2.72	0.42	0.66
3	0.2SSU	6	63.66	10.47	0.92	24.96
		21	91.75	2.18	0.65	5.43
		29	95.03	2.05	0.64	2.28
		45	96.19	2.25	0.52	1.03
		53	96.28	2.41	0.48	0.83
		68	96.22	2.73	0.43	0.62
4	0.3SSU	6	59.97	11.76	1.74	26.53
		21	91.52	2.44	0.71	5.33
		29	95.03	2.08	0.70	2.19
		45	96.21	2.20	0.57	1.01
		53	96.31	2.34	0.52	0.83
		68	96.27	2.64	0.46	0.63

【0318】

表 6 は、A f G A 1 T R が少なくとも 0.1SSU / gds の存在下にて 45 時間で 96% 超の DP1 に達し得るのに対して、A k A A が欠如した場合は結果として統計的に有意に糖化速度が低減することを示す。結果は、A f G A 1 T R による酵素液化デンプンの糖化中に A k A A を添加したことにより、最終的なグルコース収率の有意な増加が達成されたことを示す。

【0319】

実施例 9: α アミラーゼ、A f G A 1 T R 及びプルラナーゼ含有の酵素ブレンドによる、粒状デンプンの可溶化及び加水分解

乾燥固形分 35% のデンプンを蒸留水に溶かした粒状コーンのデンプンスラリーを調製し、NaOH を用い、pH を pH 5.0 になるように調整した。10AAU / gds の α アミラーゼ (SPEZYME (登録商標) XTRA) 及び A f G A 1 T R の精製タンパ

10

20

30

40

50

ク質を0.047mg/gdsにて0.15ASPU/gdsのプルラナーゼ（OPTIMAX（登録商標）L-1000）と共にデンプンスラリーに添加した。次いで、デンプンスラリーを60℃に維持した水浴中に保持し、絶えず攪拌した。アリコートをそれぞれ別の時間間隔で回収して遠心分離させた。清澄な上清を屈折率（RI）に用いて可溶化率を計算し、HPLCで糖組成物の解析を行った。

【0320】

【表9】

表7：液化中のデンプンに対する真菌グルコアミラーゼの製品プロファイル

酵素	用量：/g ds	(時間)	溶解率 (%))	% DP 1	% DP 2	% DP 3	% H S
SPEZYME XTRA	10AAU	5	52.5%	73.05	13.20	1.55	12.20
		20.5	72.5%	93.00	2.38	1.86	2.76
		29	76.2%	94.10	2.21	1.55	2.13
		44.5	82.0%	95.14	2.16	1.16	1.54
OPTIMAX L-1000	0.15A SPU	52	83.5%	95.43	2.20	1.02	1.36
AFGA1TR	0.047 mg	68	86.1%	95.75	2.36	0.81	1.08

【0321】

表7は、αアミラーゼ及びPUの存在下にて粒状デンプンを用いることにより、AFGA1TRが68時間で95.5%超のDP1に達し得たこと、かつ粒状デンプンの可溶化率が86%超であったことを示している。

【0322】

実施例10：残存αアミラーゼ活性がDP3レベルに及ぼす影響

0.066KG/MTdsのLIQUOZYME（登録商標）Supra（NZ）をα殺菌済みデンプン液化物に添加し直してAFGA1TRを用いた場合の、pH（5.5）のみの影響、並びにpH 4.5において残存αアミラーゼ活性がDP1及びDP3の両方に及ぼす影響を解析した。0.066mg/gdsのAFGA1TRを、0.25ASPU/gdsのOPTIMAX（登録商標）L-1000（プルラナーゼ）及び0.1SSU/gdsのAKAと混ぜ合わせた。表8及び図5は、AFGA1TR及びOPTIMAX（登録商標）4060VHP（ANGA／プルラナーゼブレンド）により糖化されたオリゴ糖のプロファイルを開示したものである。

【0323】

【表 10】

表 8：液化デンプンに対する真菌グルコアミラーゼの製品プロファイル

48時間目の糖組成物	% DP 1	% DP 2	% DP 3	% HS
A f G A 1 T R トリプル 0.066mg (0.141GAU)、 活性、pH 5.5	95.12	1.99	0.71	2.19
A f G A 1 T R トリプル 0.066mg (0.141GAU)、 活性、pH 4.5	95.92	2.19	0.59	1.30
A f G A 1 T R トリプル 0.066mg (0.141GAU)、 殺菌済み、pH 4.5	96.00	2.26	0.43	1.31
OPTIMAX (登録商標) 4060VHP 0.16GAU、 殺菌済み、pH 4.5	95.93	2.27	0.55	1.25
OPTIMAX (登録商標) 4060VHP 0.16GAU、 活性、pH 4.5	95.86	2.27	0.68	1.18

【0324】

OPTIMAX (登録商標) L-1000 に対して、A f G A 1 T R トリプルブレンドは、pH がおそらく不利であったため、pH 4.5 の場合と比べて pH 5.5 にて糖化速度の有意な減失を示した一方、48 時間で 95.5 % 超の DP 1 を得ることができた。A f G A 1 T R 及び OPTIMAX (登録商標) 4060VHP の両方は残存 α アミラーゼ活性によるマイナスの影響をやや受けたが、DP 3 が増加したため、予期されたようにグルコース収率が最大限に高まった。α アミラーゼ殺菌液化物の事例において、A f G A 1 T R は、OPTIMAX (登録商標) 4060VHP よりも DP 3 を 0.1 % だけ有意に低減させた。α アミラーゼ活性液化物を含む A f G A 1 T R のレベルは、「α 殺菌済み」液化物を含む OPTIMAX (登録商標) 4060VHP の 1 つと同レベルに低かった。

【0325】

実施例 11：A f G A 1 T R と野生型アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) のグルコアミラーゼとの比較

デンプン液化物を水で希釈し、乾燥固形分 34 % になるように調製して、2 種類のグルコアミラーゼ、即ち、1) A f G A 1 T R (0.067mg/gds のデンプン)、及び 2) (アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) において発現された) 野生型 A f G A の精製タンパク質 GLUCOTEA M DB (Nagase Co. & Ltd., Japan 製) 0.065mg/gds を用い、pH 4.4 かつ 60 °C にて糖

化を行った。加えて、プルラナーゼ（PU）、及び酸安定性 α アミラーゼであるGC626（登録商標）（AKA）をそれぞれ、各グルコアミラーゼと共に0.14ASPU/gds及び0.9SSU/gdsにて投与した。試料をそれぞれ異なる時間間隔で採取し、HPLCで糖組成物の解析を行った。

【0326】

表9は、AfGA1TRによりDP1が48時間で95.5%を超過したのに対して、商用アスペルギルス・フミガタス（*Aspergillus fumigatus*）による糖化所要時間が長くなったことを示している。両方のグルコアミラーゼにより、DP1を96%超にし、DP2を3%未満に到達させることができた。

【0327】

【表11】

表9：液化デンプンに対する真菌グルコアミラーゼブレンドの製品プロファイル

酵素	用量：/gds	(時間)	% DP 1	% DP 2	% DP 3	% HS
AfGA1TR Optimax L -1000 GC626（登録商標）	0.067mg 0.14ASPU 0.9SSU	15	86.62	4.60	0.76	8.02
		26	94.78	2.11	0.77	2.34
		39	96.12	2.07	0.55	1.26
		48	96.27	2.26	0.45	1.02
		63	96.22	2.61	0.34	0.83
		71	96.16	2.77	0.31	0.76
野生型AfGA OPTIMAX L -1000 GC626（登録商標）	0.065mg 0.14ASPU 0.9SSU	16	75.43	10.4	0.84	13.2
		24	87.33	5	0.93	8
		40	95.11	4.87	0.89	6.87
		48	95.81	2.05	0.79	1.95
		64	96.16	1.93	0.61	1.47
		72	96.21	2.09	0.55	1.14

【0328】

実施例12： α アミラーゼ、プルラナーゼ及びアスペルギルス・フミガタス（*Aspergillus fumigatus*）GA含有の酵素配合物による、粒状デンプンの可溶化及び加水分解

典型的な実施例において、乾燥固形分35%のデンプンを蒸留水に溶かした粒状コーンのデンプンスラリーを調製し、水酸化ナトリウムを用い、pHをpH 5.0になるように調整した。10AAU/gdsのSPEZYME（登録商標）XTRA、及びAfGA1TR又は野生型アスペルギルス・フミガタス（*Aspergillus fumigatus*）GA（AfGA）の精製タンパク質GLUCOTEAM DB（Nagase Co. & Ltd., Japan製）を、0.15ASPU/gdsのOPTIMAX（登録商標）L-1000と共にデンプンスラリーに添加した。次いで、デンプンスラリーを60℃に維持した水浴中に保持し、絶えず攪拌した。アリコートをそれぞれ別の時間間隔で回収して遠心分離させた。清澄な上清を屈折率（RI）に用いて可溶化率を計算し、HPLCで糖組成物の解析を行った。表10は、 α アミラーゼ及びPUの存在下にて粒状デンプンを用いた場合に、両方のアスペルギルス・フミガタス（*Aspergillus fumigatus*）のグルコアミラーゼが68時間でDP1を95.5%超に到達させ得、かつ粒状デンプンの可溶化率が86%超であったことを示している。

【0329】

【表 12】

表 10： α アミラーゼ及びプルランナーゼが粒状デンプンの可溶化に及ぼす影響

酵素	用量：／g d s	時間	溶解率 (%)	% D P 1	% D P 2	% D P 3	% H S
SPEZYME XTRA OPTIMAX L-1000 AfGA1TR	10AAU 0.15A SPU 0.047 mg	5	52.5%	73.0 5	13.2 0	1.55	12.2 0
		20.5	72.5%	93.0 0	2.38	1.86	2.76
		29	76.2%	94.1 0	2.21	1.55	2.13
		44.5	82.0%	95.1 4	2.16	1.16	1.54
		52	83.5%	95.4 3	2.20	1.02	1.36
		68	86.1%	95.7 5	2.36	0.81	1.08
SPEZYME XTRA OPTIMAX L-1000 野生型AfGA	10AAU 0.14A SPU 0.075 mg	15	72.3%	87.1 5	4.92	2.25	5.68
		25	78.7%	91.9 3	2.68	2.15	3.24
		39	86.0%	94.2 4	2.00	1.70	2.06
		50	87.3%	94.8 4	1.96	1.45	1.75
		64	91.5%	95.4 2	2.04	1.15	1.39
		73	92.1%	95.6 2	2.12	1.01	1.25

【0330】

実施例 13：AfGA2TRの発現及び精製

AfGA2遺伝子（NCBI参照配列DS499595の145382～147441）用の核酸配列をアスペルギルス・フミガタス（*Aspergillus fumigatus*）A1163から採取し、AfGA2遺伝子でコードされた假定タンパク質のアミノ酸配列をNCBIデータベース（NCBI受託番号：EDP53734）で検索した。アスペルギルス・フミガタス（*Aspergillus fumigatus*）A1163由来のAfGA2遺伝子のヌクレオチド配列を最適化して、Generayにより合成した（Generay Biotech Co., Ltd, Shanghai, China）。

【0331】

AfGA2のDNA配列をトリコデルマ・レーシ（*Trichoderma reesei*）における発現のために最適化し、次いで、Generayにより合成し、pTrex3gM発現ベクターに挿入して（米国特許出願第2011/0136197 A1号に記載されている）（Generay Biotech Co., Ltd, Shanghai, China）、結果としてpJG313を得た（図9）。

【0332】

遺伝子銃法（Te'o et al., J. Microbiol. Methods 51:393～99, 2002）を使用して、プラスミドpJG313を、4つの遺伝子を欠失させたトリコデルマ・レーシ（*Trichoderma reesei*）株（国際公開第05/001036号に記載）に形質転換させた。形質転換体を、アセトアミドを唯一の窒素源として含む培地（アセトアミド0.6g/L；塩化セシウム1.68g/L；グルコース20g/L；リン酸二水素カリウム15g/L；硫酸マグネシウム七水和物0.6g/L；塩化カ

ルシウム二水和物 0.6 g/L; 硫酸鉄 (I I) 5 mg/L; 硫酸亜鉛 1.4 mg/L; 塩化コバルト (I I) 1 mg/L; 硫酸マンガン (I I) 1.6 mg/L; 寒天 20 g/L; pH 4.25) 上で選択した。形質転換されたコロニー (約 50~100) は約 1 週間で出現した。アセトアミドプレート上で生育した後、形質転換体を採取し、個別にアセトアミド寒天プレートに移した。アセトアミドプレート上での生育の 5 日後、安定したモルホロジーを呈する形質転換体を 96 ウェルのマイクロタイタープレートで 200 μ L グルコース/ソホロース規定培地中に接種した。マイクロタイタープレートを酸素グロースチャンバ内で 28 $^{\circ}$ C にて 5 日間インキュベートした。これらの培養の上清を用い、SDS-PAGE 解析でタンパク質の発現を確認して、酵素活性のアッセイを行った。その後、60% グルコース-ソホロースフィードを含有する 7 L 発酵槽の規定培地内で、安定した株を生育させた。(NH₄)₂SO₄ 5 g、PIPPS バッファ 33 g、カザミノ酸 9 g、KH₂PO₄ 4.5 g、CaCl₂ (無水) 1 g、MgSO₄ · 7H₂O 1 g からなるグルコース/ソホロース規定培地 (1 リットル当たり) を、50% NaOH と Millier-Q H₂O で 966.5 mL にし、pH を 5.5 になるように調整した。消毒後に添加した内容は以下の通りである: 26 mL の 60% グルコース/セファロース、及び 400 $\times$ T. レーシ (T. reesei) 微量金属 2.5 mL。

【0333】

タンパク質 AfGA2TR を 2 つのクロマトグラフィ工程で精製した。硫酸アンモニウムの最終濃度が 1 M に達するまで、硫酸アンモニウムを 600 mL の発酵ブロスに加えた。1 M 硫酸アンモニウム (バッファ A) 含有の 20 mM のリン酸ナトリウム (pH 7.0) で予め平衡化した 50 mL の疎水性相互作用クロマトグラフィフェニル HP カラムに試料を充填した。カラムを 1~0 M 硫酸アンモニウムからの直線的塩濃度勾配を用いて洗浄した。活性溜分をプールして、親和性クロマトグラフィに適用した。疎水性相互作用クロマトグラフィ後の試料を、25 mM pH 4.3 酢酸ナトリウム緩衝液 (バッファ B) に交換し、バッファ B で予め平衡化させておいた β シクロデキストリンカップリング済みセファロース 6 B カラムに充填した。標的タンパク質を、25 mM (pH 4.3) の酢酸ナトリウム及び 10 mM の α シクロデキストリン (バッファ C) で溶出させた。その溶出物を、10 K Amicon Ultra-15 デバイスを用いて濃縮させた。最終生成物は 98% を超える純度であり、更なる研究のため、-80 $^{\circ}$ C の 40% グリセロール中に保管した。

【0334】

実施例 14: AfGA2TR のグルコアミラーゼ活性

AfGA2TR は、グリコシル加水分解酵素 15 ファミリー (GH15, CAZy 番号) に属する。1% w/w の可溶性デンプン (Sigma S9765) を基質として用い、AfGA2TR のグルコアミラーゼ活性を測定した。50 mM 酢酸ナトリウムバッファ (pH 5.0) で 50 $^{\circ}$ C にて 10 分間アッセイを行った。実施例 3 に開示されているグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ (GOX/HRP) テクニックを用いて、グルコースの放出速度を測定した。過剰なカップリング済み GOX/HRP 酵素を介して、グルコースを 2, 2'-アジノービス 3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸 (ABTS) の酸化速度として定量した。グルコース標準曲線に基づいて酵素活性を計算した。このアッセイにおいて、1 グルコアミラーゼ単位は、アッセイの条件下にて 1 分につき 1 μ mol のグルコースを生成するのに必要とされる酵素の量として定義される。上記の方法を用いて、精製 AfGA2TR の可溶性デンプンに対する比活性を 214 単位/mg として値付けした。

【0335】

実施例 15: AfGA2TR の pH プロファイル

実施例 3 に記載されている ABTS アッセイのプロトコールに従って、pH (3.0~10.0) が AfGA2TR 活性に及ぼす影響をモニターした。バッファ使用溶液は、グリシン/酢酸ナトリウム/HEPES (250 nM) の混合物からなるもの (pH の変動: 3.0~10.0) であった。可溶性デンプン (1% 水溶液、w/w) を 250 mM バ

10

20

30

40

50

ッファ溶液と9：1の比で混合して、基質溶液を調製した。酵素使用溶液を水に一定の用量で溶かして調製した（線形範囲内のシグナルは、用量反応曲線に準ずることを示す）。実施例3においてグルコアミラーゼ活性アッセイに関して記述したように、同じプロトコルを用い、全てのインキュベーションを50℃にて10分間行った。各pHにおける酵素活性を、最適なpHにおける酵素活性に対する相対活性としてレポートした。AfGA2TRのpHプロファイルは、図10に示してある。AfGA2TRは、約5.3にて最適なpHを有し、3.3～7.3で70%超という最大活性を保持することが見出された。

【0336】

実施例16：fAfGA2TRの温度プロファイル

10

実施例3に記載されているABTSアッセイのプロトコルに従って、温度（40℃～84℃）がAfGA2TR活性に及ぼす影響をモニターした。9mLの可溶性デンプン（1%水溶液、w/w）及び1mLの0.5M緩衝液（pH 5.0の酢酸ナトリウム）を混合して15mLのコニカルチューブに入れ、基質溶液を調製した。酵素使用溶液を水に一定の用量で溶かして調製した（線形範囲内のシグナルは、用量反応曲線に準ずることを示す）。インキュベーションを温度40℃～84℃にてそれぞれ10分間行った。インキュベーション後に、実施例3にグルコアミラーゼ活性アッセイに関して記述されているのと同じプロトコルに従って、活性を値付けした。活性を至適温度での酵素活性に対する相対活性としてレポートした。AfGA2TRの温度プロファイルは、図11に示してある。AfGA2TRは、69℃の至適温度を有し、61℃～74℃の間で70%超の最大活性を保持することが見出された。

20

【0337】

実施例17：AfGA2TRの熱安定性

50mM酢酸ナトリウムバッファ（pH 5.0）中のAfGA2TRの熱安定性を値付けした。酵素を基質への添加に先立って所望される温度にてPCRマシンで2時間インキュベートした。実施例3に記載されているようにして、試料の残存活性を測定した。氷上に保持された試料の活性を100%の活性として定義した。図12に示すように、2時間のインキュベーション期間中にAfGA2TRは63℃未満の温度にて50%を超える活性を保持した。

【0338】

30

実施例18：AfGA1TRとAfGA2TRとの比較

デンプン液化物を水で希釈して、乾燥固形分34%になるように調製し、2種類のグルコアミラーゼ；1）AfGA1TR（0.06mg/gds）のデンプン、及び2）pH 4.4かつ60℃にてAfGA2TR（0.06mg/gds）の精製タンパク質を使用して糖化を行った。加えて、グルコースの生成を増強するため、プルラナーゼ（OPTIMAX（登録商標）L-1000）及び酸安定性αアミラーゼ、GC626（登録商標）（ASA）0.14ASPU/gds及び0.9SSU/gdsをそれぞれ、各グルコアミラーゼと共に投与した。試料をそれぞれ異なる時間間隔で採取し、HPLCで糖組成物の解析を行った。

【0339】

40

【表 1 3】

表 1 1 : 液化デンプンに対する A f G A 1 T R 及び A f G A 2 T R ブレンドの
製品プロファイル

酵素	用量 : / g d s	時間	% D P 1	% D P 2	% D P 3	% H S
A f G A 1 T R OPTIMAX (登録商標) L - 1 0 0 0 G C 6 2 6 (登録商標)	0. 0 6 m g 0. 1 4 A S P U 0. 9 S S U	1 6	8 2. 9 9	6. 7 6	1. 1 4	9. 1 1
		2 4	9 1. 6 5	3. 3 0	1. 2 1	3. 8 4
		4 0	9 5. 3 2	2. 3 3	0. 9 3	1. 4 2
		4 8	9 5. 6 6	2. 3 9	0. 7 9	1. 1 6
		6 4	9 5. 7 3	2. 7 1	0. 6 4	0. 9 2
		7 2	9 5. 6 4	2. 8 7	0. 6 2	0. 8 7
A f G A 2 T R OPTIMAX (登録商標) L - 1 0 0 0 G C 6 2 6 (登録商標)	0. 0 6 m g 0. 1 4 A S P U 0. 9 S S U	1 6	8 6. 4 0	4. 3 2	1. 0 5	8. 2 3
		2 4	9 3. 3 4	2. 3 4	1. 0 5	3. 2 7
		4 0	9 5. 6 8	2. 1 7	0. 7 8	1. 3 7
		4 8	9 5. 9 1	2. 2 8	0. 6 7	1. 1 4
		6 4	9 5. 9 3	2. 6 2	0. 5 5	0. 9 0
		7 2	9 5. 8 8	2. 7 7	0. 5 1	0. 8 4

【 0 3 4 0 】

表 1 1 は、両方のグルコアミラーゼにより、4 8 時間で D P 1 が 9 5. 5 % 超になり、
A f G A 2 T R を用いて糖化速度が僅かに上昇したことを示す。

【 0 3 4 1 】

組成物、製造方法及び使用方法を、上記の例を参照しながら詳述してきたが、理解され
るように、本趣旨から逸脱することなしにこれらの組成物及び方法に対し修正を施すこと
が可能であり、このことは当業者に容易に把握されるであろう。

【 0 3 4 2 】

本出願に関して引用されている全ての特許及び公報は、全ての目的に合わせて、その全
体が本明細書において参照より援用されている。

【 0 3 4 3 】

配列表

配列番号 1 - A f G A 1 前駆体

MPRLSYALCALSLGHAAIAAPQLSARATGSLDSWLGTETTVALNGILANIGADGAYAKSAKPGIIIIASPSSTSEPDYY
YTWTRDAALVTKVLVDLFRNGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSGGLASGGLAEPKYNVDMTFTGAWGRPQRDG
PALRATALIDFGNWLIDNGYSSYAVNNIWPIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLWEEVNSMSFFTAVVQHRALVEGSTFAK
RVGASCSWCDSQAPQILCYMQSFWTGSYINANTGGGRSGKDANTVLASIHTFDPEAGCDDTTFQPCSPRALANHKVY
TDSFRSVYAINSGIPQGAASAGRYPEDVYYNGNPWFLTTLAAAEQLYDAIYQWKIGSISITSTSLAFFKDIYSSA
AVGTYASSTSTFTDIINAVKTYADGYVSIVQAHAMNNGSLSEQFDKSSGLSLSARDLTWSYAAFLTANMRRNGVVP
PWGAASANSVPSSCSMGSAATGTYSTATATSWPSTLTSGSPGSTTTVGTTTSTTSGTAAETACATPTAVAVTFNEIAT
TTYGENVYIVGSISELGNWDTSKAVALSASKYTSSNNLWYVSVTLPAAGTTFEYKYIRKESDGSIVWESDPNRSYTV
AACGVSTATENDTWQ

10

【0344】

配列番号2-A f G A 2 前駆体

MPRLSYALCALSLGHAAIAAPQLSARATGSLDSWLGTETTVALNGILANIGADGAYAKSAKPGIIIIASPS
TSEPDYYYYTWTRDAALVTKVLVDLFRNGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSGGLASGGLAEPKYNVDM
TFTGAWGRPQRDGPALRATALIDFGNWLIDNGYSSYAVNNIWPIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLWEEVNS
MSFFTAVVQHRALVEGSTFAKRVGASCSWCDSQAPQILCYMQSFWTGSYINANTGGGRSGKDANTVLASI
HTFDPEAGCDDTTFQPCSPRALANHKVYTDSFRSVYAINSGIPQGAASAGRYPEDVYYNGNPWFLTTLA
AAEQLYDAIYQWKIGSISITSTSLAFFKDIYSSAAVGTYASSTSTFTDIINAVKTYADGYVSIVQAHAM
NNGSLSEQFDKSSGLSLSARDLTWSYAAFLTANMRRNGVVPAPWGAASANSVPSSCSMGSAATGTYSTATA
TSWPSTLTSGSPGSTTTVGTTTSTTSGTATETACATPTAVAVTFNEIATTTYGENVYIVGSISELGNWDT
SKAVALSASKYTSSNNLWYVSVTLPAAGTTFEYKYIRKESDGSIVWESDPNRSYTVPAACGVSTATENDTW
R

20

【0345】

配列番号3-N f _ N R R L _ 1 8 1 _ G A

MPRLSYALCALSLGHAAIAAPQLSPRATGSLDSWLATESTVSLNGILANIGADGAYAKSAKPGIIIIASPS
TSDPDYYYYTWTRDAALVTKVLVDLFRNGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSTPSGGLSSGGLAEPKYNVDM
TFTGAWGRPQRDGPALRATALIDFGNWLIDNGYSSYAVNNIWPIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLWEEVNS
MSFFTAVVQHRALVEGSTFAKRVGASCSWCDSQAPQILCYMQSFWTGSYINANTGGGRSGKDANTVLASI
HTFDPEAGCDDTTFQPCSPRALANHKVYTDSFRSVYAINSGIPQGVAVSAGRYPEDVYYNGNPWFLTTLA
AAEQLYDAIYQWKIGSISITSTSLAFFKDIYSSVAVGTYASSSSTFTAIIDAVKTYADGYVSIVEAHAM
TNGSLSEQFDKSSGMSLSARDLTWSYAALLTANMRRNGVVPAPWGAASANSVPSSCSMGSAATGTYSTATA
TSWPSTLTSGSPSDTTSCTTPGTTTTTACTTPTSVAVTFDEIATTTYGENVYIIGSISQLGSDWTSKAV
PLSSSKYTSSNNLWYVTINLPAGTTFEYKYIRKESDGSIEWESDPNRSYTVPSACGVSTATEKDTWR

30

【0346】

配列番号4-T s _ A T C C 0 _ 1 0 5 0 0 _ G A

MTRLSSVLCALAAALGQTALAAPGLSPRASTSLDAWLATETTVSLSGILANIGADGAYSKSAKPGVVIASP
 STDNPNYYYYTWTRDSALTLKVLIDLFRNGNLGLQTVIEEYVNAQAYLQTVSNPSGDLSSGAGLAEPKFN
 DMSAFTGSGWRPQRDGPALRAIALIDFGNWLIENTYSLAANNIWPPIVRNDLSYVAQYWSQSGFDLWEEV
 NSMSFFTANQHRSLVEGSTFAAKVGASCSWCDSQAPQILCYMQTFWTGSYMNANTGGGRSGKDANTVLT
 SIATFDPEATCDDVTFQPCSPRALANHKVYTDSFRSVYGLNSGIAEGVAVAVGRYPEDSYNGNPWFSLN
 LAAAEQLYDAIYQWNKIGSITITSTSLAFFKDVYSSAAVGTYASGSSAFTSIINAVKTYADGYISVVQSH
 AMNNGSLSEQFDKNTGAELSARDLTWSYAALLTANMRRNGVPPSWGAASATSIPSSCTTGSAIGTYSTP
 TATSWPSTLTSGTGSPGSTSATGSVSTSVSATTTAGSCTTPTSVAVTFDEIATTSYGENVYIVGSISQ
 LGSWNTANAIALSASKYTSSNNLWYVTINLPAGTTTFQYKYIRKESDGTWKWESDPNRSYTVPSACGVSTA
 TENDTWR

10

【0347】

配列番号5 - P m _ A T C C _ 1 8 2 2 4 _ G A

MTFSRLSSSVLCALAAALGHNALAAPQFSPRATVGLDAWLASETTFSLNGILANIGSSGAYSASAKPGVVI
 ASPSTNNPNYYYYTWTRDSALTLKVLIDLFGNGLSLQTVIEEYINAQAYLQTVSNPSGDLSSGAGLAEPK
 YNVDMSFFTGWGRPQRDGPALRAIALIEFGNWLIDNGYSSYAVNNIWPPIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLW
 EEVNSMSFFTANQHRALVQGSTFAARVGASCSWCDSQAPQILCYMQTFWTGSYINANTGGGRSGKDSNT
 VLTTHTFDPEATCDDVTFQPCSPRALANHKVYTDSFRSIYGVNSGIAQGVAVSVGRYPEDSYGGNPWF
 LSNLAAAEQLYDAIYQWNKIGSITITSTSLAFFKDVYSSAAVGTYASGSTAFTSIISAVKTYADGYVSIV
 QGHAAANGSLSEQFDRNSGVEISARDLTWSYAALLTANLRRNGVMPPSWGAASANSVPSSCSMGSAIGTY
 STPTATAWPSTLTSTATGIPVTTSATASVTKATSATSTTTATCTTPTSVAVTFDEIATTTTYGENVFIVG
 SISQLGSWDTSKAIALSASQYTSSNHLWFATLSLPAGTTTFQYKYIRKESNGSIVWESDPNRSYTVPSGCG
 VSTATENDTWR

20

【0348】

配列番号6 - A n _ F G S C _ A 4 _ G A

MPTTILKITLFLIDSIFSVQLSPVRIAMLTLSKVLPLVLAALSHAVAAAPQLSARATASLNTWLSTEASFA
 LDGILTNIANGAYAKTAKAGADYYTWTRDAALTVKVLVDLFHNGDLSLQTTILEEYTNQAYLQTVSNPS
 GGLASGGLAEPKFYVDMTAFGTGSGWRPQRDGPALRATTLIGFGNWLIDNGYSSYASNNIWPPIVRNDLTYV
 AQYWSKSGYDLWEEVNSMSFFTAVQHRALVEGSTFAHRVGASCPWCDSQAPQILCYMQNFWTGSYINAN
 TGGGRSGKDANTVLASIHDFDPAACDDITFQPCSSRALANHKVYTDSFRSVYSLNTGIAQGVAVAAGRY
 PEDSYNGNPWFLLTAAAEQLYDAIYQWQKARSISITSTSLAFFKDIYSSAAVGTYASGSSAFTAIIDA
 VKTYADGYVSIVKAHAMANGSLSEQFDKTYGTCVSARDLTWSYAALLTASMRNGVPPSWDAASANTLP
 SSCSTGSATGTYSTATVTTWPSTLTSGSASATTTIMATSTATSSSTTTSTTTACTTPSTVAVTFNVIATT
 TYGENVYIVGSISQLGNWDTSKAVALSASKNTSSNNLWYVDINLPGGTAFYKYIRKETDGSIVWESDPN
 RSYTVPSGCGVSTATESDTWRCTLETQSVRN

30

40

【0349】

配列番号7 - A f G A 1 及び A f G A 2 C B M

FNEIATTTTYGENVYIVGSISELGNWDTSKAVALSASKYTSSNNLWYVSVTLPGTTTFYKYIRKESDGSIVWESDPN
 RSYTVPAACGVSTATENDTW

【0350】

配列番号8 - p T r e x 3 g M - A f G A 1 の A f G A 1 遺伝子

ATGCCTCGCCTTTCTACGCGCTCTGTGCGCTGTCTCTCGGGCATGCTGCTATTGCAGCTCCTCAGTTATCCGCTCG
TGCTACCGGCAGCTTGGACTCCTGGTTGGGTACTGAGACCACCGTTGCGCTCAATGGTATTCTGGCCAACATCGGTG
CCGACGGTGCTTATGCGAAGAGCGCTAAGCCTGGCATAATCATTGCCAGTCCGAGCACCAGCGAACCAGACTGTGAG
AACCTTCTGAACTGGCCCTGTCCGGCAGTCATTGACCTCGGTAGACTACTATACCTGGACGAGAGATGCTGCTCTC
GTCACGAAAGTCCTGGTCGACCTCTTCCGCAACGGCAACCTGGGTCTGCAGAAAGTCATTACCGAATACGTCAACTC
TCAGGCGTACTTGACAGACCGTGTCTAATCCGTGCGGTGGTCTTGCGAGCGGAGGTCTCGCGGAGCCTAAGTACAACG
TCGACATGACGGCCTTTACCGGAGCCTGGGGTCTGCTCTCAGCGTGATGGTCCGGCTCTGCGGGCCACCGCCCTCATC
GACTTTGGCAACTGGCTGATTGTATGTTCTCCATACGAGCCCCAGGAAGCGTTGCTGACGTCTACAGGACAACGGCT
ACTCCAGCTATGCTGTCAACAACATCTGGCCCATTTGTGCGCAACGACTTGTCTACGTTTCTCAGTACTGGAGCCAG
AGTGGCTTTGGTGAGTCCCGACTCTCTGGAAGTTTACAACGTGCATCGATTACTGACAATTGAGATTCTACGTGACA
GATCTCTGGGAAGAAGTCAACTCCATGTCCTTCTTCACCGTCGCTGTCCAGCACCGTGCCCTCGTGAGGGAAGCAC
GTTTCGCTAAACGGGTGGGAGCGTCGTGCTCGTGGTGTGACTCGCAGGCCCCCAGATCCTCTGCTACATGCAGAGTT
TCTGGACTGGCTCGTATATCAACGCCAACACCGGTGGTGGCCGGTCCGGCAAGGATGCCAACACCGTCTCGCCAGC
ATCCATACCTTCGACCCCGAAGCCGGCTGCGACGATACTACTTTCCAGCCCTGCTCTCCTCGGGCCCTTGCCAACCA
CAAGGTGTACACCGATTGTTCCGCTCGGTCTACGCGATCAACTCCGGCATCCCACAGGGCGCTGCCGTTTCCGCTG
GCCGCTACCCCGAGGACGTCTACTACAACGGCAACCCCTTGGTTCTCACCACCCCTCGCCGCTGCCGAGCAGCTCTAC
GACGCTATCTACAGTGGAAGAAGATCGGTTCCATCAGCATCACCAGCACCTCCCTCGCCTTCTTCAAGGACATCTA
CAGCTCCGCCCGGGTCGGCACCTACGCCTCTAGCACCTCCACCTTCACGGACATCATCAACGCGGTCAAGACCTACG
CAGACGGCTACGTGAGCATCGTCCAGGCACACGCCATGAACAACGGCTCCCTTTCGGAGCAATTCGACAAGTCTCT
GGGCTGTCCCTCTCCGCCCGCGATCTGACCTGGTCTACGCCGCTTTCCTCACCGCCAACATGCGTCGTAACGGCGT
GGTGCCTGCCCCCTGGGGCGCCGCTCCGCCAACTCCGTCCCTCGTCTTGTCTCATGGGCTCGGCCACGGGCACCT
ACAGCACCGCGACAGCCACCTCCTGGCCCAGCACGCTGACCAGCGGCTCGCCAGGCAGCACCAACCGTGGGCACC
ACGACACGTACACCTCTGGCACCGCCGCGAGACCGCCTGTGCGACCCCTACCGCCGTGGCCGTACCTTTAACGA
GATCGCCACCACCTACGGCGAGAATGTTTACATTGTTGGGTCCATCTCCGAGCTCGGGAAGTGGGATACCAGCA
AAGCAGTGGCCCTGAGTGCCTCCAAGTATACCTCCAGCAATAACCTCTGGTACGTGTCCGTACCCCTGCCGGCTGGC
ACGACATTGAGTACAAGTATATCCGAAGGAAAGCGATGGCTCGATCGTGTGGGAGAGTGACCCCAACCGCTCGTA
TACGGTGCCGGCAGCTTGTGGAGTGTCTACTGCGACCGAGAATGATACTTGGCAGTGA

10

20

30

【0351】

配列番号9-A f G A 1

GCGGCGGCCGCACCATGCCTCGCCTTTCCTACGC

【0352】

配列番号10-A f G A 1

CCGGCGCGCCCTTATCACTGCCAAGTATCATTCTCG

【0353】

配列番号11-A f G A 1 及び A f G A 2 シグナルペプチド

MPRLSYALCALSLGHAAIA

【0354】

配列番号12-A f G A 1 成熟形態

APQLSARATGSLDSWLGTETTVALNGILANIGADGAYAKSAKPGIIIASPSTSEPDYYYTWTRDAALVTKVLVDLFR
NGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSGGLASGGLAEPKYNVDMTAF TGAWGRPQRDGPALRATALIDFGNWLIDNG
YSSYAVNNIWPPIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLWEEVNSMSFFTAVVQHRALVEGSTFAKRVGASCSWCDSQAPQILCY
MQSEFWTGSYINANTGGGRSGKDANTVLASIHTFDPEAGCDDTTFQPCSPRALANHKVYTD SFRSVYAINSGIPQGAA
VSAGRYPEDVYYNGNPWFLTTLAAAEQLYDAIYQWKKIGSISITSTSLAFFKDIYSSAAVGTYASSTSTFTDIINAV
KTYADGYVSIQAHAMNNGSLSEQFDKSSGLSLSARDLTWSYAAFLTANMRRNGVVPAPWGAASANSVPSSCSMGSA
TGTYSTATATSWPSTLTSGSPGSTTTVGTSTTSGTAAETACATPTAVAVTFNEIATTTTYGENVYIVGSISELGNW
DTSKAVALSASKYTSSNNLWYVSVTLPA GTTFEYKYIRKESDGSIVWESDPNRSYTVPAACGVSTATENDTWQ

40

50

【0355】

配列番号 13-A f G A 2 成熟形態

APQLSARATGSLDSWLGTETTVALNGILANIGADGAYAKSAKPGIIIASPSTSEPDYYYTWTRDAALVTKVLVDLFR
NGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSGGLASGGLAEPKYNVDMTAF TGAWGRPQRDGPALRATALIDFGNWLIDNG
YSSYAVNNIWPPIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLWEEVNSMSFFTAVVQHRALVEGSTFAKRVGASCSWCD SQAPQILCY
MQSFWTGSYINANTGGGRSGKDANTV LASIHTFDPEAGCDDTTFQPCSPRALANHKVYTD SFRSVYAINSGIPQGAA
VSAGRYPEDVYYNGNPWFLTTLAAAEQLYDAIYQWKIGSISITSTSLAFFKDIYSSAAVGTYASSTSTFTDIINAV
KTYADGYVSIVQAHAMNNGSLSEQFDKSSGLSLSARDLTWSYAAFLTANMRRNGVVPAPWGAASANSVPSSCSMGSA
TGTYSTATATSWPSTLTSGSPGSTTTVGTSTTSGTATETACATPTAVAVTFNEIATTTYGENVYIVGSISELGNW
DTSKAVALSASKYTSSNNLWYVSVTLFAGTTFEYKYIRKESDGSIVWESDPNRSYTVPAACGVSTATENDTWR

10

【0356】

配列番号 14-p T r e x 3 g M-A f G A 2 の A f G A 2 遺伝子

ATGCCTCGACTGAGCTACGCTCTCTGCGCTCTGTCCCTGGGTACGCTGCCATCGCCGCTCCCCAACTGAGCGCCCCG
AGCTACTGGCAGCCTCGATTCTGGCTGGGCACTGAGACCACCGTTGCTCTGAACGGCATCTCTCGCTAACATCGGCG
CTGATGGTGCCTATGCCAAGAGCGCTAAACCTGGCATCATCATCGCCAGCCCTAGCACCAGCGAGCCTGATTACTAC
TATACTTGGACCCGCGACGCTGCTCTGGTCAACAAGGTCCTCGTTGACCTGTTCCGCAATGGTAACCTGGGCCTCCA
GAAAGTCATTACCGAGTACGTCAACAGCCAAGCTTATCTGCAAACCGTTAGCAATCCCTCCGGTGGCCTCGCTTCCG
GCGGCCTGGCCGAGCCCAAATACAACGTCGACATGACCGCCTTTACCGGTGCCTGGGGTCGCCCCCAGCGAGATGGC
CCTGCCCTGCGCGCCACCGCTCTCATCGACTTCGGCAACTGGCTGATCGACAACGGCTATTCCAGCTATGCTGTCAA
CAACATTTGGCCCATCGTCCGCAACGACCTGTCTATGTTTCCCAATACTGGTCCCAGTCCGGTTTCGACCTCTGGG
AGGAGGTTAATTCCATGAGCTTTTTACCGTCGCTGTCCAACATCGAGCTCTCGTCGAGGGCTCCACTTTTCGCTAAG
CGCGTCGGCGCCAGCTGTTCCCTGGTGCATTCCAGGCCCCCTCAGATTCTGTGTCTACATGCAGTCCTTTTGGACCGG
TAGCTATATCAATGCCAATACCGCGGTGGTTCGAAGCGGCAAGGACGCTAATACTGTTCTGGCTTCCATCCACACCT
TCGATCCCGAGGCGGCTGTGATGATACTACCTTTTCAGCCCTGCTCCCCCTCGCGCTCTCGCCAACCATAAAGTTTAC
ACCGACAGCTTTTCGAGCGTTTACGCCATCAACTCCGGCATTCTCAAGGCGCTGCTGTTTCCGCTGGTGCCTACCC
CGAGGACGTTTACTATAATGGCAACCCCTGGTTCTCACTACTCTGGCTGCTGCTGAGCAGCTCTATGACGCTATCT
ACCAATGGAAGAAAATCGGCAGCATCAGCATTA CTTCACCTCCCTCGCCTTCTTCAAAGACATCTATAGCTCCGCT
GCCGTTGGCACTTATGCTTCCTCCACTAGCACTTTCACTGATATTATCAACGCTGTAAAAACCTACGCTGACGGCTA
CGTCAGCATCGTTCAAGCCCACGCTATGAACAACGGTTCCCTCTCCGAGCAGTTCGACAAGTCCAGCGGTCTGAGCC
TCAGCGCTCGCGACCTCACCTGGTCCTACGCCGCTTCCTGACTGCCAACATGCGCCGAAACGGCGTCTGTTCCCTGCC
CCTTGGGGTGCCGCCAGCGCCAATTCCGTCCCCAGCAGCTGTAGCATGGGCTCCGCCACTGGTACCTACAGCACCGC
TACCGCTACTAGCTGGCCAGCACCTGACTAGCGGCTCCCCCGGTTCCACTACTACCGTCGGCACCACTACCTCCA
CCACTTCCGGTACTGCCACCGAGACTGCCTGTGCCACCCCTACCGCGTCCGCGTCACCTTTAACGAGATTGCTACC
ACCACCTACGGCGAGAACGTCTACATCGTTCGGTAGCATCTCCGAGCTCGGCAATTGGGACACTTCCAAGGCTGTGCG
CCTGTCCGCTCCAAATATACTAGCAGCAACAACCTGTGGTATGTCTCCGTTACCTGCCTGCTGGTACTACTTTTG
AGTACAAGTACATTGCGAAAGAGTCCGATGGCTCCATCGTTTGGGAGTCCGATCCCAACCGAAGCTACACCGTTCCC
GCTGCTTGTGGCGTCTCCACTGCTACTGAGAATGACACCTGGCGCTAA

20

30

40

【図 1 A】

```

配列番号1  ATGSLDSDWLGTTTVALNGILANIGADGAYAKSARPGIIIASPSTSEPDYIYTWTRDAAL 60
配列番号2  ATGSLDSDWLGTTTVALNGILANIGADGAYAKSARPGIIIASPSTSEPDYIYTWTRDAAL 60
配列番号3  ATGSLDSDWLGTTTVALNGILANIGADGAYAKSARPGIIIASPSTSEPDYIYTWTRDAAL 60
配列番号4  ASTSLDAMLATETTVSLGILANIGADGAYAKSARPGIIVASPSTONFNYIYTWTRDAAL 60
配列番号5  ATVGLDAMLASSTTVSLGILANIGSGGAYASARPGIIVASPSTNNFYIYTWTRDAAL 60
配列番号6  ATASLNTWLSSTASFDGLDILTNIGANGAYAKTAKAG-----ADYITWTRDAAL 49
* * * * *
配列番号1  VTKVLVDLFRNGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSGGIAGG-GLAEKPYNVDMTAF TG 119
配列番号2  VTKVLVDLFRNGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSGGIAGG-GLAEKPYNVDMTAF TG 119
配列番号3  VTKVLVDLFRNGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSGGIAGG-GLAEKPYNVDMTAF TG 119
配列番号4  TLKVLVDLFRNGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSGGIAGG-GLAEKPYNVDMTAF TG 120
配列番号5  TLKVLVDLFRNGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSGGIAGG-GLAEKPYNVDMTAF TG 120
配列番号6  VTKVLVDLFRNGNLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSGGIAGG-GLAEKPYNVDMTAF TG 108
* * * * *
配列番号1  AWGRPQRDGPALRATLIDFGNWLIDNGYSYAVNNIWFIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLW 179
配列番号2  AWGRPQRDGPALRATLIDFGNWLIDNGYSYAVNNIWFIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLW 179
配列番号3  AWGRPQRDGPALRATLIDFGNWLIDNGYSYAVNNIWFIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLW 179
配列番号4  SWGRPQRDGPALRATLIDFGNWLIDNGYSYAVNNIWFIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLW 180
配列番号5  GWGRPQRDGPALRATLIDFGNWLIDNGYSYAVNNIWFIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLW 180
配列番号6  SWGRPQRDGPALRATLIDFGNWLIDNGYSYAVNNIWFIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLW 168
* * * * *
配列番号1  EEVNSMSFFTVAQHRALVEGSTFAKRVGASCSWCDGSAQILCYMQSFWTGSYINANTG 239
配列番号2  EEVNSMSFFTVAQHRALVEGSTFAKRVGASCSWCDGSAQILCYMQSFWTGSYINANTG 239
配列番号3  EEVNSMSFFTVAQHRALVEGSTFAKRVGASCSWCDGSAQILCYMQSFWTGSYINANTG 239
配列番号4  EEVNSMSFFTVAQHRALVEGSTFAKRVGASCSWCDGSAQILCYMQSFWTGSYINANTG 240
配列番号5  EEVNSMSFFTVAQHRALVEGSTFAKRVGASCSWCDGSAQILCYMQSFWTGSYINANTG 240
配列番号6  EEVNSMSFFTVAQHRALVEGSTFAKRVGASCSWCDGSAQILCYMQSFWTGSYINANTG 228
* * * * *
配列番号1  GGRSGKDANTVLASHTFDPEAGCDTTFQPCSPFALANHKVYTDSPFSVYAINSGIPQG 299
配列番号2  GGRSGKDANTVLASHTFDPEAGCDTTFQPCSPFALANHKVYTDSPFSVYAINSGIPQG 299
配列番号3  GGRSGKDANTVLASHTFDPEAGCDTTFQPCSPFALANHKVYTDSPFSVYAINSGIPQG 299
配列番号4  GGRSGKDANTVLASHTFDPEAGCDTTFQPCSPFALANHKVYTDSPFSVYAINSGIAGG 300
配列番号5  GGRSGKDSNTVLSTHTFDPEAGCDTTFQPCSPFALANHKVYTDSPFSYIGVNSGIAQG 300
配列番号6  GGRSGKDANTVLASHTFDPEAGCDTTFQPCSPFALANHKVYTDSPFSVYINTGIAQG 288
* * * * *
配列番号1  AAVSAGRYFSDVYNGNFWFLTLAAABQLYDAIYQWKIGSISITSTSLAFFKDIYSSA 359
配列番号2  AAVSAGRYFSDVYNGNFWFLTLAAABQLYDAIYQWKIGSISITSTSLAFFKDIYSSA 359

```

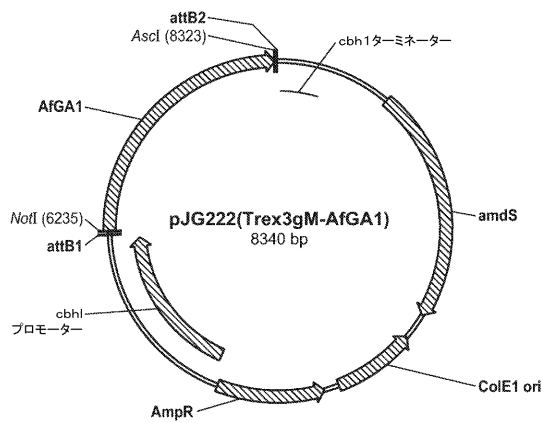
【図 1 B】

```

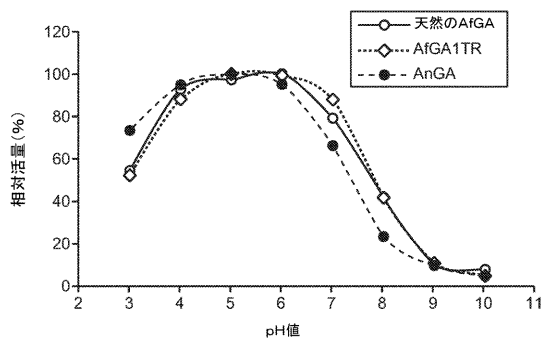
配列番号3  VAVSAGRYFSDVYNGNFWFLTLAAABQLYDAIYQWKIGSISITSTSLAFFKDIYSSA 359
配列番号4  VAVSAGRYFSDVYNGNFWFLTLAAABQLYDAIYQWKIGSISITSTSLAFFKDIYSSA 360
配列番号5  VAVSAGRYFSDVYNGNFWFLTLAAABQLYDAIYQWKIGSISITSTSLAFFKDIYSSA 360
配列番号6  VAVSAGRYFSDVYNGNFWFLTLAAABQLYDAIYQWKIGSISITSTSLAFFKDIYSSA 348
* * * * *
配列番号1  AVGTASSTSTFTDILNAVITYADGVYIVQAHANNNGSLSEQDFKSSGSLSARDLTWS 419
配列番号2  AVGTASSTSTFTDILNAVITYADGVYIVQAHANNNGSLSEQDFKSSGSLSARDLTWS 419
配列番号3  AVGTASSTSTFTDILNAVITYADGVYIVQAHANNNGSLSEQDFKSSGSLSARDLTWS 419
配列番号4  AVGTASSTSTFTDILNAVITYADGVYIVQAHANNNGSLSEQDFKSSGSLSARDLTWS 420
配列番号5  AVGTASSTSTFTDILNAVITYADGVYIVQAHANNNGSLSEQDFKSSGSLSARDLTWS 420
配列番号6  AVGTASSTSTFTDILNAVITYADGVYIVQAHANNNGSLSEQDFKSSGSLSARDLTWS 408
* * * * *
配列番号1  YAAFLTANRRRNGVVPAPWGAASANSVPSSCSMGSAATGYSTATATSWPSTLISGSPGT 479
配列番号2  YAAFLTANRRRNGVVPAPWGAASANSVPSSCSMGSAATGYSTATATSWPSTLISGSPGT 479
配列番号3  YAAFLTANRRRNGVVPAPWGAASANSVPSSCSMGSAATGYSTATATSWPSTLISGSPGT 478
配列番号4  YAAFLTANRRRNGVVPAPWGAASANSVPSSCSMGSAATGYSTATATSWPSTLISGSPGT 480
配列番号5  YAAFLTANRRRNGVVPAPWGAASANSVPSSCSMGSAATGYSTATATSWPSTLISGSPGT 479
配列番号6  YAAFLTANRRRNGVVPAPWGAASANSVPSSCSMGSAATGYSTATATSWPSTLISGSPGT 468
* * * * *
配列番号1  TTVGT-----TSTTSGTAETACATETAVAVTFNRLATITTYGENVYIVGSLSELGNDW 533
配列番号2  TTVGT-----TSTTSGTATETACATETAVAVTFNRLATITTYGENVYIVGSLSELGNDW 533
配列番号3  TTVGT-----TSTTSGTATETACATETAVAVTFNRLATITTYGENVYIVGSLSELGNDW 529
配列番号4  TTVGT-----TSTTSGTATETACATETAVAVTFNRLATITTYGENVYIVGSLSELGNDW 538
配列番号5  TTVGT-----TSTTSGTATETACATETAVAVTFNRLATITTYGENVYIVGSLSELGNDW 539
配列番号6  TTVGT-----TSTTSGTATETACATETAVAVTFNRLATITTYGENVYIVGSLSELGNDW 525
* * * * *
配列番号1  TSKAVALSASKYTSNNLWYVSVLPAGTTFEYKIRKESDGSIVWSDPNRSYVTPAAC 593
配列番号2  TSKAVALSASKYTSNNLWYVSVLPAGTTFEYKIRKESDGSIVWSDPNRSYVTPAAC 593
配列番号3  TSKAVALSASKYTSNNLWYVSVLPAGTTFEYKIRKESDGSIVWSDPNRSYVTPAAC 589
配列番号4  TSKAVALSASKYTSNNLWYVSVLPAGTTFEYKIRKESDGSIVWSDPNRSYVTPAAC 598
配列番号5  TSKAVALSASKYTSNNLWYVSVLPAGTTFEYKIRKESDGSIVWSDPNRSYVTPAAC 599
配列番号6  TSKAVALSASKYTSNNLWYVSVLPAGTTFEYKIRKESDGSIVWSDPNRSYVTPAAC 585
* * * * *
配列番号1  GVSATENDTWR----- 605
配列番号2  GVSATENDTWR----- 605
配列番号3  GVSATENDTWR----- 601
配列番号4  GVSATENDTWR----- 610
配列番号5  GVSATENDTWR----- 611
配列番号6  GVSATENDTWR----- 607

```

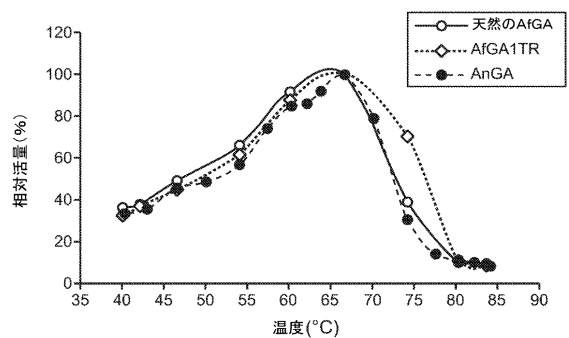
【図 2】



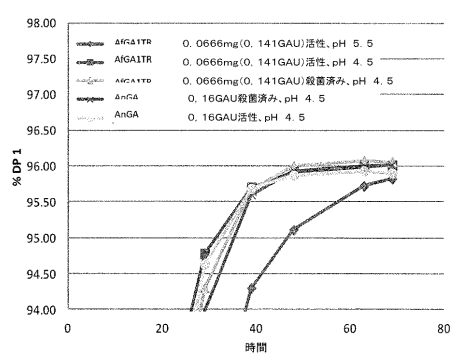
【図 3】



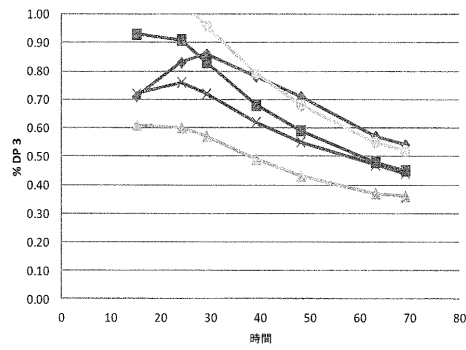
【図 4】



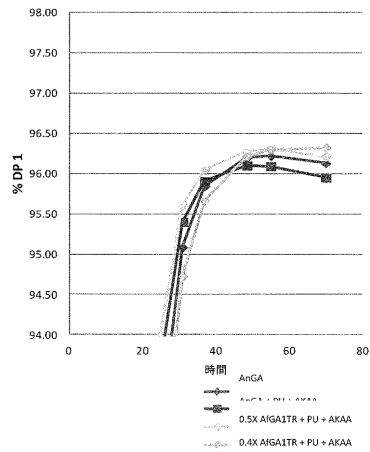
【図 5 A】



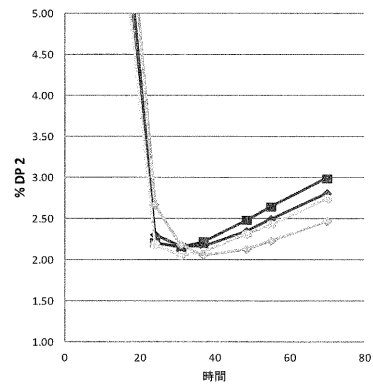
【図 5 B】



【図 6 A】

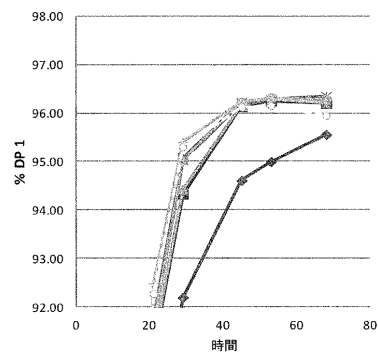


【図 6 B】



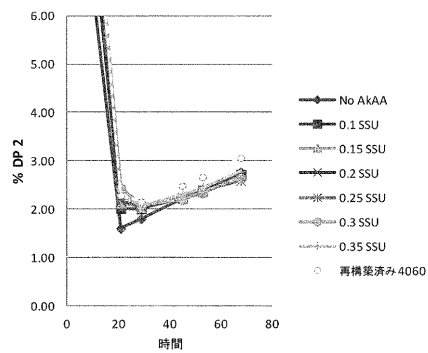
【図 7 A】

AkAAが糖化に及ぼす影響
(59 μ g + 0.256 ASPU $\pm$ AkAA)

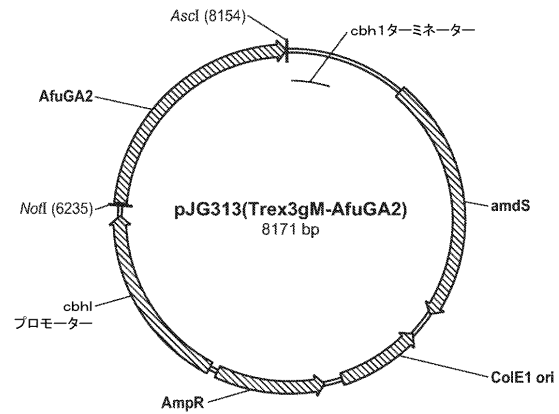


【図 7 B】

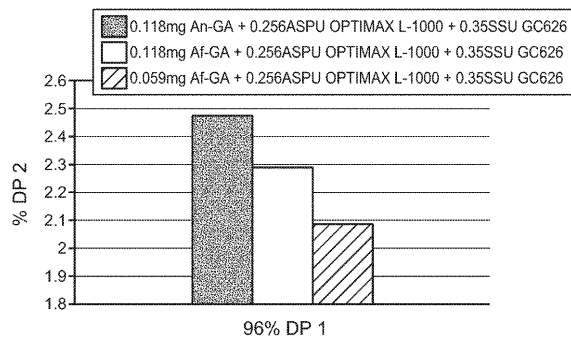
AkAAが糖化に及ぼす影響
(59 μ g + 0.256 ASPU $\pm$ AkAA)



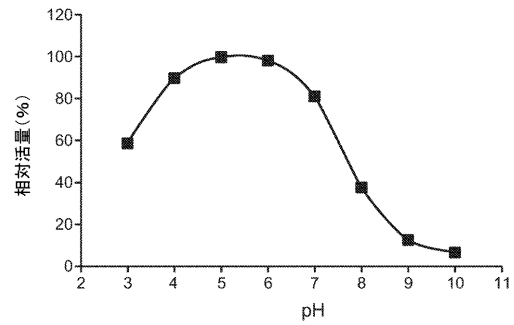
【図 9】



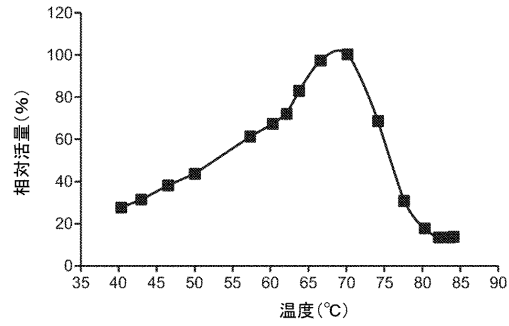
【図 8】



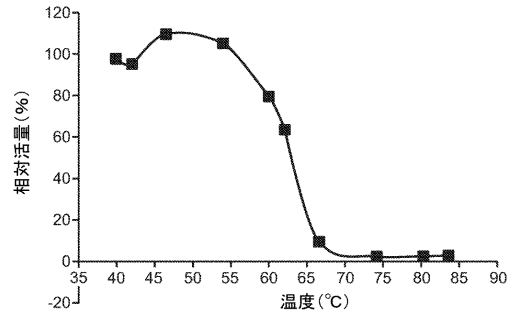
【図 10】



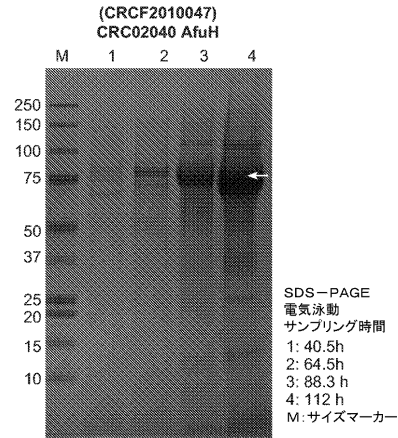
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



【配列表】

0006499081000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/09
 C 1 2 N 15/31 (2006.01) C 1 2 N 15/31 Z N A
- (74)代理人 100169993
 弁理士 今井 千裕
- (74)代理人 100131082
 弁理士 小原 正信
- (74)代理人 100185535
 弁理士 逢坂 敦
- (72)発明者 ジー、ジン
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 ファー、リン
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 リー、スン・ホー
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 リ、ジャルセン
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 シェティ、ジャヤラマ・ケー
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 タン、ゾンメイ
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 ジャン、ボー
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 ゾン、クン
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5
 、ダニスコ・ユーエス・インク

審査官 濱田 光浩

- (56)参考文献 特表2007-512813 (JP, A)
 国際公開第03/012071 (WO, A1)
 特表2002-508977 (JP, A)
 特表2007-521797 (JP, A)
 特表2010-517572 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 1 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
SwissProt/GeneSeq
WPIDS (STN)

- (54) 【発明の名称】 アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 由来のグルコアミラーゼを発現するトリコデルマ・レーシ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞、及びその使用方法