

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年12月19日(19.12.2024)



(10) 国際公開番号
WO 2024/257876 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 9/80 (2006.01) C12N 9/54 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/021776

(22) 国際出願日: 2024年6月14日(14.06.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-098146 2023年6月14日(14.06.2023) JP

(71) 出願人: 天野 エンザイム 株式会社 (AMANO ENZYME INC.) [JP/JP]; 〒4608630 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号 Aichi (JP).

(72) 発明者: 谷内 寛之 (YACHI, Hiroyuki); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ一丁目6番 天野エンザイム株式会社 イノベーションセンター内 Gifu (JP).

(74) 代理人: 田中 順也, 外 (TANAKA, Junya et al.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島6-2-40 中之島インテス21階 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: LIQUID ENZYME PREPARATION

(54) 発明の名称: 液体酵素製剤

(57) Abstract: The present invention provides a liquid enzyme preparation containing a protein deamidase and having excellent activity stability, the liquid enzyme preparation comprising the protein deamidase together with another enzyme. A liquid enzyme preparation comprising a protein deamidase and a protease is excellent with respect to the stability of the activity of the protein deamidase.

(57) 要約: 本発明は、タンパク質脱アミド酵素を他の酵素とともに含む液体酵素製剤であって、活性安定性に優れたタンパク質脱アミド酵素の液体酵素製剤を提供する。タンパク質脱アミド酵素と、プロテアーゼを含む液体酵素製剤は、タンパク質脱アミド酵素の活性安定性に優れる。



WO 2024/257876 A1

明 細 書

発明の名称：液体酵素製剤

技術分野

[0001] 本発明は、液体酵素製剤に関する。より具体的には、本発明は、タンパク質脱アミド酵素の活性安定性に優れた、タンパク質脱アミド酵素を含む液体酵素製剤に関する。

背景技術

[0002] タンパク質中のグルタミン残基及びアスパラギン残基の γ -アミド基及び β -アミド基を脱アミド化する酵素として、特許文献1等に記載されているように、クリセオバクテリウム・グレウムJCM2410株由来のプロテイングルタミナーゼ及びクリセオバクテリウム・プロテオリティカム9670株由来のプロテイングルタミナーゼが知られている。このようなタンパク質脱アミド酵素の酵素製剤製品は、現在、粉末形態で市販されているのみである。

[0003] 酵素製剤に関しては、一般的に、ダスティング及びハンドリングの点を考慮すると、粉末形態よりも液体形態の方が望ましい。このため、酵素製剤を液状形態で製剤化する技術が、種々の酵素について検討されている。例えば、特許文献2には、25%～100% (w/w) のポリオールを含み、4.4～5.1の範囲内のpH値を有するポリオール-水懸濁液に少なくとも1種の乳タンパク質架橋及び／又は修飾酵素を含むことを特徴とする液体酵素製剤が提案されている。具体的には、特許文献2では、pH5.2におけるトランスグルタミナーゼの安定性が低いことを見出し、この知見に基づいて、pH4.4～4.8のグリセロール-水懸濁液中のトランスグルタミナーゼ製剤、pH4.6のソルビトール-水懸濁液中のトランスグルタミナーゼ製剤の安定性が向上していることを開示するとともに、これに付随して、pH4.6のグリセロール-水懸濁液中のチロシナーゼ製剤及びpH4.6のグリセロール-水懸濁液中のタンパク質グルタミナーゼ製剤も開示している。

。

[0004] また、特許文献3には、有用タンパク質、溶媒、チオール構造を有する化合物を含む有用タンパク質組成物において、窒素等の窒息性ガスをバブリングさせることで溶存酸素濃度が3 mg/L以下とすることにより、安定なインターフェロンなどの有用タンパク質組成物を製造することができることが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2010/029685号

特許文献2：国際公開第2013/064736号

特許文献3：特開2013-049650号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 特許文献2には、トランスグルタミナーゼ製剤の液体酵素製剤については安定性が検討されている一方で、タンパク質脱アミド酵素の液体酵素製剤については製剤処方の開示のみにとどまり、この酵素の安定性について十分な検討はなされていない。また、特許文献3には、イヌインターフェロン-γを含む水性製剤についてはその抗ウイルス活性が検討されている一方で、タンパク質脱アミド酵素の液体酵素製剤については言及すらなく、当然に何らの検討もされていない。また、酵素製剤には、複数種の酵素が組み合わせられて組成されるものがあるが、タンパク質脱アミド酵素を他の酵素とともに含む液体酵素製剤についての、タンパク質脱アミド酵素の安定性についての検討もなされていない。

[0007] そこで本発明の目的は、タンパク質脱アミド酵素を他の酵素とともに含む液体酵素製剤であって、タンパク質脱アミド酵素の活性安定性に優れた液体酵素製剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は、鋭意検討の結果、タンパク質脱アミド酵素を含む液体酵素製剤が、プロテアーゼを含んでいても、タンパク質脱アミド酵素の活性安定性に優れることを見出した。

[0009] さらに、本発明者は、タンパク質脱アミド酵素及びプロテアーゼを含む液体酵素製剤において、内部空間が不活性ガスで置換された容器に収容する場合、プロテアーゼ含有量の上限を所定量に制限する場合、及び／又は所定量以上のプロテアーゼ共存下でソルビトールを配合する場合に、タンパク質脱アミド酵素の活性安定性が一層向上すること、並びに、所定量以上のプロテアーゼ共存下でクエン酸塩を配合した場合でもタンパク質脱アミド酵素の優れた活性安定性が得られることを見出した。

[0010] 本発明は、これらの知見に基づいて完成されたものである。すなわち、本発明は、以下に掲げる発明を含む。

[0011] 項 1. (A) タンパク質脱アミド酵素と、(B) プロテアーゼとを含む、液体酵素製剤。

項 2. 前記液体酵素製剤が、内部空間が不活性ガスで置換された容器に収容されている、項 1 に記載の液体酵素製剤。

項 3. さらに (C) ソルビトールを含む、項 1 又は 2 に記載の液体酵素製剤。

項 4. さらに (D) クエン酸塩を含む、項 1 ～ 3 のいずれかに記載の液体酵素製剤。

項 5. 前記 (C) 成分の含有量が 30 w/v % 以上である、項 3 に記載の液体酵素製剤。

項 6. 前記 (D) 成分の含有量が 1 w/v % 以上である、項 3 又は 4 に記載の液体酵素製剤。

項 7. pH 5.5 以上である、項 1 ～ 6 のいずれかに記載の液体酵素製剤。

項 8. pH 8.2 以下である、項 1 ～ 7 のいずれかに記載の液体酵素製剤。

項 9. 前記 (A) 成分の含量が $0.1 \sim 10,000 \text{ U/ml}$ である、項 1 ～ 8 のいずれかに記載の液体酵素製剤。

項 10. 前記 (A) 成分がクリセオバクテリウム・プロテオリティカム由来のタンパク質脱アミド酵素である、項 1 ～ 9 のいずれかに記載の液体酵素製剤。

項 11. 前記 (B) 成分の含量が $0.01 \sim 2,000 \text{ U/mL}$ である、項 1 ～ 10 のいずれかに記載の液体酵素製剤。

項 12. 前記 (B) 成分が、細菌由来プロテアーゼである、項 1 ～ 11 のいずれかに記載の液体酵素製剤。

項 13. 前記細菌由来プロテアーゼが、クリセオバクテリウム属由来のプロテアーゼである、項 12 に記載の液体酵素製剤。

項 14. 前記細菌由来プロテアーゼが、バチルス属及び／又はジオバチルス属由来のプロテアーゼである、項 12 に記載の液体酵素製剤。

項 15. 前記 (A) 成分 100 U 当たりの前記 (B) 成分の含有量が、 $0.002 \sim 400 \text{ U}$ である、項 1 ～ 14 のいずれかに記載の液体酵素製剤。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、タンパク質脱アミド酵素の活性安定性に優れた液体酵素製剤が提供される。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]タンパク質脱アミド酵素を含む液体酵素製剤へのプロテアーゼ添加量（添加活性）と、当該液体酵素製剤のタンパク質脱アミド酵素の残存活性との関係を示す。

発明を実施するための形態

[0014] [1. 液体酵素製剤]

本発明の液体酵素製剤は、(A) タンパク質脱アミド酵素（以下において、「(A) 成分」とも記載する。）と、(B) プロテアーゼ（以下において、「(B) 成分」とも記載する。）とを含むことを特徴とする。以下、本発明の液体酵素製剤について詳述する。さらに、本発明の液体酵素製剤は、（

C) ソルビトール（以下において、「(C) 成分」とも記載する。）及び／又は (D) クエン酸塩（以下において、「(D) 成分」とも記載する。）を含むことができる。

[0015] [1-1. (A) タンパク質脱アミド酵素]

本発明の液体酵素製剤は、(A) 成分としてタンパク質脱アミド酵素を含む。タンパク質脱アミド酵素は、ペプチド結合の切断及びタンパク質の架橋を伴わないタンパク質のアミド基含有側鎖を分解する作用を示す酵素であって、その種類及び由来等は特に限定されない。また、上記作用が主活性である限り、ペプチド結合の切断及びタンパク質の架橋を伴うタンパク質のアミド基含有側鎖を分解する作用をさらに有していても良い。タンパク質脱アミド酵素の例として、タンパク質中のグルタミン残基を脱アミド化し、グルタミン酸に変換する酵素（例えばプロテイングルタミナーゼ）、及びタンパク質中のアスパラギン残基を脱アミド化し、アスパラギン酸に変換する酵素（例えばプロテインアスパラギナーゼ）が挙げられる。タンパク質脱アミド酵素のより具体的な例としては、JP2000-50887A、JP2001-218590A、WO2006/075772A1に開示された、クリセオバクテリウム (*Chryseobacterium*) 属、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属、エンペドバクター (*Empedobacter*) 属、スフィンゴバクテリウム (*Sphingobacterium*) 属、アウレオバクテリウム (*Aureobacterium*) 属、又はミロイデス (*Myroides*) 属由来のタンパク質脱アミド酵素；WO2015/133590に開示された、ルティミクロビウム (*Luteimicrobium*) 属、アグロマイセス (*Agromyces*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、又はレイフソニア (*Leifsonia*) 属由来のタンパク質脱アミド酵素；及びクリセオバクテリウム属由来のプロテイングルタミナーゼの市販品が挙げられる。これらのタンパク質脱アミド酵素は、1種を単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせて用いてもよい。

[0016] これらのタンパク質脱アミド酵素の中でも、より一層活性安定性に優れた液体酵素製剤とする観点から、好ましくはクリセオバクテリウム属由来のタンパク質脱アミド酵素、より好ましくはクリセオバクテリウム属由来のプロテイングルタミナーゼ、さらに好ましくはクリセオバクテリウム・プロテオリティカム種由来のプロテイングルタミナーゼが挙げられる。

[0017] タンパク質脱アミド酵素は、上記のタンパク質脱アミド酵素の由来元となる微生物の培養液より調製することができる。具体的な調製方法としては、上記の微生物の培養液又は菌体よりタンパク質脱アミド酵素を回収する方法が挙げられる。例えば、タンパク質脱アミド酵素分泌型微生物を用いる場合は、培養液から、必要に応じて予めろ過、遠心処理等によって菌体を回収した後、酵素を分離及び／又は精製することができる。また、タンパク質脱アミド酵素非分泌型微生物を用いる場合は、必要に応じて予め培養液から菌体を回収した後、菌体を加圧処理、超音波処理等によって破碎して酵素を露出させた後、酵素を分離及び／又は精製することができる。酵素の分離及び／又は精製法としては、公知のタンパク質分離及び／又は精製法を特に限定されることなく用いることができ、例えば、遠心分離法、UF濃縮法、塩析法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等が挙げられる。

[0018] 本発明の液体酵素製剤における（A）成分の含有量としては特に限定されないが、例えば0.1～10,000 U/mL、1～5,000 U/mL、10～3,000 U/mL、又は50～2,000 U/mL、好ましくは100～1,500 U/mL、より好ましくは200～1,000 U/mL、さらに好ましくは300～900 U/mL、又は350～700 U/mL、一層好ましくは400～600 U/mLが挙げられる。

[0019] タンパク質脱アミド酵素の活性については、ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシン（Z-Gln-Gly）を基質とし、1分間に1 μmol のアンモニアを遊離する酵素量を1単位（1 U）とする。

[0020] [1-2.（B）プロテアーゼ]

本発明の液体酵素製剤は、（B）成分としてプロテアーゼを含む。本発明

において、プロテアーゼは、その由来において特に限定されるものではないが、例えば、細菌由来プロテアーゼが挙げられる。

[0021] 細菌由来プロテアーゼとしては、クリセオバクテリウム (*Chryseobacterium*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属及びジオバチルス (*Geobacillus*) 属等に由来するプロテアーゼが挙げられる。

[0022] クリセオバクテリウム属由来プロテアーゼは、本発明の所望の効果をえられるものであれば特に限定されない。クリセオバクテリウム属由来プロテアーゼの具体例としては、*Chryseobacterium nematophagum*、*Chryseobacterium cucumeris*、*Chryseobacterium lactis*、*Chryseobacterium rhizoplane*、*Chryseobacterium joostei*、*Chryseobacterium shigense*、*Chryseobacterium proteolyticum*、*Chryseobacterium gleum*、及び *Chryseobacterium soil* 等に由来するプロテアーゼが挙げられる。これらのクリセオバクテリウム属由来プロテアーゼは、1種を単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせ用いてもよい。これらのクリセオバクテリウム属由来プロテアーゼの中でも、タンパク質脱アミド酵素の活性安定化効果をより一層高める観点から、好ましくはクリセオバクテリウム・プロテオリティカム種由来プロテアーゼが挙げられる。

[0023] クリセオバクテリウム属由来プロテアーゼは、公知の方法により調製することができる。一例として、クリセオバクテリウム属細菌を培養し、プロテアーゼを公知の手段を用いて分離する方法、及び遺伝子組み換え技術を用いる方法等によって容易に調製することができる。

[0024] バチルス属 (又はジオバチルス属) 由来プロテアーゼの具体例としては、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、バチルス・クラウジー (*Bacillus clausii*)、バ

チルス・インターミディウス (*Bacillus intermedius*)、バチルス・レントス (*Bacillus lentus*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・サブティリス (*Bacillus subtilis*)、及びバチルス・サーモプロテオリティカス (*Bacillus thermoproteolyticus*)、及びこれらのジオバチルス属由来のプロテアーゼが挙げられる。本発明において、上記のプロテアーゼは、1種を単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせ用いてもよい。これらのバチルス属（又はジオバチルス属）由来プロテアーゼの中でも、タンパク質脱アミド酵素の活性安定化効果をより一層高める観点から、好ましくはバチルス・リケニフォルミス由来プロテアーゼ、バチルス・アミロリケファシエンス由来プロテアーゼ及びこれらのジオバチルス属由来のプロテアーゼが挙げられる。

[0025] 本発明の液体酵素製剤における（B）成分の含有量としては、本発明の効果を損なわない限り特に限定されないが、例えば0.01～10,000 U/mL又は0.01～5,000 U/mLが挙げられる。

[0026] タンパク質脱アミド酵素の活性安定化効果をより一層高める観点から、本発明の液体酵素製剤における（B）成分の含有量としては、好ましくは、0.01～3,500 U/mL、より好ましくは0.01～3,000 U/mL、又は0.01～2,500 U/mL、さらに好ましくは、0.01～2,000 U/mL、0.01～1,800 U/mL、0.01～1,650 U/mL、0.01～1,500 U/mL、0.01～1,400 U/mL、0.01～1,300 U/mL、0.01～1,200 U/mL、0.01～1,100 U/mL、0.01～1,000 U/mL、0.01～900 U/mL、0.01～800 U/mL、0.01～700 U/mL、0.01～600 U/mL、0.01～500 U/mL、0.01～400 U/mL、0.01～300 U/mL、0.01～200 U/mL、又は0.0

1～150 U/mL、一層好ましくは、0.01～100 U/mL、0.01～80 U/mL、0.01～75 U/mL、0.01～70 U/mL、0.01～65 U/mL、0.01～40 U/mL、0.01～20 U/mL、0.01～10 U/mL、又は0.01～5 U/mL（プロテアーゼがバチルス属（又はジオバチルス属）由来プロテアーゼの場合、より一層好ましくは、0.01～20 U/mL、0.01～10 U/mL、又は0.01～5 U/mL）が挙げられる。

[0027] タンパク質脱アミド酵素の活性安定化効果を効果的に得る観点から、本発明の液体酵素製剤における（B）成分の含有量としては、0.1～2,000 U/mL、0.5～2,000 U/mL、1～2,000 U/mL、5～2,000 U/mL、10～2,000 U/mL、15～2,000 U/mL、20～2,000 U/mL、30～2,000 U/mL、40～2,000 U/mL、50～2,000 U/mL、60～2,000 U/mL、70～2,000 U/mL、80～2,000 U/mL、90～2,000 U/mL、100～2,000 U/mL、150～2,000 U/mL、200～2,000 U/mL、250～2,000 U/mL、又は300～2,000 U/mLであってもよい。

[0028] さらに、（C）成分を配合することによりタンパク質脱アミド酵素の活性安定化効果を高める観点から、本発明の液体酵素製剤における（B）成分の含有量としては、好ましくは、100～2,000 U/mL、150～2,000 U/mL、200～2,000 U/mL、250～2,000 U/mL、又は300～2,000 U/mLが挙げられる。

[0029] 本発明の液体酵素製剤における（A）成分100 U当たりの（B）成分の含有量としては、本発明の効果を損なわない限り特に限定されないが、例えば0.002～2,000 U又は0.002～1,000 Uが挙げられる。

[0030] タンパク質脱アミド酵素の活性安定化効果をより一層高める観点から、本発明の液体酵素製剤における（A）成分100 U当たりの（B）成分の含有量としては、好ましくは、0.002～700 U、より好ましくは0.00

2～600U、又は0.002～500U、さらに好ましくは、0.002～400U、0.002～360U、0.002～330U、0.002～300U、0.002～280U、0.002～260U、0.002～240U、0.002～220U、0.002～200U、0.002～180U、0.002～160U、0.002～140U、0.002～120U、0.002～100U、0.002～80U、0.002～60U、0.002～40U、又は0.002～30U、一層好ましくは、0.002～20U、0.002～16U、0.002～15U、0.002～14U、0.002～13U、0.002～8U、0.002～4U、0.002～2U、又は0.002～1U（プロテアーゼがバチルス属（又はジオバチルス属）由来プロテアーゼの場合、より一層好ましくは、0.002～4U、0.002～2U、又は0.002～1U）が挙げられる。

[0031] タンパク質脱アミド酵素の活性安定化効果を効果的に得る観点から、本発明の液体酵素製剤における（A）成分100U当たりの（B）成分の含有量としては、0.02～400U、0.1～400U、0.2～400U、1～400U、2～400U、3～400U、4～400U、6～400U、8～400U、10～400U、12～400U、14～400U、16～400U、18～400U、20～400U、30～400U、40～400U、50～400U、又は60～400Uであってもよい。

[0032] さらに、（C）成分を配合することによりタンパク質脱アミド酵素の活性安定化効果を高める観点から、本発明の液体酵素製剤における（A）成分100U当たりの（B）成分の含有量としては、好ましくは、20～400U、30～400U、40～400U、50～400U、又は60～400Uが挙げられる。

[0033] プロテアーゼの活性については、カゼインを基質とし、フォリン法により測定されるものとする。すなわち、プロテアーゼの活性は、カゼインを基質として常法により測定対象プロテアーゼの至適pHに応じて設定されるpHで酵素反応を行い、1分間にチロシン1μgに相当するフォリン試液呈色物

質の増加をもたらす酵素量を1単位（1 U）とする。

[0034] [1-3. (C) ソルビトール]

本発明の液体酵素製剤は、(C) 成分としてソルビトールを含むことができる。本発明の液体酵素製剤において、(C) 成分を配合してよい場合としては特に制限はない。

[0035] (C) 成分は、特に、本発明の液体酵素製剤における(B) 成分の含有量が、100~2,000 U/mL、150~2,000 U/mL、200~2,000 U/mL、250~2,000 U/mL、又は300~2,000 U/mLである場合、若しくは、(A) 成分100 U当たりの(B) 成分の含有量が、20~400 U、30~400 U、40~400 U、50~400 U、又は60~400 Uである場合に、液体酵素製剤の安定性をより一層向上できる点で好ましい。

[0036] 本発明の液体酵素製剤における(C) 成分の含有量としては、例えば、10 w/v%以上、又は15 w/v%以上、好ましくは20 w/v%以上、又は25 w/v%以上、より好ましくは30 w/v%以上、さらに好ましくは35 w/v%以上、一層好ましくは38 w/v%以上が挙げられる。この場合、(C) 成分の上記含有量範囲の上限としても特に限定されないが、例えば80 w/v%以下、75 w/v%以下、65 w/v%以下、55 w/v%以下、50 w/v%以下、45 w/v%以下、又は42 w/v%以下が挙げられる。(C) 成分の含有量の具体的な範囲としては、例えば10~80 w/v%、又は15~75 w/v%、好ましくは20~65 w/v%、又は25~55 w/v%、より好ましくは30~50 w/v%、さらに好ましくは35~45 w/v%、一層好ましくは38~42 w/v%が挙げられる。

[0037] 本発明の液体酵素製剤における(A) 成分1 U当たりの(C) 成分の含有量としては、例えば0.15 mg以上、0.2 mg以上、0.3 mg以上、0.4 mg以上、又は0.45 mg以上、好ましくは0.5 mg以上、又は0.6 mg以上、より好ましくは0.75 mg以上が挙げられる。また、本発明の液体酵素製剤における(A) 成分1 U当たりの(C) 成分の上記含有

量範囲の上限としても特に限定されないが、例えば1.2 mg以下、1.1 mg以下、1 mg以下、0.85 mg以下、又は0.83 mg以下が挙げられる。(A)成分1 U当たりの(C)成分の含有量の具体的な範囲としては、例えば0.15~1.2 mg、0.2~1.1 mg、0.3~1 mg、0.4~1 mg、又は0.45~1 mg、好ましくは0.5~0.85 mg、又は0.6~0.85 mg、より好ましくは0.75~0.83 mgが挙げられる。

[0038] [1-4. (D)クエン酸塩]

本発明の液体酵素製剤は、(D)成分としてクエン酸塩を含むことができる。クエン酸塩の具体例としては、好ましくは、カリウム塩、ナトリウム塩等のアルカリ金属塩が挙げられ、より好ましくはナトリウム塩が挙げられる。

[0039] 本発明の液体酵素製剤において、(D)成分を配合してよい場合としては特に制限はない。(D)成分は、pH緩衝剤として用いることができる。(D)成分は、pH変動を抑制する一方で、本発明の液体酵素製剤の安定性を低下させる傾向にある。しかしながら、特に、本発明の液体酵素製剤における(B)成分の含有量が、80~2,000 U/mL、90~2,000 U/mL、100~2,000 U/mL、150~2,000 U/mL、200~2,000 U/mL、250~2,000 U/mL、又は300~2,000 U/mLである場合、若しくは、(A)成分100 U当たりの(B)成分の含有量が、16~400 U、18~400 U、20~400 U、30~400 U、40~400 U、50~400 U、又は60~400 Uである場合に、液体酵素製剤の安定性の低下を抑制できる点で好ましい。

[0040] 本発明の液体酵素製剤における(D)成分の含有量としては、例えば、0.5 w/v%以上、好ましくは0.8 w/v%以上、より好ましくは1 w/v%以上、さらに好ましくは1.5 w/v%以上、2 w/v%以上、2.5 w/v%以上、又は2.8 w/v%以上が挙げられる。この場合、(D)成分の上記含有量範囲の上限としても特に限定されないが、例えば20 w/v

%以下、18 w/v %以下、16 w/v %以下、13 w/v %以下、11 w/v %以下、9 w/v %以下、7 w/v %以下、5 w/v %以下、4 w/v %以下、又は3.5 w/v %以下が挙げられる。(D)成分の含有量の具体的な範囲としては、例えば0.5~20 w/v %、又は0.5~18 w/v %、好ましくは0.8~16 w/v %、又は0.8~13 w/v %、より好ましくは1~11 w/v %、又は1~9 w/v %、さらに好ましくは1.5~7 w/v %、2~5 w/v %、2.5~4 w/v %、又は2.8~3.5 w/v %が挙げられる。

[0041] 本発明の液体酵素製剤における(A)成分1 U当たりの(D)成分の含有量としては、例えば、0.0075 mg以上、好ましくは0.012 mg以上、より好ましくは0.02 mg以上、さらに好ましくは0.025 mg以上、0.03 mg以上、0.035 mg以上、0.04 mg以上、0.045 mg以上、又は0.05 mg以上が挙げられる。本発明の液体酵素製剤における(A)成分1 U当たりの(D)成分の上記含有量範囲の上限としても特に限定されないが、例えば0.3 mg以下、0.27 mg以下、0.24 mg以下、0.2 mg以下、0.16 mg以下、0.14 mg以下、0.1 mg以下、0.09 mg以下、0.08 mg以下、又は0.07 mg以下が挙げられる。(A)成分1 U当たりの(D)成分の含有量の具体的な範囲としては、0.0075~0.3 mg、好ましくは0.012~0.27 mg、より好ましくは0.02~0.24 mg、さらに好ましくは0.025~0.2 mg、0.03~0.16 mg、0.035~0.14 mg、0.04~0.1 mg、0.045~0.09 mg、0.045~0.08 mg、又は0.05~0.07 mgが挙げられる。

[0042] [1-5. 他の成分]

本発明の液体酵素製剤は、上記の(A)成分及び(B)成分、並びに必要なに応じて配合される(C)成分及び/又は(D)成分以外に、基剤としての水を含む。さらに、本発明の液体酵素製剤は、(A)成分、(B)成分及び水、並びに必要なに応じて配合される(C)成分及び/又は(D)成分以外に

、本発明の効果に影響を与えない程度に、他の成分を含んでいてもよいし、含んでいなくてもよい。当該他の成分としては、（Ａ）成分及び（Ｂ）成分以外の他の酵素、（Ｃ）成分及び（Ｄ）成分以外の他の添加剤等が挙げられる。

[0043] 他の酵素としては、例えば、アミラーゼ（ α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ）、グルコシダーゼ（ α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ）、ガラクトシダーゼ（ α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ）、ペプチダーゼ（ロイシンペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ）、リパーゼ、エステラーゼ、セルラーゼ、ホスファターゼ（酸性ホスファターゼ、アルカリホスファターゼ）、ヌクレアーゼ、デアミナーゼ、オキシダーゼ、デヒドロゲナーゼ、グルタミナーゼ、ペクチナーゼ、カタラーゼ、デキストラナーゼ、トランスグルタミナーゼ、プルラナーゼ等が挙げられる。これらの他の酵素は、１種を単独で含んでもよいし、複数種の組み合わせで含んでもよい。

[0044] 他の添加剤としては、緩衝剤、懸濁剤、生理食塩水等が挙げられる。緩衝剤としては、例えば、リン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤が挙げられる。これらの他の添加剤は、１種を単独で含んでもよいし、複数種の組み合わせで含んでもよい。

[0045] [１－６．製剤形態等]

 本発明の液体酵素製剤は液体状の酵素組成物である。本発明の液体酵素製剤は、水に対して、タンパク質脱アミド酵素とプロテアーゼ、及び所定の添加剤と、必要に応じ配合される他の成分とを所定量添加し、さらに必要に応じて滅菌することによって調製することができる。

[0046] 本発明の液体酵素製剤のｐＨ（２５℃でのｐＨを指す。以下において同様である。）については特に限定されないが、例えば５．５以上、好ましくは５．８以上が挙げられる。本発明の液体酵素製剤の上記ｐＨ範囲の上限としては特に限定されないが、好ましくは８．２以下、より好ましくは７．５以下、さらに好ましくは７以下、一層好ましくは６．５以下が挙げられる。ｐ

Hの具体的な範囲としては、例えば5.5～8.2、好ましくは5.5～7.5、より好ましくは5.8～7、さらに好ましくは5.8～6.5が挙げられる。

[0047] [1-7. 溶存酸素量]

本発明の液体酵素製剤に含まれる溶存酸素量については特に限定されない。特に、本発明の液体酵素製剤についてはタンパク質脱アミド酵素の活性安定性に優れているため、液体酵素製剤に含まれる溶存酸素量が積極的に低減させられていなくても、効果的に活性安定化効果を得ることができる。このような観点から、液体酵素製剤中の溶存酸素量の好適な例としては、3 mg/L超、好ましくは4 mg/L超、さらに好ましくは4.5 mg/L以上、一層好ましくは5 mg/L以上が挙げられる。液体酵素製剤中の上記溶存酸素量範囲の上限としては特に限定されないが、例えば8 mg/L以下、好ましくは7 mg/L以下、より好ましくは6 mg/L以下、一層好ましくは5.5 mg/L以下が挙げられる。溶存酸素量の具体的な範囲としては、3 mg/L超8 mg/L以下、好ましくは4 mg/L超7 mg/L以下、さらに好ましくは4.5～6 mg/L、一層好ましくは5～5.5 mg/Lが挙げられる。なお、本発明の液体酵素製剤は、溶存酸素量が3 mg/L以下である場合を排除するものではない。

[0048] [1-8. 容器への収容]

本発明の液体酵素製剤は、適宜、液体を収容可能な容器に収容される。

[0049] 好ましくは、本発明の液体酵素製剤は、内部空間が不活性ガスで置換された容器に収容される。不活性ガスとしては特に限定されず、例えば、窒素ガス及び希ガス（ヘリウムガス、アルゴンガス等）が挙げられる。容器の内部空間を不活性ガスで置換する方法については特に限定されず、例えば、気体状の不活性ガス又は液体状の不活性ガスを容器内に直接添加する方法が挙げられる。

[0050] 本発明の液体酵素製剤は、液体酵素製剤中に不活性ガスをバブリングさせなくとも、内部空間が不活性ガスで置換された容器に収容されることでタン

パク質脱アミド酵素の活性安定性を向上できる。このため、本発明の液体酵素製剤の好適な態様においては、不活性ガスをバブリングさせない。なお、本発明の液体酵素製剤を、内部空間が不活性ガスで置換された容器に収容する場合、不活性ガスをバブリングさせる形態が排除されるものではない。

[0051] 上記の容器に収容された本発明の液体酵素製剤において、容器中の（つまり、容器中の気相における）酸素濃度としては、たとえば5 v/v %以下、好ましくは3 v/v %以下、より好ましくは2 v/v %以下、1.5 v/v %以下、1.3 v/v %以下、又は1 v/v %以下が挙げられる。当該容器中の上記酸素濃度範囲は、その下限において特に限定されないが、例えば0.01 v/v %以上、0.05 v/v %以上、0.1 v/v %以上、0.4 v/v %以上、0.6 v/v %以上、0.8 v/v %以上、又は1 v/v %以上が挙げられる。

[0052] [1-9. 用途]

本発明の液体酵素製剤の用途としては、少なくともタンパク質脱アミド酵素活性を利用する任意の用途に利用することができる。例えば、本発明の液体酵素製剤は、タンパク質の改質を目的として用いることができる。タンパク質の改質の具体的な態様としては特に限定されず、タンパク質のグルタミン残基及びアスパラギン残基の γ -アミド基及び β -アミド基の脱アミド化によりカルボキシル基が生じることでもたらされるタンパク質の特性変化を利用するものであればよい。具体的には、タンパク質の改質としては、タンパク質の可溶性の増大、水分散性の増大、乳化力の向上、及び乳化安定性の向上等が挙げられる。

[0053] 従って、本発明の液体酵素製剤は、食品分野において広く用いることができる。具体的には、通常の食品のpH範囲である弱酸性条件環境において動物性タンパク質及び／又は植物性タンパク質の可溶性、分散性、乳化性などを向上させる用途（例えば、コーヒー・ホワイター、ジュースなどの酸性飲料、ドレッシング、マヨネーズ、クリームの製造用途）；植物性難溶解性蛋白質の可溶性、分散性の増大化（例えば、小麦グルテンを用いた天ぷら粉

等の製造用途) ; 製パン・製菓におけるドウの改質用途 (例えば、クラッカー、ビスケット、クッキー、ピザや或いはパイのクラストの製造用途) ; 食品中のアレルギー性蛋白質におけるアレルゲンの除去又は低減化用途 (例えば、小麦アレルギー患者用の食品の製造用途) ; 蛋白質のミネラル感受性を低下させ、蛋白質及びミネラルを含む液体中の可溶性ミネラル含量を高め、ミネラルの人体への吸収性を高める用途 (例えば、高ミネラル (例えばカルシウム) 含有飲料、ミネラル (例えばカルシウム) の吸収促進剤の製造用途) ; 苦みを低下させる用途、及び／又はグルタミン酸含有量を増強させる用途 (例えば、アミノ酸系調味料 (動物性蛋白質の加水分解物 (H A P)、植物性蛋白質の加水分解物 (H V P))、味噌・醤油の製造用途) 等が挙げられる。

[0054] さらに、本発明の液体酵素製剤の用途としては、タンパク質脱アミド酵素活性とプロテアーゼ活性との両方を利用する任意の用途に利用することもできる。

実施例

[0055] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0056] [(A) タンパク質脱アミド酵素]

タンパク質脱アミド酵素 (プロテイングルタミナーゼ) 生産株であるクリセオバクテリウム・プロテオリティカム (*C h r y s e o b a c t e r i u m p r o t e o l y t i c u m*) 種の培養液から夾雑高分子等の不溶成分を除去し、イオン交換クロマトグラフィーにて精製した。タンパク質脱アミド酵素活性は、以下の方法で測定した。

[0057] 30 mM Z-G l n-G l yを含む0.2 Mリン酸バッファー (pH 6.5) 1 mLにタンパク質脱アミド酵素を含む試料溶液0.1 mLを添加して、37℃で10分間放置した後、0.4 M T C A溶液を1 mL加えて反応を停止した。ブランクとして、30 mM Z-G l n-G l yを含む0.2 Mリン酸バッファー (pH 6.5) 1 mLに0.4 M T C A溶液を1 m

Lを加え、さらにタンパク質脱アミド酵素を含む試料溶液0.1 mLを添加して、37℃で10分間放置した。

[0058] 前記で得られた溶液についてアンモニアテストワコー（富士フィルム和光純薬）を用い、反応液中に生じたアンモニア量の測定を行った。アンモニア標準液（塩化アンモニウム）を用いて作成したアンモニア濃度と吸光度（630 nm）との関係を表す検量線より、反応液中のアンモニア濃度を求めた。

[0059] タンパク質脱アミド酵素の活性を、1分間に $1 \mu\text{mol}$ のアンモニアを生成する酵素量を1単位（1 U）とし、以下の式から算出した。式中、反応液量は2.1、酵素溶液量は0.1、Dfは酵素溶液の希釈倍率である。また、17.03はアンモニアの分子量である。

[0060] [数1]

$$\begin{aligned} & \text{タンパク質脱アミド酵素活性(U/mL)} \\ & = \text{反応液中のアンモニア濃度(mg/L)} \times (1/17.03) \times (\text{反応液量} / \text{酵素溶液量}) \times (1/10) \times Df \end{aligned}$$

[0061] [(B) プロテアーゼ]

以下の試験例において用いたプロテアーゼは、以下の通りである。

- ・クリセオバクテリウム属由来プロテアーゼ：Chryseobacterium proteolyticum由来プロテアーゼ
- ・Bacillus licheniformis由来プロテアーゼ
- ・Bacillus amyloliquefaciens由来プロテアーゼ

[0062] プロテアーゼ活性は、以下の方法で測定した。

0.6% (w/v) カゼイン溶液（0.05 mol/L リン酸水素ナトリウム、pH 8.0）5 mLを、37℃で10分間加温した後、プロテアーゼを含む試料溶液1 mLを加え、直ちに振り混ぜた。この液を37℃で10分間放置した後、トリクロロ酢酸試液（1.8% (w/v) トリクロロ酢酸、1.8% (w/v) 酢酸ナトリウム及び0.33 mol/L 酢酸を含む）5 mLを加えて振り混ぜ、再び37℃で30分間放置し、ろ過した。初めのろ

液 3 mL を除き、次のろ液 2 mL を量り、0.55 mol/L 炭酸ナトリウム試液 5 mL 及びフォリン試液（1→3）1 mL を加え、よく振り混ぜ、37℃で30分間放置した。この液（酵素反応液）につき、水を対照とし、波長 660 nm における吸光度 AT を測定した。

[0063] 別に、プロテアーゼを含む試料溶液 1 mL を量り、トリクロロ酢酸試液（1.8%（w/v）トリクロロ酢酸、1.8%（w/v）酢酸ナトリウム及び0.33 mol/L 酢酸を含む）5 mL を加えて振り混ぜた後、0.6%（w/v）カゼイン溶液（0.05 mol/L リン酸水素ナトリウム、pH 8.0）5 mL を加え、直ちに振り混ぜ、37℃で30分間放置したことを除いて上述の酵素反応液と同様に操作した液（ブランク）について、吸光度 AB を測定した。

[0064] 1 mg/mL チロシン標準原液（0.2 mol/L 塩酸）1 mL，2 mL，3 mL 及び 4 mL を量り、それぞれに 0.2 mol/L 塩酸試液を加え、100 mL とした。それぞれの液 2 mL を量り、0.55 mol/L 炭酸ナトリウム試液 5 mL 及びフォリン試液（1→3）1 mL を加え、直ちに振り混ぜ、37℃で30分間放置した。これらの液につき、0.2 mol/L 塩酸試液 2 mL を量り上記と同様に操作して得た液を対照とし、波長 660 nm における吸光度 A1，A2，A3 及び A4 を測定した。縦軸に吸光度 A1，A2，A3 及び A4 を、横軸にそれぞれの液 2 mL 中のチロシン量（μg）をとり、検量線を作成し、吸光度差 1 に対するチロシン量（μg）を求めた。

1 分間にチロシン 1 μg に相当するフォリン試液呈色物質の増加をもたらす酵素量を 1 単位（1 U）とした。

[0065] [数2]

$$\text{プロテアーゼ活性(U/g, U/mL)} = (AT - AB) \times F \times 11/2 \times 1/10 \times 1/M$$

AT：酵素反応液の吸光度

AB：ブランクの吸光度

F：チロシン検量線より求めた吸光度差が1のときのチロシン量(μg)

11/2：反応停止後のトータル液量への換算係数

1/10：反応時間1分当たりへの換算係数

M：試料溶液1mL中の試料の量(g 又はmL)

[0066] [試験例 1]

イオン交換クロマトグラフィー精製したプロテイングルタミナーゼ（PG、（A）成分）に、プロテアーゼ（（B）成分）、ソルビトール（（C）成分）又はクエン酸（（D）成分）を、表 1 から表 3 に記載の量で添加し混合した。80%酢酸又は6N水酸化ナトリウム水溶液をpH調整剤として用いてpHを6.0（25℃）に調整し、PGの濃度が表 1 から表 3 中の通りである液体酵素製剤を調製した。調製した液体酵素製剤を容器に入れ、窒素ボンベより窒素を保存容器の気相（液体酵素製剤からなる液相の上の空間）に注入し、20回出し入れを繰り返し、容器内の酸素を窒素にほぼ完全に置換（つまり、液体酵素製剤中に窒素をバブリングさせずに、気相の酸素を窒素に置換）して密閉し、容器入り液体酵素製剤を得た。

[0067] このようにして得られた容器入り液体酵素製剤を40℃で1か月間放置した。放置前におけるタンパク質脱アミド酵素活性値を100%とした場合の、放置後におけるタンパク質脱アミド酵素活性値の相対値（%）を、残存活性として算出した。結果を表 1 から表 3 に示す。また、ブレンドしたプロテアーゼ添加活性とタンパク質脱アミド酵素活性の残存活性との相関関係を表したものを図 1 に示す。

[0068] [表1]

	参考例 1	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5	実施例 6	実施例 7	実施例 8	実施例 9	実施例 10	実施例 11
(A) PG(U/mL)	500											
(B)プロテアーゼ 1 (U/mL)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(B)プロテアーゼ 2 (U/mL)		0.6	6	60	—	—	0.6	6	60	—	—	—
(B)プロテアーゼ 3 (U/mL)	—	—	—	—	0.6	6	—	—	—	0.6	6	60
(C)ソルビトール(w/v%)	—	—	—	—	—	—	40	40	40	40	40	40
(D)クエン酸3Na(w/v%)	—	—	—	—	—	—	3	3	3	3	3	3
pH調整剤	適量											
水	残部											
合計(w/v%)	100											
pH (25℃)	pH6.0											
(A)100U当たり(B) (U)		0.12	1.2	12	0.12	1.2	0.12	1.2	12	0.12	1.2	12
残存活性	100%	100%	100%	89%	100%	100%	81%	81%	78%	86%	89%	80%

プロテアーゼ 1 : *Chryseobacterium proteolyticum* 由来
プロテアーゼ 2 : *Bacillus licheniformis* 由来
プロテアーゼ 3 : *Bacillus amyloliquefaciens* 由来

[0069]

[表2]

	実施例 12	実施例 13	実施例 14	実施例 15	実施例 16	実施例 17	実施例 18	実施例 19	実施例 20	比較例 2	比較例 3
(A) PG(U/mL)	500										
(B)プロテアーゼ 1 (U/mL)	1	3	6	7	17	19	82	123	265	4111	5642
(B)プロテアーゼ 2 (U/mL)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(B)プロテアーゼ 3 (U/mL)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(C)ソルビトール(w/v%)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(D)クエン酸3Na(w/v%)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pH調整剤	適量										
水	残部										
合計(w/v%)	100										
pH (25℃)	pH6.0										
(A)100U当たり(B) (U)	0.2	0.6	1.2	1.4	3.4	3.8	16.4	24.6	53	822.2	1128
残存活性	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	86%	82%	2%	1%

プロテアーゼ 1 : *Chryseobacterium proteolyticum* 由来

プロテアーゼ 2 : *Bacillus licheniformis* 由来

プロテアーゼ 3 : *Bacillus amyloliquefaciens* 由来

[0070] [表3]

	実施例 21	実施例 22	実施例 23	比較例 4	比較例 5	実施例 24	実施例 25	実施例 26	実施例 27	比較例 6
(A) PG(U/mL)	500									
(B)プロテアーゼ 1 (U/mL)	136	447	1432	2234	5962	85	282	331	1632	4767
(B)プロテアーゼ 2 (U/mL)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(B)プロテアーゼ 3 (U/mL)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(C)ソルビトール(w/v%)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
(D)クエン酸3Na(w/v%)	—	—	—	—	—	3	3	3	3	3
pH調整剤	適量									
水	残部									
合計(w/v%)	100									
pH (25℃)	pH6.0									
(A)100U当たり(B) (U)	27.2	89.4	286.4	446.8	1192	17	56.4	66.2	326.4	953.4
残存活性	100%	95%	76%	32%	8%	90%	90%	82%	68%	8%

プロテアーゼ 1 : *Chryseobacterium proteolyticum* 由来

プロテアーゼ 2 : *Bacillus licheniformis* 由来

プロテアーゼ 3 : *Bacillus amyloliquefaciens* 由来

[0071] 表 1 ～ 3 に示される通り、実施例 1 ～ 27 と比較例 2 ～ 6 との対比から、
(B) 成分の配合量を 2, 000 U/mL 程度以下 ((A) 成分 100 U に対し (B) 成分の配合量を 400 U 程度以下) とすることで、タンパク質脱アミド酵素の活性安定化効果を高めることができた。

[0072] また、実施例 1 と実施例 6 の対比、実施例 2 と実施例 7 の対比、実施例 3

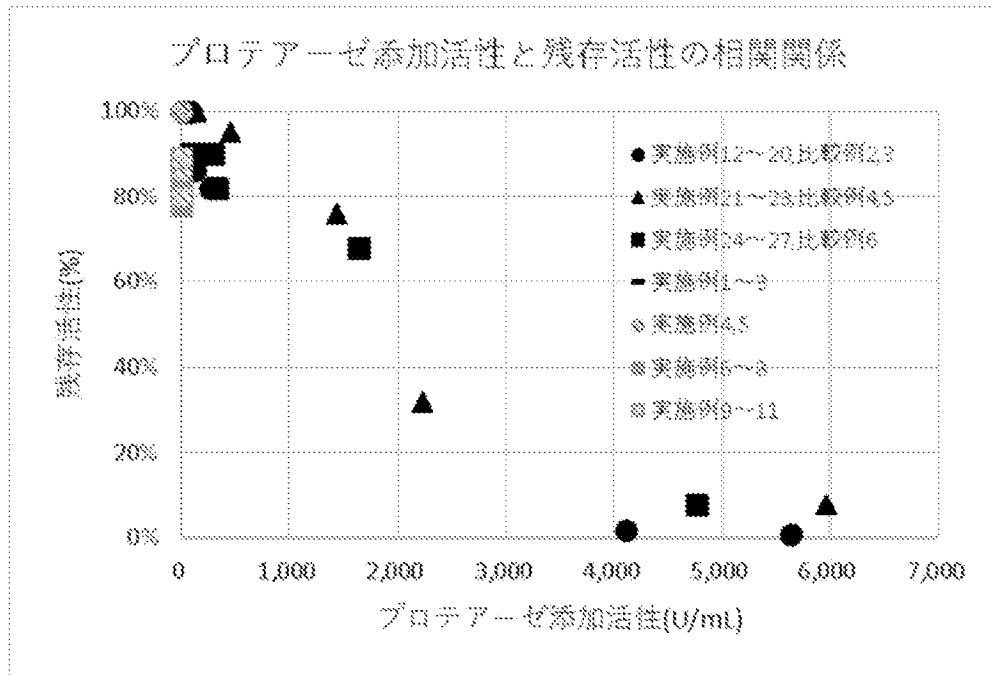
と実施例 8 の対比、実施例 4 と実施例 9 の対比、実施例 5 と実施例 10 の対比、実施例 18 と実施例 24 との対比から、(B) 成分の配合量が比較的少ない場合は、(C) 成分を追配合することで残存活性は下がる傾向にあるが、実施例 19 と実施例 21 との対比、実施例 20 と実施例 25 との対比から、(B) 成分の配合量が比較的多い場合（具体的には、(B) 成分の配合量を 100 U/mL 程度以上（(A) 成分 100 U に対し (B) 成分の配合量を 20 U 程度以上）である場合）、(C) 成分を追配合することで残存活性が向上した。なお、実施例 21 と実施例 24 との対比、実施例 22 と実施例 26 との対比から、(D) 成分を配合すると若干残存活性が落ちる傾向にあるが、(B) 成分の配合量が比較的多い場合に (C) 成分が追配合された液体酵素製剤の安定性が高いため、(D) 成分が配合されても残存活性の低下を抑制することができ、効果的に高い安定性が得られていた。

[0073] なお、表 1～3 に示すタンパク質脱アミド酵素の活性安定化効果は、容器内の酸素を窒素に置換しなかった場合に比べて向上している点でも優れていた。このような優れた安定化効果は、表 1～3 に示す液体酵素製剤中の溶存酸素量が、特許文献 3 で有用タンパク質の安定性が低下することが示されている 3 mg/L を超えている場合（具体的には、3 mg/L 超 8 mg/L 以下）であっても得られたため、液体酵素製剤中の溶存酸素量に関わらず内部空間を不活性ガスで置換するだけでこのような安定化効果が得られるのは、全く想定外であった。

請求の範囲

- [請求項1] (A) タンパク質脱アミド酵素と、(B) プロテアーゼを含む、液体酵素製剤。
- [請求項2] 前記液体酵素製剤が、内部空間が不活性ガスで置換された容器に収容されている、請求項1に記載の液体酵素製剤。
- [請求項3] さらに(C) ソルビトールを含む、請求項1に記載の液体酵素製剤。
- [請求項4] さらに(D) クエン酸塩を含む、請求項1に記載の液体酵素製剤。
- [請求項5] 前記(C)成分の含有量が30w/v%以上である、請求項3に記載の液体酵素製剤。
- [請求項6] 前記(D)成分の含有量が1w/v%以上である、請求項4に記載の液体酵素製剤。
- [請求項7] pH5.5以上である、請求項1に記載の液体酵素製剤。
- [請求項8] pH8.2以下である、請求項1に記載の液体酵素製剤。
- [請求項9] 前記(A)成分の含量が0.1～10,000U/mlである、請求項1に記載の液体酵素製剤。
- [請求項10] 前記(A)成分がクリセオバクテリウム・プロテオリティカム由来のタンパク質脱アミド酵素である、請求項1に記載の液体酵素製剤。
- [請求項11] 前記(B)成分の含量が0.01～2,000U/mLである、請求項1に記載の液体酵素製剤。
- [請求項12] 前記(B)成分が、細菌由来プロテアーゼである、請求項1に記載の液体酵素製剤。
- [請求項13] 前記細菌由来プロテアーゼが、クリセオバクテリウム属由来のプロテアーゼである、請求項12に記載の液体酵素製剤。
- [請求項14] 前記細菌由来プロテアーゼが、バチルス属及び／又はジオバチルス属由来のプロテアーゼである、請求項12に記載の液体酵素製剤。
- [請求項15] 前記(A)成分100U当たりの前記(B)成分の含有量が、0.002～400Uである、請求項1に記載の液体酵素製剤。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021776

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12N 9/80*(2006.01)i; *C12N 9/52*(2006.01)i; *C12N 9/54*(2006.01)i

FI: C12N9/80; C12N9/54; C12N9/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N9/80; C12N9/52; C12N9/54

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2022/118914 A1 (AMANO ENZYME INC.) 09 June 2022 (2022-06-09) claims 1, 3, 5-6, paragraphs [0006], [0029], [0030], [0035]	1-15
Y	WO 2022/215688 A1 (AMANO ENZYME EUROPE LTD.) 13 October 2022 (2022-10-13) paragraphs [0024], [0025]	1-15
Y	WO 2022/102723 A1 (AMANO ENZYME INC.) 19 May 2022 (2022-05-19) paragraphs [0008], [0037], [0041]	1-15
Y	JP 2021-145603 A (AJINOMOTO CO., INC.) 27 September 2021 (2021-09-27) claims 1, paragraphs [0006], [0015], [0040]	2, 4, 6
A		1, 3, 5, 7-15
Y	WO 2015/158723 A1 (NOVOZYMES A/S) 22 October 2015 (2015-10-22) examples	13
A		1-12, 14-15
A	JP 2014-532421 A (VALIO LTD.) 08 December 2014 (2014-12-08)	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 August 2024

Date of mailing of the international search report

03 September 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021776

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 4-207194 A (AJINOMOTO CO., INC.) 29 July 1992 (1992-07-29)	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/021776

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
WO	2022/118914	A1	09 June 2022	US	2024/0026332	A1
				claims 1, 3, 5-6, paragraphs [0007], [0030], [0031], [0036]		
				EP	4257682	A1
				CN	116547381	A
WO	2022/215688	A1	13 October 2022	US	2024/0108029	A1
				paragraphs [0030], [0031]		
				EP	4321032	A1
				CN	116916759	A
WO	2022/102723	A1	19 May 2022	US	2024/0016187	A1
				paragraphs [0008], [0046], [0050]		
				EP	4245149	A1
				CN	116471944	A
JP	2021-145603	A	27 September 2021	(Family: none)		
WO	2015/158723	A1	22 October 2015	US	2017/0114301	A1
				EP	3132032	A1
				CN	106164264	A
JP	2014-532421	A	08 December 2014	US	2014/0287098	A1
				WO	2013/064736	A1
				EP	2773753	A1
				CN	104024406	A
				KR	10-2014-0096090	A
JP	4-207194	A	29 July 1992	(Family: none)		

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12N 9/80(2006.01)i; C12N 9/52(2006.01)i; C12N 9/54(2006.01)i

FI: C12N9/80; C12N9/54; C12N9/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C12N9/80; C12N9/52; C12N9/54

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報1922-1996年

日本国公開実用新案公報1971-2024年

日本国実用新案登録公報1996-2024年

日本国登録実用新案公報1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2022/118914 A1（天野エンザイム株式会社）09.06.2022（2022-06-09） 請求項1、3、5-6、[0006][0029][0030][0035]	1-15
Y	WO 2022/215688 A1（アマノ エンザイム ヨーロッパ リミテッド）13.10.2022 （2022-10-13） [0024][0025]	1-15
Y	WO 2022/102723 A1（天野エンザイム株式会社）19.05.2022（2022-05-19） [0008][0037][0041]	1-15
Y	JP 2021-145603 A（味の素株式会社）27.09.2021（2021-09-27） 請求項1、[0006][0015][0040]	2,4,6
A		1,3,5,7-15
Y	WO 2015/158723 A1（NOVOZYMES A/S）22.10.2015（2015-10-22） 実施例	13
A		1-12,14-15
A	JP 2014-532421 A（ヴァリオ・リミテッド）08.12.2014（2014-12-08）	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.08.2024

国際調査報告の発送日

03.09.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)

〒100-8915

日本国

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

三須 大樹 4N 7883

電話番号 03-3581-1101 内線 3461

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 4-207194 A (味の素株式会社) 29.07.1992 (1992 - 07 - 29)	1-15

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/021776

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2022/118914	A1	09.06.2022	US 2024/0026332 A1 請求項1、3、5-6、[0 007][0030][003 1][0036] EP 4257682 A1 CN 116547381 A	
WO	2022/215688	A1	13.10.2022	US 2024/0108029 A1 [0030][0031] EP 4321032 A1 CN 116916759 A	
WO	2022/102723	A1	19.05.2022	US 2024/0016187 A1 [0008][0046][00 50] EP 4245149 A1 CN 116471944 A	
JP	2021-145603	A	27.09.2021	(ファミリーなし)	
WO	2015/158723	A1	22.10.2015	US 2017/0114301 A1 EP 3132032 A1 CN 106164264 A	
JP	2014-532421	A	08.12.2014	US 2014/0287098 A1 WO 2013/064736 A1 EP 2773753 A1 CN 104024406 A KR 10-2014-0096090 A	
JP	4-207194	A	29.07.1992	(ファミリーなし)	