

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載
 【部門区分】第 1 部門第 1 区分
 【発行日】平成30年11月8日(2018.11.8)

【公表番号】特表2017-530702(P2017-530702A)
 【公表日】平成29年10月19日(2017.10.19)
 【年通号数】公開・登録公報2017-040
 【出願番号】特願2017-514847(P2017-514847)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 9/42 (2006.01)

C 1 2 P 19/14 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 9/42

C 1 2 P 19/14 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成30年9月21日(2018.9.21)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バイオマス分解活性を有する複数のポリペプチドおよび可溶化剤を含む混合物であって、前記ポリペプチドが、バイオマス分解活性を有する天然のポリペプチドと比較して、少なくとも 8 ~ 10 % のバイオマス分解活性を有する、混合物。

【請求項 2】

封入体と結合した 1 つまたは複数のタンパク質をさらに含む、請求項 1 に記載の混合物。

【請求項 3】

前記混合物が、封入体と結合した 1 つまたは複数のタンパク質を含まない、請求項 1 に記載の混合物

【請求項 4】

細胞のデブリ、1 つもしくは複数のリボソームの成分、1 つもしくは複数の宿主タンパク質、ならびに / または DNA および / もしくは RNA を含む宿主の核酸をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の混合物。

【請求項 5】

前記バイオマス分解活性が、セロビアーゼ活性、リグニナーゼ活性、エンドグルカナーゼ活性、セロビオヒドロラーゼ活性、またはキシラナーゼ活性である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の混合物。

【請求項 6】

前記ポリペプチドが、部分的にアンフォールドされている、部分的にミスフォールドされている、または部分的に変性されている、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の混合物。

【請求項 7】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO : 1 と少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の混合物。

【請求項 8】

前記ポリペプチドが、

a) 前記 SEQ ID NO: 1 のアミノ酸配列を含む、

b) T.リーセイ (T. reesei) 由来の Cel3A 酵素を含む、

c) SEQ ID NO: 2 もしくは SEQ ID NO: 3 と少なくとも 90% の同一性を有する核酸配列によりコードされている、および/または、

d) アグリコシル化されている、

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の混合物。

【請求項 9】

SEQ ID NO: 1 と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を有する複数のポリペプチドと可溶化剤とを含む混合物であって、前記複数のポリペプチドが、SEQ ID NO: 1 を含む天然のポリペプチドの活性の少なくとも 20 ~ 40% を有する、混合物。

【請求項 10】

細胞のデブリ、1つもしくは複数のリボソームの成分、1つもしくは複数の宿主タンパク質、ならびに/または DNA および/もしくは RNA を含む宿主の核酸をさらに含む、請求項 9 に記載の混合物。

【請求項 11】

前記ポリペプチドが、

a) 部分的にアンフォールドされている、部分的にミスフォールドされている、または部分的に変性されている、

b) SEQ ID NO: 2 もしくは SEQ ID NO: 3 と少なくとも 90% の同一性を有する核酸配列によりコードされている、および/または、

c) アグリコシル化されている、

請求項 9 または 10 に記載の混合物。

【請求項 12】

前記可溶化剤が尿素を含み、任意に 0.2 M ~ 6 M の濃度で存在する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の混合物。

【請求項 13】

バイオマス分解活性を有する少なくとも 1 つの追加的なポリペプチド、またはバイオマス分解活性を有する 1 つもしくは複数の酵素を産生する微生物をさらに含み、前記追加的なポリペプチドが、リグニナーゼ、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、セロビアナーゼ、またはキシラナーゼである、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の混合物。

【請求項 14】

前記追加的なポリペプチドが、

a. SEQ ID NO: 1 と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b. T.リーセイ (T. reesei) 由来の Cel3A 酵素、もしくはその機能的なバリエーションもしくは断片、または

c. SEQ ID NO: 2 もしくは SEQ ID NO: 3 を含む (たとえばからなる) 核酸配列によりコードされているポリペプチドから選択される、請求項 13 に記載の混合物。

【請求項 15】

バイオマス分解活性を有するポリペプチドを発現する細胞またはそのライセートを、前記ポリペプチドを可溶化させるのに適した濃度の可溶化剤と接触させることを含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の混合物を生成する方法。

【請求項 16】

バイオマス分解活性を有するポリペプチドを生成する方法であって、細胞で前記ポリペプチドを発現させることと、前記細胞またはそのライセートを、前記ポリペプチドを可溶化させるのに適した濃度の可溶化剤と接触させることとを含む、方法。

【請求項 17】

バイオマス分解活性を有するポリペプチドを生成する方法であって、バイオマス分解活性を有する少なくとも1つのポリペプチドを産生するように遺伝的に改変された細胞を準備することであって、前記バイオマス分解活性を有するポリペプチドの少なくとも一部が封入体で見いだされる、ことと、前記封入体を含む前記細胞またはそのライセートを、前記ポリペプチドを可溶化させるのに適した濃度の可溶化剤と接触させることとを含む、方法。

【請求項 18】

前記可溶化剤が尿素を含み、0.2 M ~ 6 Mの濃度で存在する、請求項 15 ~ 17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 19】

前記細胞を溶解してライセートを得ることと、前記ライセートの不溶性分画から可溶性分画を分離することと、前記可溶化剤に前記不溶性分画を再懸濁することとをさらに含む、請求項 15 ~ 18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 20】

前記バイオマス分解活性が、セロビアーゼ活性、リグニナーゼ活性、エンドグルカナーゼ活性、セロビオヒドロラーゼ活性、キシラナーゼ活性である、請求項 15 ~ 19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 21】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 15 ~ 17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 22】

前記ポリペプチドが、T. リーセイ (T. reesei) 由来の Cel 3 A、またはその機能的なバリエーションもしくは断片を含む、請求項 16 ~ 21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 23】

前記細胞が、細菌細胞、たとえば大腸菌細胞、origami大腸菌細胞である、請求項 16 ~ 22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 24】

バイオマスから生成物を生成する方法であって、前記生成物の生成に適した条件下で、例えば電子ビームで処理することにより、請求項 1 ~ 14のいずれか1項に記載の混合物、ならびに1つもしくは複数のバイオマス分解酵素および/またはバイオマス分解酵素を含む酵素混合物を産生する微生物の混合物と、バイオマスと接触させることを含む、

a) 前記生成物が糖生成物 (例えばグルコースおよび/またはキシロース) である、および/または、

b) 前記方法が前記糖生成物を単離することをさらに含む、前記糖生成物の単離が、沈殿、結晶化、クロマトグラフィー、遠心分離、または抽出を含む、
方法。

【請求項 25】

前記混合物が、B2AF03、CIP1、CIP2、Cel1a、Cel3a、Cel5a、Cel6a、Cel7a、Cel7b、Cel12a、Cel45a、Cel74a、paMan5a、paMan26a、およびスウォレニンから選択される、少なくとも2つの酵素を含む、請求項 24に記載の方法。

【請求項 26】

前記バイオマスが、農産物または農業廃棄物、紙製品または紙屑、林産物、もしくは一般廃棄物、またはそれらの任意の組み合わせのうち1つ以上を含み；ここで：

a) 農産物または農業廃棄物が、サトウキビ、ジュート、ヘンプ、亜麻、竹、サイザル麻、アルファルファ、干し草、アラカチャ、ソバ、バナナ、オオムギ、キャッサバ、クズ、オカ、サゴ、ソルガム、ジャガイモ、サツマイモ、タロイモ、ヤム、マメ、ソラマメ、レンズマメ、エンドウマメ、草、スイッチグラス、ススキ、スパルティナ、クサヨシ、穀粒

残渣、キャノーラわら、麦わら、オオムギわら、カラスムギわら、コメわら、トウモロコシ穂軸、コーン・ストーパー、コーンファイバ、ココナツヘア、ビートパルプ、バガス、ダイズストーパー、穀粒残渣、もみ殻、カラスムギ殻、コムギもみ殻、オオムギ殻、もしくはビーズウイング、またはそれらの組み合わせを含み；

b) 紙製品または紙屑が、紙、着色紙、塗被紙、コート紙、充填紙、雑誌、印刷物、プリンター用紙、ポリコート紙、カード用紙、ボール紙、板紙、もしくは紙パルプ、またはそれらの組み合わせを含み；

c) 林産物が、アスペン材、パーティクルボード、木材チップ、もしくはおがくず、またはそれらの組み合わせを含み；ならびに

d) 一般廃棄物が、堆肥、下水、もしくはくず、またはそれらの組み合わせを含む、24または25に記載の方法。

【請求項27】

前記バイオマス分解酵素を産生する微生物が、バチルス (*Bacillus*)、コプリナス (*Coprinus*)、ミセリオフソラ (*Myceliophthora*)、セファロスポリウム (*Cephalosporium*)、スキタリジウム (*Scytalidium*)、ペニシリウム (*Penicillium*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、ヒュミコラ (*Humicola*)、フサリウム (*Fusarium*)、チエラビア (*Thielavia*)、アクレモニウム (*Acremonium*)、クリソスポリウム (*Chrysosporium*)、メリピウス (*Meripilus*)、またはトリコデルマ (*Trichoderma*) から選択される属の一種に由来する、請求項24～26のいずれか1項に記載の方法。