



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2012117762/10, 29.09.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
01.10.2009 US 12/571,702

(43) Дата публикации заявки: 10.11.2013 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 02.05.2012(86) Заявка РСТ:  
US 2010/050659 (29.09.2010)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2011/041367 (07.04.2011)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городиский и  
Партнеры"

(71) Заявитель(и):

**Е.И.ДЮПОН ДЕ НЕМУР ЭНД  
КОМПАНИ (US)**

(72) Автор(ы):

**ДИКОСИМО Роберт (US),  
ГАВАГАН Джон Эдвард (US),  
ПЭЙН Марк Скотт (US)**(54) **ПЕРГИДРОЛАЗА ДЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРКИСЛОТЫ**

## (57) Формула изобретения

1. Способ получения целевой концентрации пероксикарбоновой кислоты, включающий:

(a) выбор комплекта реакционных компонентов, включающих:

(1) по меньшей мере один субстрат, выбранный из группы, состоящей из:

(i) сложных эфиров со структурой

 $[X]_m R_5$ ,

где

X = сложноэфирная группа формулы  $R_6-C(O)O$ ;

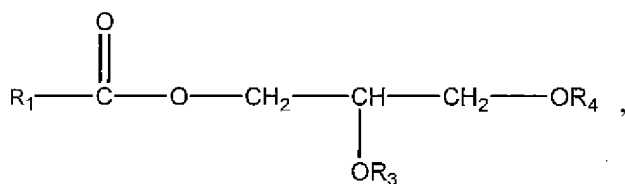
$R_6$  = C1-C7 линейная, разветвленная или циклическая углеводородная часть, необязательно замещенная гидроксильными группами или C1-C4 алкокси-группами, где  $R_6$  необязательно включает одну или несколько простых эфирных связей для  $R_6$  = C2-C7;

$R_5$  = C1-C6 линейная, разветвленная или циклическая углеводородная часть, необязательно замещенная гидроксильными группами; где каждый атом углерода в  $R_5$  отдельно включает не более одной гидроксильной группы или не более одной сложноэфирной группы; где  $R_5$  необязательно включает одну или несколько простых эфирных связей;

m = от 1 до количества атомов углерода в R<sub>5</sub>; и

где указанные сложные эфиры имеют растворимость в воде по меньшей мере 5 ppm при 25°C;

(ii) глицеридов со структурой



где R<sub>1</sub> = C1-C7 алкил с линейной цепью или разветвленной цепью, необязательно замещенный гидроксильной или C1-C4 алкокси-группой, и R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> отдельно представляют собой H или R<sub>1</sub>C(O); и

(iii) ацетилированных сахаридов, выбранных из группы, состоящей из ацетилированных моносахаридов, ацетилированных дисахаридов и ацетилированных полисахаридов;

(2) источник перекиси; и

(3) фермент-катализатор, обладающий пергидролизной активностью, где указанный фермент-катализатор включает фермент с опознавательным мотивом, который выравнивается с эталонной последовательностью SEQ ID NO:2 с помощью CLUSTALW, причем указанный опознавательный мотив включает:

(i) мотив RGQ в положениях аминокислот 118-120 SEQ ID NO:2;

(ii) мотив GX SQG в положениях аминокислот 179-183 SEQ ID NO:2; и

(iii) мотив HE в положениях аминокислот 298-299 SEQ ID NO:2;

где указанный фермент имеет по меньшей мере 95% идентичность аминокислот с SEQ ID NO:4; и

(b) объединение реакционных компонентов в водных реакционных условиях с образованием реакционной смеси; в результате чего образуются продукты реакции, включающие ферментативно полученную пероксикарбоновую кислоту; где

(1) pH реакционной смеси остается в диапазоне от приблизительно 6,0 до приблизительно 9,0; и

(2) концентрация пероксикарбоновой кислоты, образуемой через одну минуту после объединения реакционных компонентов, не превышена более чем на 100% при времени реакции равном или более пяти минут после объединения реакционных компонентов.

2. Способ по п. 1, где концентрация пероксикарбоновой кислоты, образованной через одну минуту после объединения реакционных компонентов, не превышена более чем на 100% при времени реакции равном или более 30 минут после объединения реакционных компонентов.

3. Способ по п. 1, где концентрация пероксикарбоновой кислоты, образованной через одну минуту после объединения реакционных компонентов, не превышена более чем на 50% при времени реакции равном или более пяти минут после объединения реакционных компонентов.

4. Способ по п. 3, где концентрация пероксикарбоновой кислоты, образованной через одну минуту после объединения реакционных компонентов, не превышена более чем на 20% при времени реакции равном или более пяти минут после объединения реакционных компонентов.

5. Способ по п. 1, где общее количество пероксикарбоновой кислоты, получаемой с помощью способа, не ограничено количеством субстрата или количеством перекиси в реакционной смеси.

6. Способ по п. 1, где pH реакционной смеси находится в диапазоне от приблизительно

6,5 до приблизительно 8,5.

7. Способ по п. 6, где pH реакционной смеси находится в диапазоне от приблизительно 7,0 до приблизительно 8,0.

8. Способ по п. 1, где реакционная смесь включает по меньшей мере один буфер.

9. Способ по п. 8, где по меньшей мере один буфер выбирают из группы, состоящей из натрия бикарбоната, калия бикарбоната, смесей натрия бикарбоната и калия бикарбоната, натрия фосфата, калия фосфата и смесей натрия фосфата и калия фосфата.

10. Способ по п. 1, где субстрат выбирают из группы, состоящей из: моноацетина; диацетина; триацетина; монопропионина; дипропионина; трипропионина; монобутирина; дибутирина; трибутирина; глюкозапентаацетата; ксилозатетраацетата; ацетилизованного ксилана; фрагментов ацетилизованного ксилана;  $\beta$ -D-рибофураноза-1,2,3,5-тетраацетата; три-O-ацетил-D-галакталя; три-O-ацетилглюкаля; сложных моноэфиров или сложных диэфиров 1,2-этандиола; 1,2-пропандиола; 1,3-пропандиола; 1,2-бутандиола; 1,3-бутандиола; 2,3-бутандиола; 1,4-бутандиола; 1,2-пентандиола; 2,5-пентандиола; 1,6-пентандиола; 1,2-гександиола; 2,5-гександиола; 1,6-гександиола; пропиленгликольдиацетата; этиленгликольдиацетата; и их смесей.

11. Способ по п. 1, где пероксикарбоновую кислоту получают из перуксусной кислоты, перпропионовой кислоты, пермасляной кислоты, пермолочной кислоты, пергликолевой кислоты, перметоксиуксусной кислоты, пер- $\beta$ -гидроксимасляной кислоты или их смесей.

12. Способ по п. 1, где фермент-катализатор находится в форме микробной клетки, пермеабилзированной микробной клетки, микробного клеточного экстракта, частично очищенного фермента или очищенного фермента.

13. Способ по п. 1, где фермент-катализатор не обладает каталазной активностью.

14. Способ по п. 1, дополнительно включающий этап: (с) приведения в контакт поверхности или неживого объекта с пероксикарбоновой кислотой, образованной на этапе (b), в результате чего указанную поверхность или указанный неживой объект дезинфицируют, обесцвечивают, устраняют его запах или отбеливают.

15. Способ по п. 1, дополнительно включающий этап: (с) приведения в контакт текстильного изделия с пероксикарбоновой кислотой, образованной на этапе (b), посредством чего текстильное изделие получает пользу.

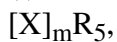
16. Способ по п. 15, где пользу выбирают из группы, состоящей из дезинфекции, отбеливания, обесцвечивания, устранения запаха и любой их комбинации.

17. Способ получения целевой концентрации пероксикарбоновой кислоты, включающий:

(a) выбор комплекта реакционных компонентов, включающих:

(1) по меньшей мере один субстрат, выбранный из группы, состоящей из:

(i) сложных эфиров со структурой



где

X = сложноэфирная группа формулы  $R_6-C(O)O$ ;

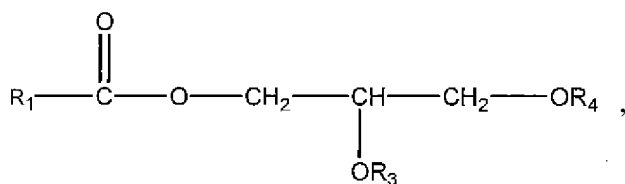
$R_6$  = C1-C7 линейная, разветвленная или циклическая углеводородная часть, необязательно замещенная гидроксильными группами или C1-C4 алкокси-группами, где  $R_6$  необязательно включает одну или несколько простых эфирных связей для  $R_6$  = C2-C7;

$R_5$  = C1-C6 линейная, разветвленная или циклическая углеводородная часть, необязательно замещенная гидроксильными группами; где каждый атом углерода в  $R_5$  отдельно включает не более одной гидроксильной группы или не более одной сложноэфирной группы; где  $R_5$  необязательно включает одну или несколько простых

эфирных связей;

m = от 1 до количества атомов углерода в R<sub>5</sub>; и где указанные сложные эфиры имеют растворимость в воде по меньшей мере 5 ppm при 25°C;

(ii) глицеридов со структурой



где R<sub>1</sub> = C1-C7 алкил с линейной цепью или разветвленной цепью, необязательно замещенный гидроксильной или C1-C4 алкокси-группой, и R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> отдельно представляют собой H или R<sub>1</sub>C(O); и

(iii) ацетилированных сахаридов, выбранных из группы, состоящей из ацетилированных моносахаридов, ацетилированных дисахаридов и ацетилированных полисахаридов;

(2) источник перекиси; и

(3) фермент-катализатор, обладающий пергидролизной активностью, где указанный фермент-катализатор включает фермент с опознавательным мотивом, который выравнивается с эталонной последовательностью SEQ ID NO:2 с помощью CLUSTALW, причем указанный опознавательный мотив включает:

(i) мотив RGQ в положениях аминокислот 118-120 SEQ ID NO:2;

(ii) мотив GXSQG в положениях аминокислот 179-183 SEQ ID NO:2; и

(iii) мотив HE в положениях аминокислот 298-299 SEQ ID NO:2;

где указанный фермент имеет по меньшей мере 95% идентичность аминокислот с SEQ ID NO:4; и

(b) объединение выбранного комплекта реакционных компонентов в водных условиях реакции с образованием реакционной смеси; в результате чего образуются продукты реакции, включающие ферментативно полученную пероксикарбоновую кислоту; где

(1) pH водной реакционной смеси остается в диапазоне от приблизительно 6,0 до приблизительно 9,0; и

(2) концентрация пероксикарбоновой кислоты, образованной через пять минут после объединения реакционных компонентов, не превышена более чем на 100% при времени реакции равном или более 30 минут после объединения реакционных компонентов.

18. Способ по п. 17, где концентрация пероксикарбоновой кислоты, образованной через пять минут после объединения реакционных компонентов, не превышена более чем на 50% при времени реакции равном или более 30 минут после объединения реакционных компонентов.

19. Способ по п. 18, где концентрация пероксикарбоновой кислоты, образованной через пять минут после объединения реакционных компонентов, не превышена более чем на 20% при времени реакции равном или более 30 минут после объединения реакционных компонентов.

20. Композиция, включающая:

(a) комплект реакционных компонентов, включающий:

(1) по меньшей мере один субстрат, выбранный из группы, состоящей из:

(i) сложных эфиров со структурой



где

X = сложноэфирная группа формулы R<sub>6</sub>-C(O)O;

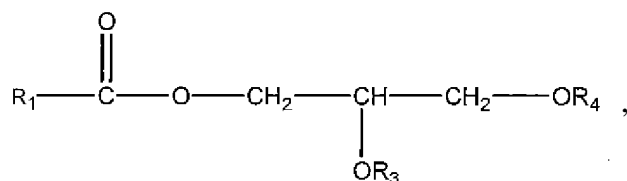
$R_6$  = C1-C7 линейная, разветвленная или циклическая углеводородная часть, необязательно замещенная гидроксильными группами или C1-C4 алкокси-группами, где  $R_6$  необязательно включает одну или несколько простых эфирных связей для  $R_6$  = C2-C7;

$R_5$  = C1-C6 линейная, разветвленная или циклическая углеводородная часть, необязательно замещенная гидроксильными группами; где каждый атом углерода в  $R_5$  отдельно включает не более одной гидроксильной группы или не более одной сложноэфирной группы; где  $R_5$  необязательно включает одну или несколько простых эфирных связей;

$m$  = от 1 до количества атомов углерода в  $R_5$ ; и

где указанные сложные эфиры имеют растворимость в воде по меньшей мере 5 ppm при 25°C;

(ii) глицеридов со структурой



где  $R_1$  = C1-C7 алкил с линейной цепью или разветвленной цепью, необязательно замещенный гидроксильной или C1-C4 алкокси-группой, и  $R_3$  и  $R_4$  отдельно представляют собой H или  $R_1C(O)$ ; и

(iii) ацелированных сахаридов, выбранных из группы, состоящей из ацелированных моносахаридов, ацелированных дисахаридов и ацелированных полисахаридов;

(2) источник перекиси; и

(3) фермент-катализатор, обладающий пергидролизной активностью, где указанный фермент-катализатор включает фермент с опознавательным мотивом, который выравнивается с эталонной последовательностью SEQ ID NO:2 с помощью CLUSTALW, причем указанный опознавательный мотив включает:

(i) мотив RGQ в положениях аминокислот 118-120 SEQ ID NO:2;

(ii) мотив GXSQG в положениях аминокислот 179-183 SEQ ID NO:2; и

(iii) мотив HE в положениях аминокислот 298-299 SEQ ID NO:2;

где указанный фермент также имеет по меньшей мере 95% идентичность аминокислот с SEQ ID NO:4; и

(b) по меньшей мере одну пероксикарбоновую кислоту, образованную при объединении комплекта реакционных компонентов из (a).

21. Композиция по п. 20, где фермент-катализатор включает фермент с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4.

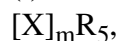
22. Набор, включающий:

(a) первое отделение, включающее

(1) фермент-катализатор, включающий фермент, имеющий по меньшей мере 95% идентичность аминокислот с SEQ ID NO: 4;

(2) по меньшей мере один субстрат, выбранный из группы, состоящей из:

(i) сложных эфиров со структурой



где

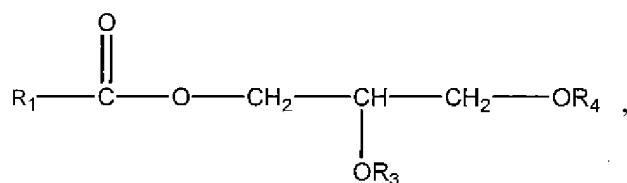
X = сложноэфирная группа формулы  $R_6-C(O)O$ ;

$R_6$  = C1-C7 линейная, разветвленная или циклическая углеводородная часть, необязательно замещенная гидроксильными группами или C1-C4 алкокси-группами, где  $R_6$  необязательно включает одну или несколько простых эфирных связей для  $R_6$  = C2-C7;

$R_5$  = C1-C6 линейная, разветвленная или циклическая углеводородная часть, необязательно замещенная гидроксильными группами; где каждый атом углерода в  $R_5$  отдельно включает не более одной гидроксильной группы или не более одной сложноэфирной группы; где  $R_5$  необязательно включает одну или несколько простых эфирных связей;

$m$  = от 1 до количества атомов углерода в  $R_5$ ; и где указанные сложные эфиры имеют растворимость в воде по меньшей мере 5 ppm при 25°C;

(ii) глицеридов со структурой



где  $R_1$  = C1-C7 алкил с линейной цепью или разветвленной цепью, необязательно замещенный гидроксильной или C1-C4 алкокси-группой, и  $R_3$  и  $R_4$  отдельно представляют собой H или  $R_1C(O)$ ; и

(iii) ацелированных сахаридов, выбранных из группы, состоящей из ацелированных моносахаридов, ацелированных дисахаридов и ацелированных полисахаридов; и

(3) необязательный буфер; и

(b) второе отделение, включающее

(1) источник перекиси;

(2) стабилизатор перекиси; и

(3) необязательный буфер.